



Paper Type: Original Article

## Involvement of Growth Hormone Secretagogue Receptor (GHS-R1a) in Regulation of RFRP-3 and GPR147 mRNA Expression in Hypothalamus of Male Rats

Farrin Babaei-Balderlou<sup>1,\*</sup> , Homayoun Khazali<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor of Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran; [f.babaei@urmia.ac.ir](mailto:f.babaei@urmia.ac.ir).

<sup>2</sup> Associate Professor of Department of Physiology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran; [h.khazali@sbu.ac.ir](mailto:h.khazali@sbu.ac.ir).

### Citation:

Babaei-Balderlou, F., & Khazali, H. (2024). Involvement of growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) in regulation of RFRP-3 and GPR147 mRNA expression in hypothalamus of male rats. *The quarterly scientific journal of applied biology*, 36(4), 47-59.

Received: 07/07/2023

Accepted: 28/01/2024

### Abstract

**Introduction:** It has been well established that the ghrelinergic system has an inhibitory effect on reproductive activity. RF-amide-Related Peptide-3 (RFRP-3) is one of the most important neuropeptides that regulates mammalian reproduction. Studies have shown the presence of a ghrelin receptor called Growth Hormone Secretagogue Receptor (GHS-R1a) in areas containing RFRP-3 in the brain. Therefore, the ghrelinergic system may be involved in the control of reproduction through RFRP-3. This study aimed to investigate the possible role of GHS-R1a receptors in regulating RFRP-3 mRNA expression and its receptor GPR147 in the hypothalamus of male rats.

**Methods:** Forty male Wistar rats were divided into 8 groups (n=5). Each group received saline, 2, 4, or 8 nmol ghrelin (agonist of GHS-R1a), 5, 10, or 20 nmol D-Lys3-GHRP-6 (DLS) (antagonist of GHS-R1a), or concurrently ghrelin (4 nmol) and DLS (10 nmol) through a cannula implanted in the third ventricle of the brain. The hypothalamus of mice was dissected 2 hours after treatment to evaluate the mRNA levels of RFRP-3 and GPR147 genes.

**Results:** Our findings showed that the injection of 4 nmol ( $P < 0.05$ ) or 8 nmol ( $P < 0.01$ ) ghrelin significantly increased RFRP-3 mRNA expression compared to the saline group. While the injection of 20 nmol DLS significantly ( $P < 0.05$ ) decreased the RFRP-3 mRNA level compared to the saline group. Pre-administration of DLS to animals receiving ghrelin prevented the effects of ghrelin in increasing RFRP-3 expression. Ghrelin or DLS had no significant effect on hypothalamic GPR147 mRNA levels.

**Conclusion:** Acute activation of GHS-R1a by ghrelin has a stimulating role in hypothalamic RFRP-3 mRNA expression without significant effect on GPR147 mRNA level.

**Keywords:** D-Lys3-GHRP-6, Ghrelin, GPR147, Hypothalamus, Reproduction, RF-amide-3-related peptide.





نوع مقاله: پژوهشی

## دخالت گیرنده سکرناگوتگ هورمون رشد (GHS-R1a) در تنظیم بیان mRNA ژن‌های RFRP-3 و GPR147 در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر

فرین بابائی بالدرلو<sup>۱</sup>، همایون خزعلی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

<sup>۲</sup> دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران ایران.

نویسنده مسئول: [F.babaei@urmia.Ac.Ir](mailto:F.babaei@urmia.Ac.Ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۶

### چکیده

**مقدمه:** به‌خوبی ثابت شده است که سیستم گرلینرژیک اثر مهاری بر فعالیت تولیدمثلی دارد. پپتید وابسته به RF-amide-3 (RFRP-3) یکی از مهم‌ترین نوروپپتیدهایی است که تولیدمثل پستانداران را تنظیم می‌کند. مطالعات، وجود گیرنده گرلین به‌نام گیرنده سکرناگوتگ هورمون رشد (GHS-R1a) را در نواحی حاوی RFRP-3 در مغز نشان داده‌اند؛ بنابراین، ممکن است سیستم گرلینرژیک در کنترل تولیدمثل از طریق RFRP-3 دخالت داشته باشد. هدف از این مطالعه بررسی نقش احتمالی گیرنده‌های GHS-R1a در تنظیم بیان mRNA ژن RFRP-3 و گیرنده آن GPR147 در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر بود.

**روش‌ها:** ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار به ۸ گروه تقسیم شدند (n=۵). هر گروه سالین، ۲، ۴- یا ۸- نانومول گرلین (آگونیست GHS-R1a)، ۵، ۱۰ یا ۲۰ نانومول D-Lys3-GHRP-6 (DLS) (آنتاگونیست GHS-R1a)، یا هم‌زمان گرلین (۴ نانومول) و DLS (۱۰ نانومول) از طریق کانول کاشته شده در بطن سوم مغز دریافت کرد. هیپوتالاموس موش ۲ ساعت پس از درمان برای ارزیابی سطوح mRNA ژن‌های RFRP-3 و GPR147 تشریح شد.

**یافته‌ها:** یافته‌های ما نشان داد که تزریق ۴ نانومول ( $P < 0.05$ ) یا ۸ نانومول ( $P < 0.01$ ) گرلین بیان RFRP-3-mRNA را در مقایسه با گروه سالین به‌طور معنی‌داری افزایش داد. درحالی‌که تزریق ۲۰ نانومول DLS به‌طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) سطح RFRP-3 mRNA را نسبت به گروه سالین کاهش داد. پیش تجویز DLS به حیوانات دریافت‌کننده گرلین از اثرات گرلین در افزایش بیان RFRP-3 جلوگیری کرد. گرلین یا DLS هیچ اثر قابل‌توجهی بر سطوح GPR147-mRNA هیپوتالاموس نداشتند.

**نتیجه‌گیری:** فعال‌سازی حاد GHS-R1a به‌وسیله گرلین در بیان RFRP-3-mRNA هیپوتالاموس نقش تحریکی دارد، بدون آن‌که تاثیر قابل‌توجهی بر سطح GPR147-mRNA داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: GPR147، D-Lys3-GHRP-6، پپتید وابسته به RF-amide-3، تولیدمثل، گرلین، هیپوتالاموس.

### ۱- مقدمه

سکرناگوتگ‌های هورمون رشد<sup>۱</sup>، از جمله مولکول‌های پپتیدی یا غیرپپتیدی طبیعی و مصنوعی هستند که باعث ترشح سوماتوتروپ‌ها در سطح هیپوفیز و هیپوتالاموس می‌شوند [1]، [2]. GHSs از طریق اتصال به نوع خاصی از گیرنده‌های متابوتروپیک جفت شده با پروتئین G (GPCR) به نام گیرنده GHS-R1a، ورود  $Ca^{2+}$  به سلول‌هایی که در آن‌ها به‌طور پایدار بیان می‌شوند را تنظیم می‌کنند [3]. علاوه بر گیرنده کاربردی GHS-R1a،

<sup>1</sup> Growth hormone secretagogue (GHS)

نوع دیگری از گیرنده فرعی GHS به نام GHS-R1b وجود دارد که نقش تعدیل کننده‌ای در سیگنال دهی GHS-R1a دارد [4]. GHS-R1a گیرنده‌ای برای هورمون متابولیک گرلین است که در ترشح هورمون رشد، مصرف انرژی و تنظیم اشتها نقش دارد [7]–[5]. پیش از این، رابطه بین گرلین، به عنوان یک سیگنال احتمالی برای کمبود انرژی، و عملکرد سیستم تولیدمثلی آشکار شده است [10]–[8]. سطوح بالای گرلین، به عنوان هورمون گرسنگی، در بیماران مبتلا به بی‌اشتهایی عصبی [9] و مبتلایان به اختلالات تولیدمثلی و بلوغ تاخیری مشاهده شده است [11]. در شرایط روزه‌داری، مصرف انرژی از مسیرهای تولیدمثلی دور و به فرآیندهای لازم برای بقا هدایت می‌شود [8]، [11]؛ بنابراین، ممکن است که گرلین در تنظیم محور تولیدمثلی در موارد تعادل منفی انرژی نقش داشته باشد. قبلاً اثر سرکوبگر گرلین بر ترشح سطوح پایه هورمون‌های لوتئینیزه کننده (LH) و آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) در موش صحرائی [12]، گوسفند [13]، میمون [14] و انسان [15] به اثبات رسیده است. علاوه بر این، این پپتید در نقش یک تعدیل کننده منفی در بلوغ جنس نر عمل می‌کند [10]، [12]. در راستای عملکردهای گرلین که در بالا ذکر گردید، mRNA ژن GHS-R1a در مغز شناسایی شده و به ویژه سطح بیان آن در بافت‌های محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) بالاست [16]. علاوه بر این، پیش تجویز D-Lys3-GHRP-6<sup>1</sup> (DLS) اثرات تنظیمی گرلین بر ترشح GnRH/LH را از بین می‌برد [17]، [18]. DLS آنتاگونیست انتخابی GHS-R1a می‌باشد که مانع از بروز برخی اثرات فیزیولوژیکی گرلین می‌شود. DLS به طور گسترده برای تعیین نقش گرلین و گیرنده‌های GHS-R1a در داخل بدن و در شرایط آزمایشگاهی استفاده شده است [21]–[18]. مکانیسم عمل این هگزاپپتید (DLS) از طریق مهار اثرات افزایشی گرلین بر cAMP می‌باشد. در مطالعه حاضر برای مسدود کردن GHS-R1a و بررسی نقش آن‌ها در کنترل برخی از جنبه‌های تولیدمثلی، از این آنتاگونیست استفاده گردید.

یکی از عوامل اصلی تنظیم کننده ترشح GnRH/LH، پپتید وابسته به آرژنین-فیل آلانین-آمید-3 (RFRP-3) است [22]. این پپتید در پستانداران، ارتولوگ هورمون بازدارنده گنادوتروپین (GnIH) در پرندگان است. RFRP-3 از نورون‌هایی که عمدتاً در هسته پستی میانی هیپوتالاموس (DMN) قرار دارند ترشح می‌شود [23]. الیاف این نورون‌ها به نورون‌های GnRH در ناحیه پیش‌پتیک (POA) هیپوتالاموس و برجستگی میانی [23]، [24] پیش می‌روند. علاوه بر این، گیرنده‌های RFRP-3 در نواحی مذکور بیان می‌شوند. از این طریق، RFRP-3 موجب سرکوب سنتز و ترشح GnRH/LH می‌شود [25]–[23]. RFRP-3 عملکردهای فیزیولوژیکی خود را از طریق گیرنده‌ای به نام GPR147 اعمال می‌کند که عمدتاً در هیپوتالاموس، هیپوفیز قدامی و بیضه‌ها بیان می‌شود [23]، [26]. در سطح عملکرد سلولی، RFRP-3/GPR147 آدنیلات سیکلاز را مهار می‌کند و مسیرهای سیگنالینگ وابسته به cAMP را سرکوب می‌کند [23]. نشان داده شده است که تجویز سیستماتیک RFRP-3 در موش‌های صحرائی نر، باعث کاهش رفتار جنسی و ترشح LH می‌شود [26].

آنالیزهای ایمنونوسیتوشیمیایی نشان داده‌اند که گیرنده گرلین، GHS-R1a، در ناحیه پستی میانی هیپوتالاموس که محل اصلی تجمع جسم سلولی نورون‌های RFRP-3 می‌باشد، بیان می‌شود [13]، [27]؛ بنابراین، احتمال دارد که گرلین از طریق این گیرنده‌ها بر میزان فعالیت نورون‌های RFRP-3 3 تاثیر بگذارد. با توجه به اثرات هم راستا و بازدارنده گرلین و RFRP-3 بر روی محور تولیدمثلی و هم‌چنین حضور GHS-R1a در ناحیه تجمع جسم سلولی نورون‌های RFRP-3، این سوال مطرح می‌شود که آیا اختلال تولیدمثلی ناشی از گرلین ممکن است ناشی از واسطه‌گری سیستم سیگنالینگ RFRP-3/GPR147 باشد. در این راستا، در مطالعه حاضر، تاثیر مهار یا فعال‌سازی GHS-R1a به ترتیب با استفاده از DLS و گرلین بر سطح بیان هیپوتالاموسی RFRP-3 mRNA و GPR147 که گیرنده عملکردی RFRP-3 است، بررسی شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد شیمیایی

در این مطالعه، گرلین (CAT: 031-31) و DLS (D-Lys3-GHRP-6) (CAT: 031-29) (Poenix Pharmaceutical Inc.) آمریکا، کتامین و زایلازین (Alfasan International، هلند)، کیت ستونی استخراج RNA تام (دنا زیست آسیا، ایران)، کیت DNase I و RT-PCR (Selangor، Vivantis Technologies، مالزی)، پرایمرها (Bioneer، کره جنوبی)، محلول قرمز ایمن (Safe red، کوثر بیوتکنولوژی، ایران)، ژل آگارز و نشانگر ۱۰۰ جفت باز (CinaGen، ایران) خریداری و استفاده شدند.

<sup>1</sup> D-Lys3-Growth Hormone Releasing Peptide-6 (D-Lys3-GHRP-6)

## ۲-۲- حیوانات

در این آزمایش از ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ و بیستار با وزن  $20 \pm 200$  گرم استفاده شد. حیوانات در اتاقی با دمای کنترل شده  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، تحت یک چرخه نور/تاریکی ۱۲ ساعته (شروع نور در ساعت ۰۸:۰۰ و شدت نور در میانه اتاق ۳۰۰ لوکس) نگهداری شدند. غذا و آب به‌طور آزاد در دسترس حیوانات قرار داشت.

## ۲-۳- جراحی استرئوتکسی

همه حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شده و سپس با استفاده از ابزار استرئوتکسی (Narishige، ژاپن) تحت عمل جراحی قرار گرفتند. هدف از جراحی، کاشت یک کانول راهنما در بطن سوم مغزی بر اساس مختصات استرئوتاکسیک (AP = -2.3، ML = 0.0، DV = 6.5) در اطلس مغز موش پاکسینوس و واتسون بود [28]، [29]. کانول راهنما یک سوزن فولادی ضد زنگ ۲۳-gauge بود که با سیمان دندان‌نی و سه پیچ کوچک فولادی ضد زنگ در بالای بطن سوم در سطح جمجمه ثابت شد. یک مسدود کننده فولادی ضد زنگ ۲۶-gauge متحرک نیز در این کانول تعبیه شده بود [30]. حیوانات پس از جراحی به صورت جداگانه نگهداری شدند. در پایان، برای اطمینان از کانولاسیون مناسب، پرفیوژن و آماده‌سازی برش مغز انجام شد.

## ۲-۴- تیمار درون بطن مغزی

پس از یک هفته بهبودی، حیوانات به هشت گروه (تعداد در هر گروه=۵)، شامل گروه‌های دریافت کننده سالین، ۲، ۴ و ۸ نانومول گرلین، ۵، ۱۰ و ۲۰ نانومول DLS (آنتاگونیست گرلین) و گروه تجویز هم‌زمان ۴ نانومول گرلین و ۱۰ نانومول DLS تقسیم شدند. حلال پپتیدها سالین بود. تمام محلول‌ها به صورت تازه تهیه شد و مقدار ۳ میکرولیتر از آن‌ها با استفاده از میکروسرنج همیلتون (Hamilton Inc., Reno, NA, USA) به بطن سوم مغز موش در مدت یک دقیقه تزریق شد. در گروه تجویز هم‌زمان، گرلین ۵ دقیقه پس از تجویز DLS تزریق شد. غلظت‌های گرلین در محدوده اثرات اورکسیژنیک (اشتهازا) مرکزی و ضد دیسپوزنیک (ضد عطش‌زا) آن انتخاب شدند [31]. غلظت‌های DLS بر اساس توانایی آن در کاهش اثرات تولیدمثلی گرلین انتخاب شد [32].

## ۲-۵- ارزیابی سطوح بیان mRNA در هیپوتالاموس

هیپوتالاموس از مغز حیوانات جدا و با نیتروژن مایع منجمد شد تا واکنش زنجیره‌ای رونوشت پلیمرز معکوس (RT-PCR) انجام شود. برای این منظور، ابتدا RNA کل با استفاده از کیت تجاری استخراج RNA بر اساس دستورالعمل کیت استخراج شد. غلظت، خلوص و کیفیت RNAهای جدا شده توسط نانودراپ (NanoDrop Technologies، Wilmington، USA) مورد بررسی قرار گرفت (محدوده قابل قبول:  $2 < \text{nm} / 260 < 1/8$ ). هر رونوشت با ۱ واحد DNase I به ازای هر ۱ میکروگرم RNA به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن دناتوراسیون حرارتی آنزیم به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA ژنومی انکوبه شد. سپس سنتز و تکثیر DNA مکمل (cdNA) با استفاده از کیت RT-PCR انجام شد. به‌طور خلاصه، ۱ میکروگرم از RNA کل به یک مخلوط واکنش حاوی ۲ میکرولیتر (۱۰ میلی‌مولار) مخلوط dNTP، ۰/۵ میکرولیتر (۱۰۰ واحد) آنزیم رونویس معکوس M-MLV، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱ میکرولیتر مهارکننده RNase و آب فاقد نوکلئاز اضافه شد و بر طبق دستورالعمل کیت انکوبه گردید.

RT-PCR توسط یک دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad، آمریکا) انجام شد. در این فرآیند مخلوط واکنش حاوی ۵ نانوگرم cDNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر (پرایمر) رو به جلو (Forward) و معکوس (Reverse) (۱۰ pM)، ۱ واحد Taq DNA (U) پلیمرز، ۰/۷۵ میکرولیتر  $MgCl_2$  (۵۰ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط ۱۰ میلی‌مولار dNTPs و آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC) و حجم نهایی آن ۲۰ میکرولیتر بود.

توالی پرایمرها بر اساس مطالعه ایواسا و همکاران [33] انتخاب شد. خصوصیات پرایمرهای هدف (RFRP-3 و GPR147) و پرایمر گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن خانه‌دار به شرح زیر است (جهت توالی از چپ به راست بصورت ۵' به ۳' است): RFRP-3

(شماره دسترسی NM\_023952.1) فوروارد: GACGCATCACCAAGACTG، ریورس: ACAGCTTCATAGCCCCTTGA با اندازه آمپلیکون ۲۱۸ جفت باز، GPR147 (شماره دسترسی NM\_12858) فوروارد: GGTCAGAACGGGAGTGATGT، ریورس: TGAGCACAATGAAGCAGACC با اندازه آمپلیکون ۱۶۳ جفت باز، GAPDH (شماره دسترسی BC\_013915) فوروارد: AAGAAGGTGGTGAAGCAGGGCATC، ریورس: CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG با اندازه آمپلیکون ۱۱۲ جفت باز.

فرآیند آمپلیفیکاسیون در مرحله RT-PCR طبق برنامه زمانی و دمایی یک سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰۰ ثانیه، سه مرحله تکرار شونده برای ۴۰ سیکل شامل مرحله اول در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله دوم برای RFRP-3 و GPR147 در ۶۳ درجه سانتی‌گراد یا برای GAPDH در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله سوم در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه انجام شد. در نهایت یک سیکل در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰۰ ثانیه در نظر گرفته شد. علاوه بر تیمار RNAs با DNase I، برای اطمینان از تولید محصولات PCR از cDNA سنتز شده و نه از DNA ژنومی، واکنش‌های کنترل در غیاب آنزیم ترانس کریپتاز معکوس در طول مرحله تکثیر طراحی شدند. محصولات تکثیر شده با PCR پس از مخلوط شدن با محلول قرمز ایمن بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ با استفاده از الکتروفورز (Bio-Rad، آمریکا) آنالیز شدند. به‌طور هم‌زمان، یک نشانگر ۱۰۰ جفت بازی نیز در یکی از چاهک‌های ژل بارگزاری شد. سپس باندهای موجود در ژل تحت نور UV مشاهده و با نرم‌افزار ImageJ (نسخه ۱/۴۱، آمریکا) کمی‌سازی شد.

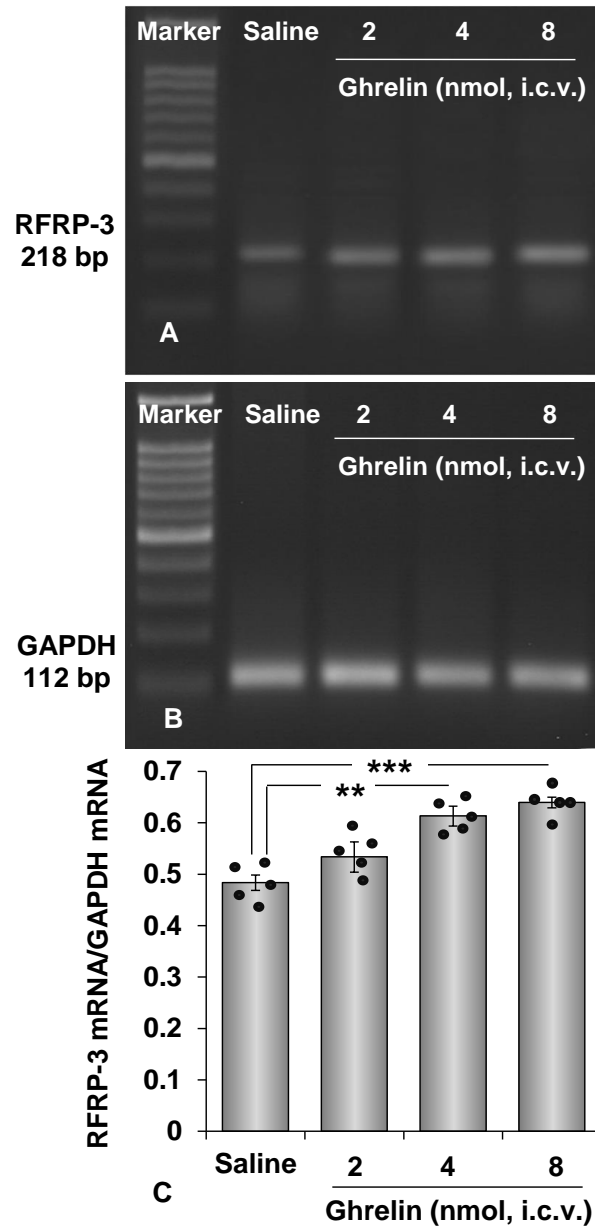
### ۳- تجزیه و تحلیل‌های آماری

تمامی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک ارزیابی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد و تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون تعقیبی توکی تعیین شد. تفاوت در سطح  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. تمام مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار از میانگین ارایه شد. نرم‌افزار Image J (نسخه ۱/۴۱، آمریکا) برای تعیین کمیت باندهای به‌دست‌آمده از الکتروفورز استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

### ۴- نتایج

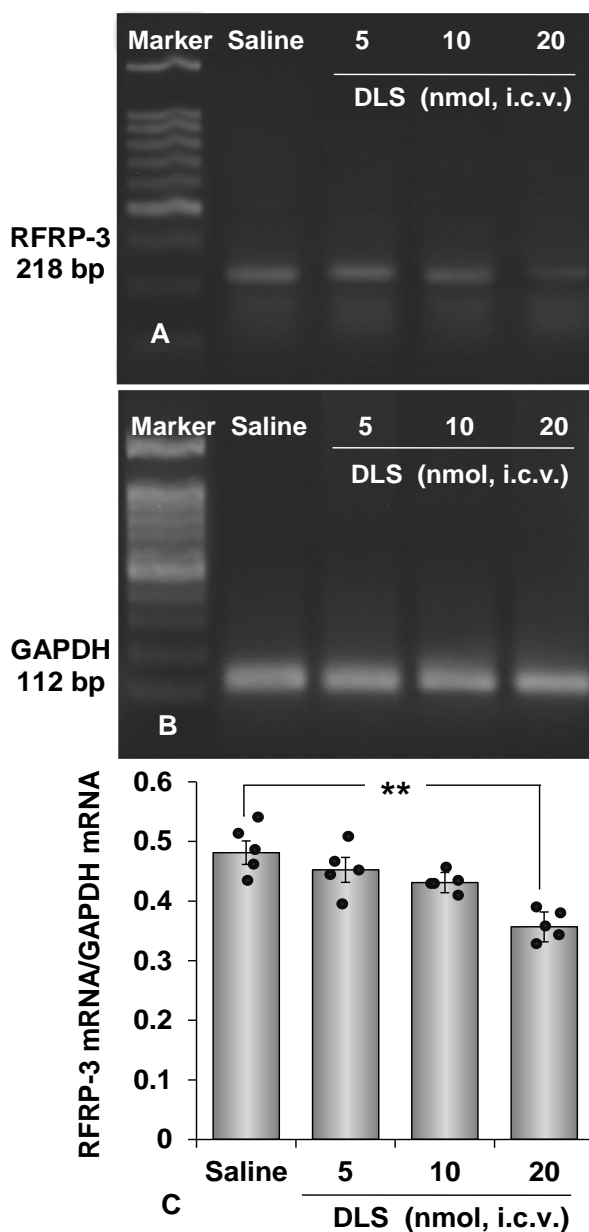
#### ۴-۱- اثرات آگونیست و آنتاگونیست GHS-R1a بر سطح mRNA RFRP-3

بیان هیپوتالاموسی RFRP-3 mRNA و GAPDH در موش‌های تحت درمان با گرلین به ترتیب در شکل‌های ۱-A و ۱-B نشان داده شده است. بیان نسبی مقادیر کمی RFRP-3 به GAPDH در شکل ۱-C نشان داده شده است. نتایج نشان داد که ۲ نانومول گرلین بیان نسبی RFRP-3 mRNA را ۳ در مقایسه با گروه سالیین افزایش داد، اما این اثر معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ). بیان نسبی RFRP-3 mRNA به‌طور قابل توجهی ( $P < 0.01$ ) به دنبال تزریق ۴ نانومول گرلین افزایش یافت، در حالی که تزریق ۸ نانومول گرلین اثرات افزایش گرلین را تشدید کرد و به‌طور قابل توجهی ( $P < 0.001$ ) سطح RFRP-3 mRNA را در مقایسه با گروه سالیین افزایش داد.



شکل ۱- اثرات گرلین بر محصولات آمپلیفیکاسیون PCR؛ A: سطوح بیان mRNA RFRP-3؛ B: سطوح بیان mRNA GAPDH و C: سطوح بیان نسبی RFRP-3 به GAPDH در هیپوتالاموس موش‌های صحرائی نر ویستار. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین نمایش داده شده‌اند؛ \*\*  $P < 0.01$  و \*\*\*  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه سالین. Figure 1- Effects of ghrelin on amplification products of PCR; A: RFRP-3, B: GAPDH, mRNA expression levels and C: the relative expression levels of RFRP-3 to GAPDH in hypothalamus of male Wistar rats. Data are represented as mean ± SEM; \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$  vs. saline group.

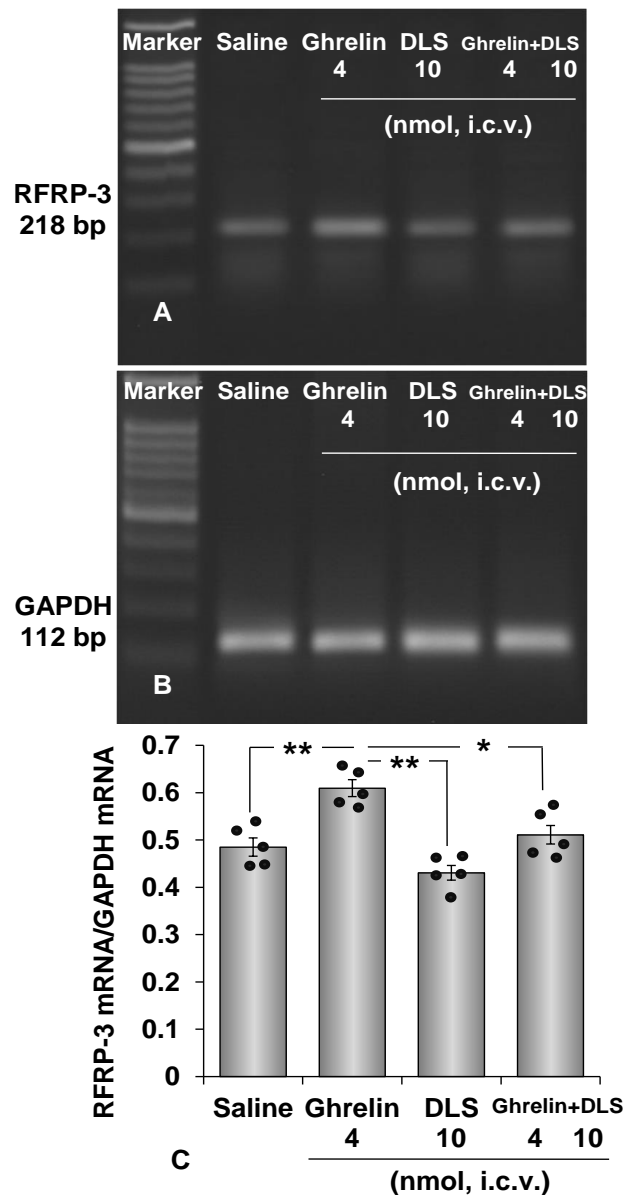
بیان mRNA هیپوتالاموس RFRP-3 و GAPDH در موش‌های تحت درمان با DLS به ترتیب در شکل‌های A-۲ و B-۲ نشان داده شده است. بیان نسبی مقادیر کمی RFRP-3 به GAPDH در شکل C-۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که ۵ یا ۱۰ نانومول از DLS هیچ اثر معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بر بیان mRNA RFRP-3 در مقایسه با گروه سالین نداشت. بیان نسبی RFRP-3 mRNA به‌طور قابل توجهی ( $P < 0.01$ ) پس از تزریق ۲۰ نانومول DLS در مقایسه با حیوانات سالین دریافت شده کاهش یافت.



شکل ۲- اثرات DLS بر محصولات آمپلیفیکاسیون PCR: A: سطوح بیان mRNA RFRP-3، B: *GAPDH* و C: سطوح بیان نسبی RFRP-3 به *GAPDH* در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر ویستار. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین نمایش داده شده‌اند؛ \*\*  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه سالین.

Figure 2- Effects of D-Lys3-GHRP-6 (DLS) on amplification products of PCR; A: RFRP-3, B: *GAPDH*, mRNA expression levels and C: the relative expression levels of RFRP-3 to *GAPDH* in hypothalamus of male Wistar rats. Data are represented as mean ± SEM; \*\*  $P < 0.01$  vs. saline group.

بیان هیپوتالاموسی RFRP-3 mRNA و *GAPDH* در موش‌هایی که هم‌زمان با ۴ نانومول گرلین و ۱۰ نانومول DLS تیمار شدند به ترتیب در شکل‌های ۳-A و ۳-B نشان داده شده است. بیان نسبی مقادیر کمی RFRP-3 به *GAPDH* در شکل ۳-C نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تزریق ۴ نانومول گرلین به‌طور معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) باعث افزایش سطح mRNA RFRP-3 در هیپوتالاموس شد. در حالی‌که تزریق ۱۰ نانومول DLS تاثیر معنی‌داری ( $P > 0.05$ ) بر این پارامتر نداشت. تجویز هم‌زمان ۴ نانومول گرلین و ۱۰ نانومول DLS در مقایسه با گروه سالین تاثیر معنی‌داری ( $P > 0.05$ ) بر سطح mRNA ژن RFRP-3 نداشت.



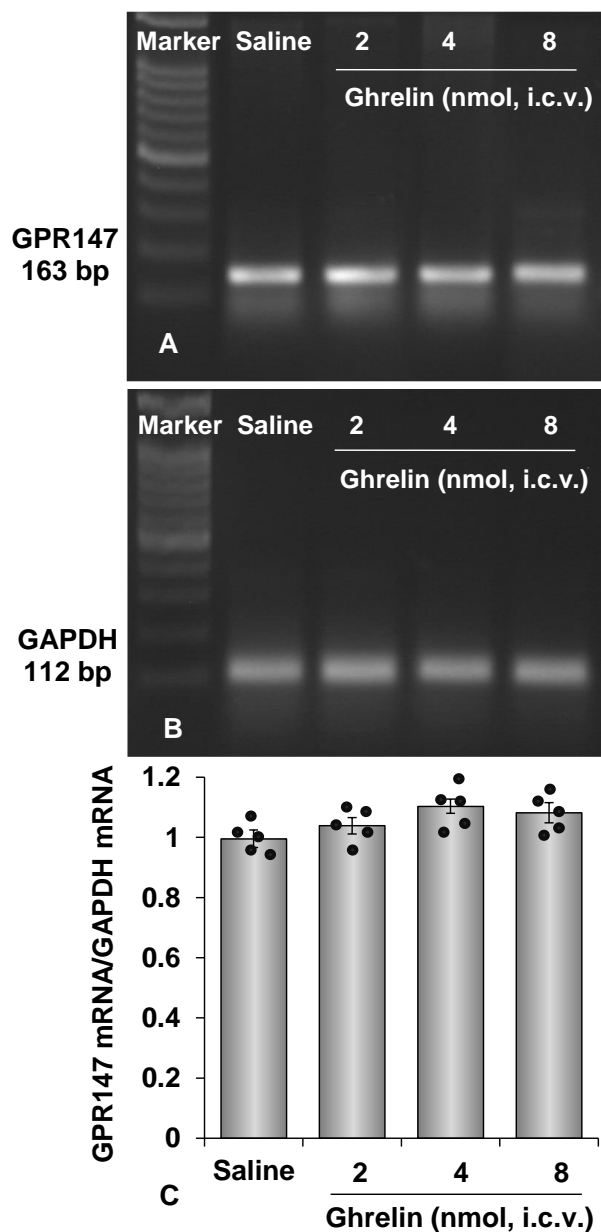
شکل ۳- اثرات گرلین و DLS بر محصولات آمپلیفیکاسیون PCR؛ A: سطوح بیان mRNA، B: RFRP-3، GAPDH، mRNA expression levels و C: سطوح بیان نسبی RFRP-3 به GAPDH در هیپوتالاموس موش‌های صحرائی نر ویستار. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین نمایش داده شده‌اند؛ \*  $P < 0.05$  و \*\*  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه سالین.

Figure 3- Effects of ghrelin and DLS on amplification products of PCR; A: RFRP-3, B: GAPDH, mRNA expression levels and C: the relative expression levels of RFRP-3 to GAPDH in hypothalamus of male Wistar rats. Data are represented as mean ± SEM; \*\*  $P < 0.01$  vs. saline group.

#### ۲-۴- اثرات آگونیست و آنتاگونیست GHS-R1a بر سطح GPR147 mRNA

بیان GPR147 mRNA و GAPDH در هیپوتالاموس موش‌های تحت تیمار با گرلین به ترتیب در شکل‌های ۴-A و ۴-B نشان داده شده است. بیان نسبی مقادیر کمی GPR147 به GAPDH در شکل ۴-C نشان داده شده است. نتایج نشان داد که گرلین ۲، ۴ یا ۸ نانومول بیان mRNA ژن GPR147 را نسبت به گروه سالین افزایش داد، اما این اثرات معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ).

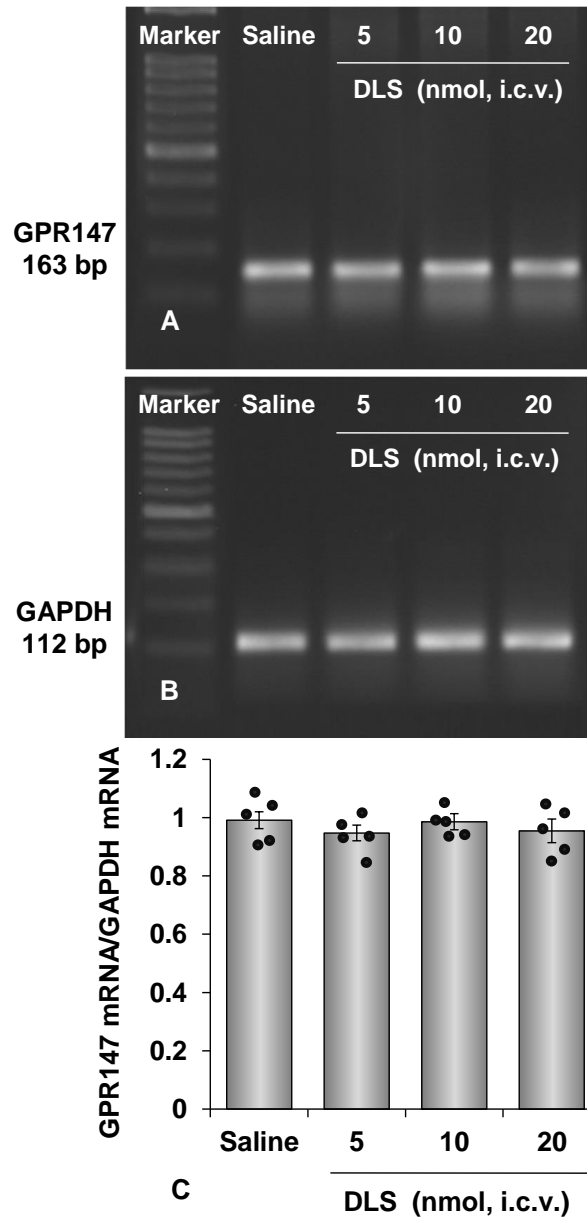




شکل ۴- اثرات گرلین بر محصولات آمپلیفیکاسیون PCR؛ A: سطوح بیان mRNA: B: GPR147، C: سطوح بیان نسبی GPR147 به GAPDH در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر ویستار. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار از میانگین نمایش داده شده‌اند.

Figure 4- Effects of ghrelin on amplification products of PCR; A: GPR147, B: GAPDH, mRNA expression levels and C: the relative expression levels of GPR147 to GAPDH in hypothalamus of male Wistar rats. Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

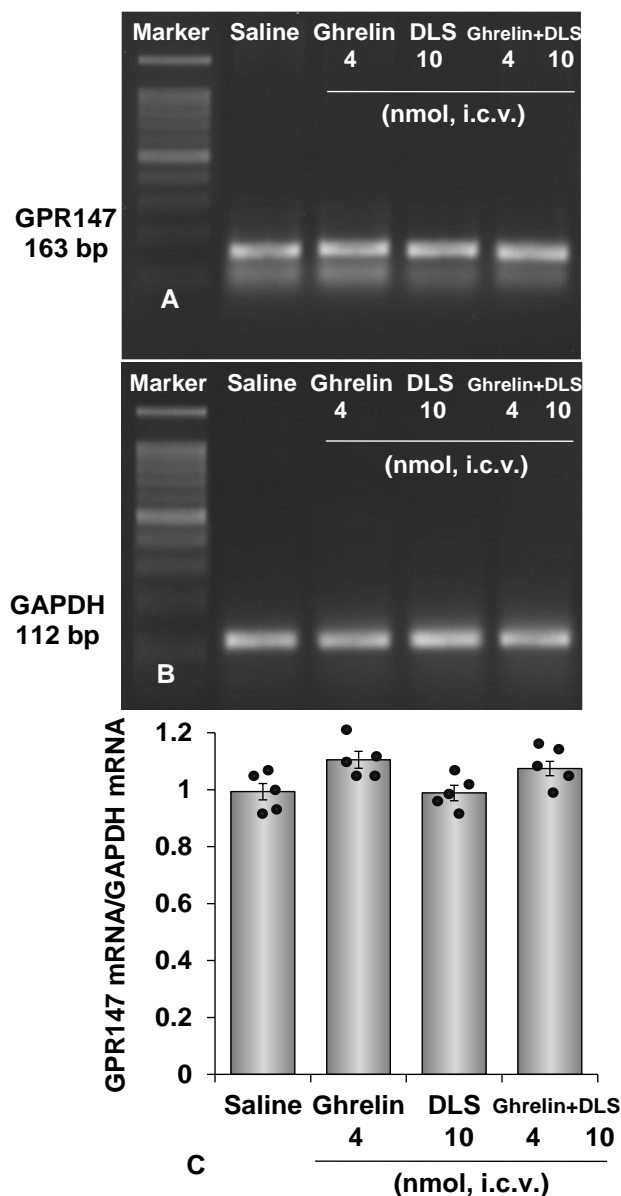
بیان هیپوتالاموسی GPR147 mRNA و GAPDH در موش‌های تحت درمان با DLS به ترتیب در شکل‌های A-۵ و B-۵ نشان داده شده است. بیان نسبی مقادیر کمی GPR147 به GAPDH در شکل C-۵ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تیمار با ۵، ۱۰ یا ۲۰ نانومول DLS بر بیان mRNA ژن GPR147 در مقایسه با گروه سالیین اثرات کاهشی کمی داشت، اما این تاثیر معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ).



شکل ۵- اثرات DLS بر محصولات آمپلیفیکاسیون PCR؛ A: سطوح بیان mRNA: GPR147؛ B: سطوح بیان mRNA: GAPDH و C: سطوح بیان GPR147 نسبت به GAPDH در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر ویستار. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین نمایش داده شده‌اند.

Figure 5- Effects of DLS on amplification products of PCR; A: GPR147, B: GAPDH mRNA expression levels, and C: the relative expression levels of GPR147 to GAPDH in hypothalamus of male Wistar rats. Data are represented as mean ± SEM.

بیان GPR147 mRNA و GAPDH در هیپوتالاموس موش‌هایی که هم‌زمان با ۴ نانومول گرلین و ۱۰ نانومول DLS تجویز شدند به ترتیب در شکل‌های ۶-A و ۶-B نشان داده شده است. بیان نسبی مقادیر کمی GPR147 به GAPDH در شکل ۶-C نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تزریق ۴ نانومول گرلین باعث افزایش سطح GPR147 mRNA در هیپوتالاموس شد، در حالی که تزریق ۱۰ نانومول DLS این پارامتر را کاهش داد. اما این اثرات معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ). تجویز هم‌زمان ۴ نانومول گرلین و ۱۰ نانومول DLS تغییری در سطح GPR147 mRNA در مقایسه با گروه سالیین اعمال نکرد ( $P > 0.05$ ).



شکل ۶- اثرات گرلین و DLS بر محصولات آمپلیفیکاسیون PCR؛ A: سطوح بیان mRNA GPR147، B: GAPDH و C: سطوح بیان نسبی GPR147 به GAPDH در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر ویستار. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار از میانگین نمایش داده شده‌اند.

Figure 6- Effects of ghrelin and DLS on amplification products of PCR; A: GPR147, GAPDH, B: mRNA expression levels and C: the relative expression levels of GPR147 to GAPDH in hypothalamus of male Wistar rats. Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

## ۵- بحث

وجود گیرنده‌های سکر تاگوگ هورمون رشد، GHS-R1a، در هسته پستی هیپوتالاموس (ناحیه حاوی نورون‌های بیان کننده RFRP-3) [13]، [27] نشان می‌دهد که GHS-R1a ممکن است از طریق سنتز و انتشار RFRP-3 در هیپوتالاموس، در تنظیم عملکرد تولیدمثل پستانداران نقش داشته باشد؛ بنابراین، در مطالعه حاضر، بررسی کردیم که آیا فعال شدن گیرنده‌های سکر تاگوگ هورمون رشد و سیستم گرلینرژیک می‌تواند بر بیان RFRP-3 و گیرنده‌های عملکردی آن GPR147 تاثیر داشته باشد یا خیر.

نتایج مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داد که آگونیست GHS-R1a، گرلین، به طور وابسته به غلظت میزان بیان mRNA ژن RFRP-3 را در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر افزایش داد. علاوه بر این، آنتاگونیست GHS-R1a، DLS، به طور وابسته به غلظت بیان mRNA ژن RFRP-3 را در هیپوتالاموس کاهش داد. هم‌چنین نشان داده شد که پیش تجویز بالاترین غلظت غیر موثر DLS به حیوانات دریافت کننده کمترین غلظت موثر گرلین از اثرات افزایشی گرلین بر بیان ژن RFRP-3 جلوگیری کرد. این نتایج نشان می‌دهد که گیرنده گرلین، GHS-R1a، احتمالاً در تنظیم سنتز RFRP-3 در هیپوتالاموس نقش دارد. با توجه به نقش مهم RFRP-3 در کنترل محور HPG [22]، [26]، در مطالعه حاضر، تغییرات مشاهده شده در بیان mRNA RFRP-3 می‌تواند مکانیسمی برای توجیه اثرات گرلین بر تولیدمثل پستانداران را پیشنهاد کند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که فعالیت GHS-R1a می‌تواند باعث پیدایش یک سیگنال احتمالی برای کمبود انرژی و اختلالات تولیدمثلی به دنبال محدودیت مزمن غذا یا تجویز گرلین شود [5]–[7]. اثر مهاری سیستم گرلینرژیک بر ترشح LH پایه و GnRH تحریک شده ثابت شده است [12]، [15]. هم‌چنین، تحریک گیرنده‌های گرلین باعث تاخیر در بلوغ در پستانداران می‌شود [34]. توزیع GHS-R1a در بافت‌های محور HPG نشان دهنده اثرات مستقیم گرلین بر عملکرد دستگاه تناسلی است [13]، [15]، [16]. بر اساس مطالعات قبلی، اثر مهاری گرلین بر محور تولیدمثل از طریق اثرات مستقیم بر نوروهای GnRH هیپوتالاموس [17] و گنادوتروف‌های هیپوفیز [32] میانجی‌گری می‌شود. علاوه بر این، نشان داده شده است که بیشتر اثرات گرلین و آنتاگونیست‌های آن مستقیماً از طریق تنظیم آزادسازی GnRH/LH [32] و متعاقباً ترشح استروئیدهای غدد جنسی است [10]، [35]. یکی از مهمترین پتیدهای تنظیم کننده آزادسازی GnRH/LH کیس پپتین می‌باشد که در تعامل مستقیم با RFRP-3 می‌باشد. کیس پپتین و RFRP-3 دو نوروپپتید اصلی در بالادست نوروهای GnRH هستند که ترشحات GnRH را تنظیم می‌کنند. کیس پپتین باعث تحریک و RFRP-3 باعث مهار نوروهای GnRH می‌شود. یک رابطه معکوس بین سطوح گرلین و بیان mRNA کیس پپتین، به عنوان یک نوروپپتید تنظیم کننده تولیدمثل، نشان داده شده است [36]، [37]. در مطالعه حاضر، اثر تنظیمی گرلین بر بیان mRNA ژن RFRP-3 آشکار شد؛ بنابراین، اثر سرکوبگر گرلین بر روی محور HPG به ترتیب با اثرات مهاری و تحریکی گرلین بر بیان کیس پپتین و RFRP-3 مطابقت دارد. اثرات غیرمستقیم گرلین بر روی سیستم تولیدمثل، به‌ویژه بر نوروهای تولیدکننده GnRH و نوروپپتیدهای تولیدمثلی بالادست آن‌ها از طریق تنظیم افزایشی نوروپپتید Y و پپتید مرتبط با Agouti (NPY/AgRP) [37]، [38]، تنظیم کاهشی پرواپوپولمانوکورتین و رونوشت تنظیم شده با کوکائین و آمفتامین (POMC/CART) [37] و برهم‌کنش با پتیدهای اوپیوئیدی [5] نیز گزارش شده است. پتیدهای NPY و POMC هماهنگ کننده‌های هومئوستاز انرژی هستند که وضعیت تغذیه را با نوروهای تولیدمثلی ارتباط می‌دهند [39]؛ بنابراین، به نظر می‌رسد که تنظیم افزایشی RFRP-3 به دنبال فعال‌سازی GHS-R1a احتمالاً در اعمال اثرات سرکوب کننده سیستم گرلینرژیک بر تولیدمثل نقش داشته باشد. RFRP-3 یک تنظیم کننده عصبی مهاری مهم سیستم GnRH/LH می‌باشد. این پیشنهاد با مطالعه قبلی که نشان می‌دهد تزریق گرلین یا محدودیت غذا واکنش‌پذیری c-fos (نشانه‌گری برای فعالیت عصبی) را در DMN هیپوتالاموس موش‌های وحشی اما نه در موش‌هایی با جهش‌های هدفمند ژن گیرنده گرلین افزایش می‌دهد، مطابقت دارد [27]. مطالعه حاضر نشان داد که تزریق آگونیست GHS-R1a، گرلین، به میزان قابل توجهی سطح mRNA RFRP-3 را بطور افزایشی تنظیم کرد و سطح mRNA GPR147 را به طور غیر معنی‌دار در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر بالغ افزایش داد. در همین حال، غلظت متوسط آنتاگونیست GHS-R1a، DLS، تاثیر قابل توجهی بر بیان هیپوتالاموسی mRNA RFRP-3 و GPR147 نداشت. پیش تجویز DLS به حیوانات دریافت کننده گرلین، از اثرات تقویت کننده گرلین بر بیان mRNA ژن RFRP-3 و GPR147 جلوگیری کرد. این مطالعه، اولین مطالعه‌ای است که نقش گیرنده‌های GHS-R1a را در تنظیم سیستم سیگنالینگ RFRP-3/GPR147 نشان می‌دهد. با این حال، نقش واسطه‌ای GHS-R1a در فعال‌سازی نوروهای DMN [27] و سرکوب ترشح LH پس از قرار گرفتن در معرض محدودیت غذایی قبلاً نشان داده شده است [17]، [18]. به این ترتیب، با توجه به توزیع گیرنده گرلین در نواحی از هیپوتالاموس که حاوی نوروهای RFRP-3 می‌باشد و اثرات موازی گرلین و RFRP-3 بر بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی، مانند دریافت غذا و محور تولیدمثل، نتایج حاضر پیشنهاد می‌کنند که سیستم گرلینرژیک احتمالاً در بالادست سیستم RFRP-3/GPR147 عمل می‌کند و از طریق تنظیم افزایشی این سیستم بر محور تولیدمثل تاثیر می‌گذارد. هم‌چنین، این مطالعه پیشنهاد می‌کند که احتمالاً گیرنده‌های GHS-R1a در تنظیم بیان ژن‌های RFRP-3 و GPR147 هیپوتالاموس، حداقل در موش‌های صحرایی نر نقش دارند.

## ۶- نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، در یک تیمار حاد با گرلین، احتمال دارد GHS-R1a نقش تحریکی در بیان ژن RFRP-3 هیپوتالاموس بدون هیچ گونه تاثیر قابل توجهی بر سطح mRNA ژن GPR147 داشته باشد. عدم امکان تهیه حیوانات تراریخته که در آن‌ها گیرنده GHS-R1a حذف یا تشدید بیان یافته باشد، محدودیت این پژوهش بود. بر این اساس پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی، به منظور شناسایی دقیق تر نقش GHS-R1a

در سیستم تولیدمثل، علاوه بر استفاده از حیوانات تراریخته، بیان RFRP-3/GPR147 در سطح پروتئین و حتی به‌طور خاص، در DMN هیپوتالاموس مورد بررسی قرار گیرد. علاوه بر این، بررسی اثرات سایر آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های گیرنده GHS-R1a بر سنتز و آزادسازی نوروپپتیدهای بالادست GnRH/LH، از جمله RFRP-3 و گیرنده‌های آن نیز پیشنهاد می‌شود.

### سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه برای حمایت مالی از این پژوهش قدردانی می‌نمایند. این پژوهش بر اساس نتایج طرح پژوهشی شماره D10/2685 مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه تهیه شده است.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافع مالی یا غیر مالی مرتبطی برای افشا ندارند.

### تأییدیه اخلاق

در این مطالعه، نگهداری و استفاده از روش‌های حیوانی مطابق با اصول اعلامیه هلسینکی و تأیید شده توسط کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیستی دانشگاه ارومیه برای استفاده اخلاقی از حیوانات آزمایشگاهی (12/28/2022/IR-UU-AEC-3/53) انجام شد.

### منابع

- [1] Ishida, J., Saitoh, M., Ebner, N., Springer, J., Anker, S. D., & von Haehling, S. (2020). Growth hormone secretagogues: history, mechanism of action, and clinical development. *JCSM rapid communications*, 3(1), 25–37.
- [2] Broglio, F., Arvat, E., Gottero, C., Benso, A., Prodram, F., & Destefanis, S. (2003). Natural and synthetic growth hormone secretagogues: do they have therapeutic potential? *Treatments in endocrinology*, 2, 153–163.
- [3] Du, A., Li, N., Li, Z., Shen, R., Li, N., & Zhou, Y. (2022). GHS-R1a activity suppresses synaptic function of primary cultured hippocampal neurons. *Biochemical and biophysical research communications*, 602, 91–97.
- [4] Navarro, G., Aguinaga, D., Angelats, E., Medrano, M., Moreno, E., & Mallol, J. (2016). A significant role of the truncated ghrelin receptor GHS-R1b in ghrelin-induced signaling in neurons. *Journal of biological chemistry*, 291(25), 13048–13062.
- [5] Howick, K., Griffin, B. T., Cryan, J. F., & Schellekens, H. (2017). From belly to brain: targeting the ghrelin receptor in appetite and food intake regulation. *International journal of molecular sciences*, 18(2), 273. <https://doi.org/10.3390/ijms18020273>
- [6] Lv, Y., Liang, T., Wang, G., & Li, Z. (2018). Ghrelin, a gastrointestinal hormone, regulates energy balance and lipid metabolism. *Bioscience reports*, 38(5), BSR20181061. <https://doi.org/10.1042/BSR20181061>
- [7] Abizaid, A., & Horvath, T. L. (2012). Ghrelin and the central regulation of feeding and energy balance. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 16(Suppl 3), S617–S626.
- [8] Sominsky, L., Hodgson, D. M., McLaughlin, E. A., Smith, R., Wall, H. M., & Spencer, S. J. (2017). Linking stress and infertility: a novel role for ghrelin. *Endocrine reviews*, 38(5), 432–467.
- [9] Seidel, M., Markmann Jensen, S., Healy, D., Dureja, A., Watson, H. J., Holst, B., ... & Sjögren, J. M. (2021). A systematic review and meta-analysis finds increased blood levels of all forms of ghrelin in both restricting and binge-eating/purging subtypes of anorexia nervosa. *Nutrients*, 13(2), 709. <https://doi.org/10.3390/nu13020709>
- [10] Dutta, S., Biswas, A., Sengupta, P., & Nwagha, U. (2019). Ghrelin and male reproduction. *Asian pacific journal of reproduction*, 8(5), 227–232.
- [11] Poterasu, M., Rowland, D. L., Ciobanu, C., & Fica, S. (2020). Anorexia nervosa and reproduction: connecting brain to gonads. *Journal of mind and medical sciences*, 7(1), 1–8.
- [12] Ogata, R., Matsuzaki, T., Iwasa, T., Kiyokawa, M., Tanaka, N., Kuwahara, A., ... & Irahara, M. (2009). Hypothalamic ghrelin suppresses pulsatile secretion of luteinizing hormone via  $\beta$ -endorphin in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*, 90(4), 364–370.
- [13] Miller, D. W., Harrison, J. L., Brown, Y. A., Doyle, U., Lindsay, A., Adam, C. L., & Lea, R. G. (2005). Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep. *Reproductive biology and endocrinology*, 3, 1–14.
- [14] Vulliémoz, N. R., Xiao, E., Xia-Zhang, L., Germond, M., Rivier, J., & Ferin, M. (2004). Decrease in luteinizing hormone pulse frequency during a five-hour peripheral ghrelin infusion in the ovariectomized rhesus monkey. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, 89(11), 5718–5723.

- [15] Motta, G., Allasia, S., Ghigo, E., & Lanfranco, F. (2016). Ghrelin actions on somatotrophic and gonadotropic function in humans. *Progress in molecular biology and translational science*, 138, 3–25.
- [16] Airapetov, M. I., Eresko, S. O., Lebedev, A. A., Bychkov, E. R., & Shabanov, P. D. (2021). Expression of the growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a) in the brain. *Physiological reports*, 9(21), e15113. <https://doi.org/10.14814/phy2.15113>
- [17] Yamada, C. (2021). Relationship between orexigenic peptide ghrelin signal, gender difference and disease. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3763. <https://doi.org/10.3390/ijms22073763>
- [18] Carranza-Martín, A. C., Nikoloff, N., Anchordoquy, J. P., Anchordoquy, J. M., Relling, A. E., & Furnus, C. C. (2021). Ghrelin antagonist D-Lys3-GHRP-6 counteract ghrelin effects in bovine cumulus-oocytes complexes matured in vitro. *Reproduction in domestic animals*, 56(9), 1235–1242.
- [19] Rasineni, K., Kubik, J. L., Casey, C. A., & Kharbanda, K. K. (2019). Inhibition of ghrelin activity by receptor antagonist [d-Lys-3] GHRP-6 attenuates alcohol-induced hepatic steatosis by regulating hepatic lipid metabolism. *Biomolecules*, 9(10), 517. <https://doi.org/10.3390/biom9100517>
- [20] Maletínská, L., Matyšková, R., Maixnerová, J., Sýkora, D., Pýchová, M., Špolcová, A., ... & Železná, B. (2011). The Peptidic GHS-R antagonist [D-Lys3] GHRP-6 markedly improves adiposity and related metabolic abnormalities in a mouse model of postmenopausal obesity. *Molecular and cellular endocrinology*, 343(1-2), 55-62.
- [21] Gomez, J. L., & Ryabinin, A. E. (2014). The Effects of ghrelin antagonists [D-L ys3]-GHRP-6 or JMV 2959 on ethanol, water, and food Intake in C57BL/6J Mice. *Alcoholism: clinical and experimental research*, 38(9), 2436–2444.
- [22] Mamgain, A., Sawyer, I. L., Timajo, D. A. M., Rizwan, M. Z., Evans, M. C., Ancel, C. M., ... & Anderson, G. M. (2021). RFamide-related peptide neurons modulate reproductive function and stress responses. *Journal of neuroscience*, 41(3), 474–488.
- [23] Mohapatra, S. S., Mukherjee, J., Banerjee, D., Das, P. K., Ghosh, P. R., & Das, K. (2021). Rfamides peptides, the novel regulators of mammalian HPG axis: A review. *Veterinary world*, 14(7), 1867. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8404114/>
- [24] Johnson, M. A., Tsutsui, K., & Fraley, G. S. (2007). Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Hormones and behavior*, 51(1), 171–180.
- [25] Singh, P., Anjum, S., Srivastava, R. K., Tsutsui, K., & Krishna, A. (2022). Central and peripheral neuropeptide RFRP-3: a bridge linking reproduction, nutrition, and stress response. *Frontiers in neuroendocrinology*, 65, 100979. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2022.100979>
- [26] Hu, K. L., Chang, H. M., Li, R., Yu, Y., & Qiao, J. (2019). Regulation of LH secretion by RFRP-3--From the hypothalamus to the pituitary. *Frontiers in neuroendocrinology*, 52, 12–21.
- [27] Blum, I. D., Patterson, Z., Khazali, R., Lamont, E. W., Sleeman, M. W., Horvath, T. L., & Abizaid, A. (2009). Reduced anticipatory locomotor responses to scheduled meals in ghrelin receptor deficient mice. *Neuroscience*, 164(2), 351–359.
- [28] Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Academic Press.
- [29] Kamvar, M., Mahmoudi, F., Mohammadzadeh, F., Khazali, H., & Bayrami, A. (2022). The Effects of 5-hydroxytryptamine and interaction with kisspeptin in controlling ghrelin and adiponectin secretion. *International journal of basic science in medicine*, 7(2), 77-81. **(In Persian)**. <https://ijbsm.zbmu.ac.ir/Article/ijbsm-23550>
- [30] Lewis, M. J., Johnson, D. F., Waldman, D., Leibowitz, S. F., & Hoebel, B. G. (2004). Galanin microinjection in the third ventricle increases voluntary ethanol intake. *Alcoholism: clinical and experimental research*, 28(12), 1822–1828.
- [31] Hashimoto, H., Fujihara, H., Kawasaki, M., Saito, T., Shibata, M., Otsubo, H., ... & Ueta, Y. (2007). Centrally and peripherally administered ghrelin potently inhibits water intake in rats. *Endocrinology*, 148(4), 1638–1647.
- [32] Babaei-Balderlou, F., & Khazali, H. (2016). Effects of ghrelin on sexual behavior and luteinizing hormone beta-subunit gene expression in male rats. *Journal of reproduction & infertility*, 17(2), 88-96. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4842239/>
- [33] Iwasa, T., Matsuzaki, T., Murakami, M., Kinouchi, R., Osugi, T., Gereltsetseg, G., ... & Tsutsui, K. (2012). Developmental changes in the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) ortholog RFamide-related peptide (RFRP) and its cognate receptor GPR147 in the rat hypothalamus. *International journal of developmental neuroscience*, 30(1), 31–37.
- [34] Rodríguez-Vázquez, E., Tena-Sempere, M., & Castellano, J. M. (2020). Mechanisms for the metabolic control of puberty. *Current opinion in endocrine and metabolic research*, 14, 78-84.
- [35] Sirotkin, A. V., Meszarošová, M., Grossmann, R., Benčo, A., & Valenzuela, F. (2011). Effect of inhibitor and activator of ghrelin receptor (GHS-R1a) on porcine ovarian granulosa cell functions. *General and comparative endocrinology*, 173(1), 105–110.
- [36] Forbes, S., Li, X. F., Kinsey-Jones, J., & O'Byrne, K. (2009). Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. *Neuroscience letters*, 460(2), 143–147.
- [37] De Bond, J. A., & Smith, J. T. (2014). Kisspeptin and energy balance in reproduction. *Reproduction*, 147(3), R53--R63.
- [38] Kohno, D., Gao, H.-Z., Muroya, S., Kikuyama, S., & Yada, T. (2003). Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca<sup>2+</sup> signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes*, 52(4), 948–956.
- [39] McIlwraith, E. K., & Belsham, D. D. (2020). Hypothalamic reproductive neurons communicate through signal transduction to control reproduction. *Molecular and cellular endocrinology*, 518, 110971. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110971>