Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۵ (۱)، ۹۰-۹۶
بهار ۱۳۹۰

بیان هورمون مهارکننده گونادوتروپین در ناحیه پیش‌بینایی و رابطه آن با گامه‌های چرخه فحلی میش

محمد رضا جعفرزاده شیرازی[۱]، محمد رضا نام‌آور[۲]، امین تمدن[۳*]

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز

۲. گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات هیستومورفومتری و استریولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

۳. بخش مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانس‌ژنیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

دریافت: ۲۶ مهر ۸۹ پذیرش: ۱ دی ۸۹

چکیده

مقدمه: هورمون مهار کننده گونادوتروپین[۱] (GnIH) به عنوان شناخته شده‌ترین سازه مهارکننده ترشح هورمون آزاد کننده گونادوتروپین[۲] (GnRH) شناخته شده است. چرخه فحلی میش دارای دو گامه فولیکولی و لوتئال است و گامه فولیکولی نیز دارای دو مرحله استروس و پرواستروس است. غلظت خونی LH در گامه فولیکولی افزایش و در گامه لوتئال کاهش می‌یابد. هدف مطالعه حاضر بررسی (۱) حضور نورون‌های GnIH در ناحیه پیش‌بینایی[۳] (POA) میش و (۲) تغییرات بیان GnIH در طول گامه‌های چرخه فحلی میش بود.

روش ها: سه میش بارور سه ساله در سه مرحله چرخه فحلی (n=۹) انتخاب شدند و تعداد نورون‌های GnIH در سه مرحله چرخه فحلی با استفاده از روش ایمیونوهیستوشیمی تعیین شد.

یافته ها: نورون‌های GnIH در ناحیه POA در هر سه مرحله چرخه فحلی حضور داشتند. تعداد نورون‌های GnIH به طور معنی‌داری در گامه لوتئال در مقایسه با مرحله پرواستروس بیشتر بود (P=۰/۰۰۱).

نتیجه گیری: در گامه لوتئال بیان نورون‌های GnIH در POA گوسفند بیشتر از گامه فولیکولی بود که می‌تواند عامل مهار ترشح GnRH در ناحیه POA و کاهش ترشح LH در گامه لوتئال باشد.

واژه‌های کلیدی: هورمون مهار کننده گونادوتروپین، چرخه فحلی، ناحیه پیش‌بینایی، میش

مقدمه

اعتقاد بر این است که تنظیم کننده اصلی ترشح هورمون-های لوتئینی کننده[۳] (LH) و تحریک کننده فولیکول[۴] (FSH)، هورمون آزادکننده گونادوتروپین (GnRH) است. پپتیدی دیگر به نام هورمون مهار کننده گونادوتروپین (GnIH) یک پپتید دوازده اسید آمینه‌ای از خانواده پپتیدهای آر- اف آمید[۵] (آرژنین

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: tamadon@shirazu.ac.ir

وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

1. Gonadotropin inhibitory hormone
2. Gonadotropin releasing hormone
3. Preoptic area
4. Luteinizing hormone
5. Follicle stimulating hormone
6. RFamide peptide

www.SID.ir

Archive of SID

ـ فنیل‌آلانین) است، نخستین بار در سیستم هیپوتالاموس ـ هیپوفیزی بلدرچین شناسایی شد [۱۶]. این پپتید به دلیل اثر مهاری در سنتز و ترشح گونادوتروپین‌ها به نام GnIH خوانده شد [۲۱]. با کشف این هورمون، مسیر جدیدی در فهم فیزیولوژی تولیدمثل گشوده شد. GnIH پرندگان می‌تواند آزاد شدن LH در همستر را مهار کند [۱۰] و پپتید وابسته به آرژنین ـ فنیل‌آلانین ـ آمید[1] (RFRP) آزاد شدن LH در انسان [۱۹] و گوسفند [۵] را مهار می‌کند. بنابراین GnIH پرندگان و RFRP پستانداران هم از لحاظ ساختاری و هم عملکردی مشابه هستند [۱, ۳, ۱۸]. نورون‌های GnIH در هسته دور بطنی[2] (PVN) هیپوتالاموس پرندگان [۱۷] و هسته پشتی ـ میانی[3] (DMH) هیپوتالاموس همستر، موش صحرایی و موش جایابی شده است [۲, ۱۰]. به نظر می‌رسد که ارتباطی بین آکسون نورون‌های GnIH با نورون‌های GnRH در ناحیه پیش‌بینایی (POA) پرندگان و پستانداران وجود دارد [۲, ۱۰, ۱۵]. در جوندگان این نورون‌ها با نواحی لیمبیک[4] و هسته‌های قدامی و کمانی هیپوتالاموس نیز ارتباط دارند [۱۰]. در چرخه فحلی گوسفند دو گامه فولیکولی و لوتئال وجود دارد. در گامه فولیکولی که شامل مراحل پرواستروس و استروس می‌باشد، ترشح LH افزایش یافته و سرانجام به آزاد شدن ناگهانی هورمون LH و تخمک‌ریزی می‌انجامد. در گامه لوتئال، تحت تاثیر بازخورد منفی پروژسترون، ترشح LH کاهش می‌یابد [۴]. با توجه به این که GnIH در گوسفند به عنوان مهارکننده ترشح GnRH مطرح است و تجمع نورون‌های GnRH در ناحیه POA بالا است، لذا، هدف این تحقیق جایابی نورون‌های GnIH در ناحیه POA گوسفند و بررسی تغییرات ترشحی آن در گامه‌های چرخه تولیدمثلی گوسفند بود.

مواد و روش ها

نه راس میش بارور با وزن تقریبی ۴۰ کیلوگرم و سن سه سال، پس از انتخاب در فصل جفت‌گیری در شرایط مشابه محیطی و تغذیه‌ای نگهداری شدند. میش‌ها بر اساس غلظت پلاسمایی پروژسترون (P_4) و LH [۴]، در ۳ گروه سه تایی شامل گامه لوتئال و مراحل پرواستروس و استروس قرار گرفتند. غلظت P_4 در گامه لوتئال ۳/۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر و غلظت LH در گامه لوتئال و مراحل پرواستروس و استروس به ترتیب ۱/۰، ۱/۴ و ۵۱/۴ نانوگرم بر میلی‌لیتر بود. به هر میش دو تزریق هپارین به میزان ۲۵۰۰۰ واحد با فاصله ۱۰ دقیقه انجام شد. بلافاصله بعد از تزریق هپارین، میش‌ها با تزریق سدیم پنتوباربیتال در سرخرگ کاروتید کشته شدند و سرهای آنها با ۶ لیتر پارافرمالدهاید ۴٪ در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷/۴) دارای هپارین (۱۰ واحد بر میلی‌لیتر) پرفیوژ شدند. پس از بیرون آوردن مغز، ناحیه حاوی POA جدا شده و در محلول سوکروز ۳۰٪ (زیگما آلدریچ، آمریکا) قرار داده شد. بافت POA با روشی که توسط اسمیت و همکاران [۱۳] شرح داده شده است، جمع‌آوری و آماده‌سازی شد. قطعه‌های کورونال یخ زده، با ضخامت ۵۰ میکرومتر با میکروتوم (کرایواستت، لایکا، آلمان) برش داده شدند و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد، در محلول دارای ماده حفاظت کننده از یخزدگی[5] نگهداری گردید. برای بررسی ایمیونوهیستوشیمی که با روش استاندارد انجام شد [۱۴]، برش‌هایی از POA انتخاب و روی اسلاید میکروسکوپی تثبیت شدند. برش‌های بافت به منظور بازیابی آنتی‌ژنی با محلول ۰/۰۵ مولار فسفات بافر سالین دو بار و به مدت ۵ دقیقه در اجاق میکروویو (۲×۵ دقیقه) و سپس ۲۰ دقیقه برای خنک شدن، شسته شدند. سپس برش‌ها در سرم بلوک کننده حاوی تریتون ایکس ـ۱۰۰[6] ۰/۳٪ و سرم نرمال بز ۱۰٪ محلول در فسفات بافر سالین ۰/۱ مولار قرار گرفتند. سپس برش‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در مرحله بعد، آنتی‌بادی پلی‌کلنال علیه GnIH (۱:۱۰۰۰) که علیه RFRP در بز تولید شده است (Vector Laboratories، آمریکا) اضافه و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. برش‌ها ابتدا با محلول فسفات بافر سالین ۰/۰۵ مولار شسته شده و سپس آنتی‌بادی ثانویه علیه خرگوش

1. Arginine-phenylalanine-amide-related peptide
2. Paraventricular nucleus
3. Dorsomedial nucleus
4. Limbic regions
5. Cryoprotectant
6. Triton X-100

www.SID.ir

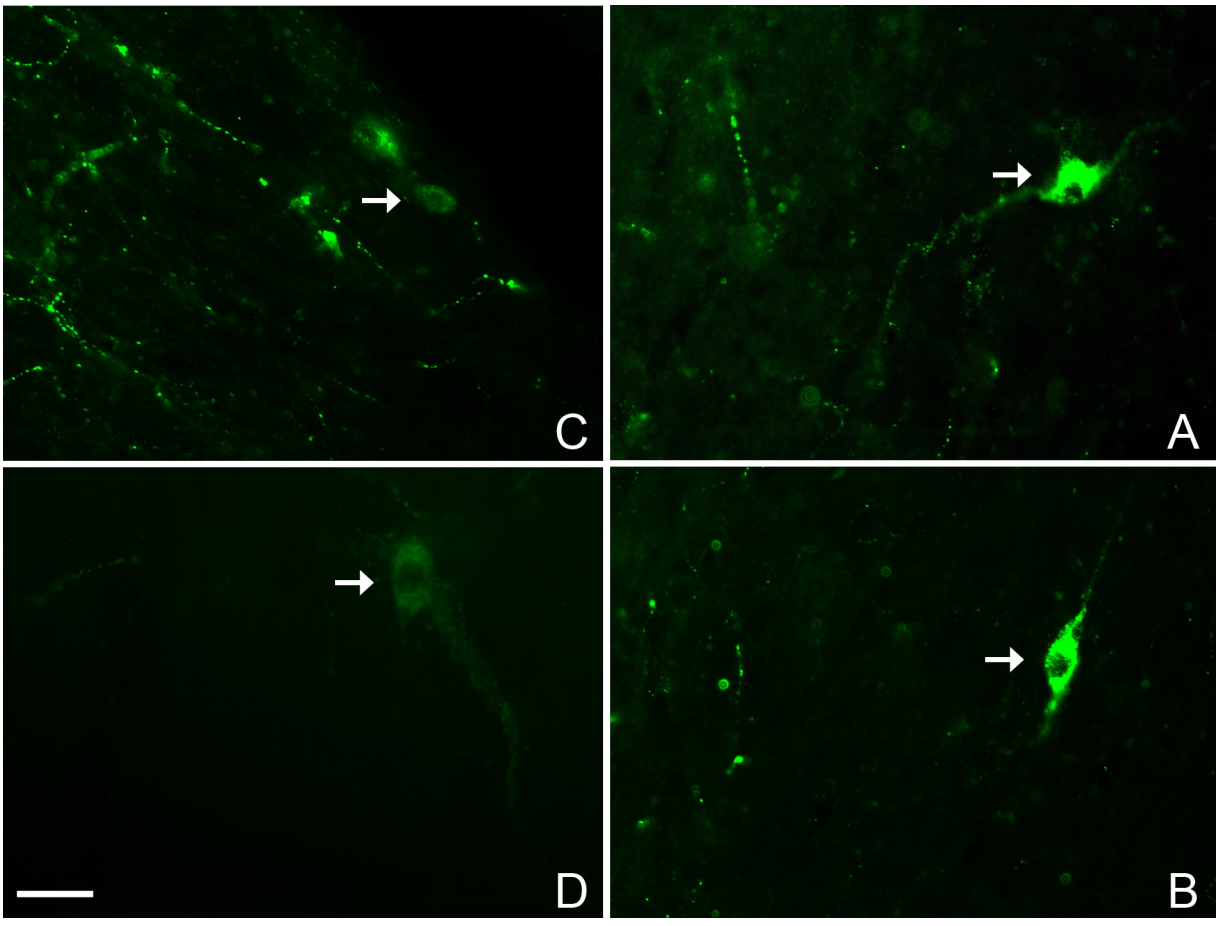
Archive of SID

(Vector Laboratories؛۱:۲۵۰، آمریکا) به مدت ۱ ساعت اضافه شد. بعد از اینکه نمونه‌ها با محلول فسفات بافر سالین ۰/۰۵ مولار شسته شدند، برش‌ها به مدت ۱ ساعت در استرپتوویدین ـ تگزاس رد (۱:۲۵۰؛ Jackson Laboratories، آمریکا) انکوبه شدند. بعد از شستشو، اسلایدها در زیر میکروسکوپ کنترل شدند و سپس با محلول تثبیت کننده ضد کمرنگ شدگی (Antifade) ماده فلورسنت (داکو، آمریکا) پوشانیده شدند. برای کنترل منفی آزمایش، آنتی‌بادی اولیه حذف و بقیه مراحل ایمیونوهیستوشیمی تکرار شد. مراحل نمونه‌برداری و آماده سازی در مزرعه وری‌بی دانشگاه موناش استرالیا و ارزیابی نمونه ها بعد از انتقال در دانشگاه شیراز انجام شد. کلیه مراحل پژوهش تحت نظارت کمیته مراقبت و استفاده از حیوانات دانشگاه موناش انجام شد. در هر برش POA، نورون‌های واکنش دهنده ایمنی GnIH با میکروسکوپ فلورسنت (زایس، آمریکا) شمارش شدند. آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) انجام شد. مقایسه میانگین به روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح خطای ۵ درصد صورت گرفت (نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱/۵).

یافته ها

در شکل ۱ حضور نورون‌های بیان کننده GnIH در POA میش‌ها، در مرحله استروس (A و B) و گامه لوتئال (C و D) نشان داده است. تعداد نورون‌های بیان کننده GnIH در گامه لوتئال و مراحل استروس و پرواستروس در شکل ۲ نشان داده شده است.

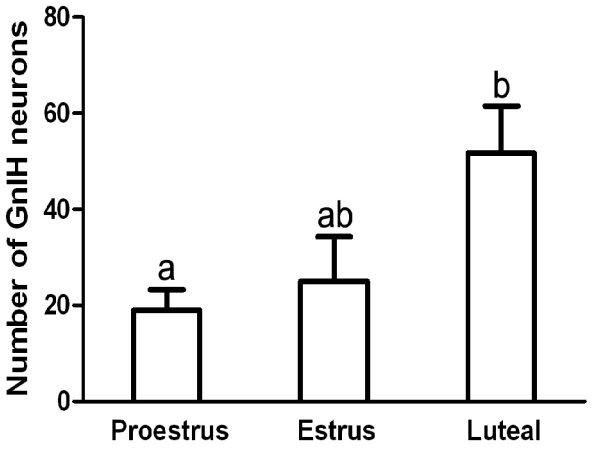
تعداد نورون‌های بیان کننده GnIH در گامه لوتئال به طور معنی‌داری بیشتر از مرحله پرواستروس بود ($P<۰/۰۰۱$). علی‌رغم بیشتر بودن تعداد نورون‌های GnIH در گامه لوتئال از



شکل ۱–نمونه‌ای از نورون‌های بیان کننده GnIH (پیکان) در مرحله استروس (A و B) و گامه لوتئال (C و D) چرخه فحلی در هسته پیش‌بینایی میش. به طور کلی شمار نورونهای بیان کننده GnIH در هسته پیش‌بینایی هیپوتالاموس میش بسیار کم است. شاخص ۱۵ میکرومتر است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- اثر مرحله‌های چرخه فحلی بر تعداد نورون‌های بیان کننده GnIH در هسته پیش‌بینایی در سه گروه میش (n=۳). میانگین و خطای استاندارد با حروف غیرمشابه نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

مرحله استروس و همچنین، تعداد نورون‌های GnIH در مرحله استروس از مرحله پرواستروس، اختلاف آماری معنی‌داری نبود (به ترتیب P=۰/۰۷ و P=۰/۵۵).

بحث

نتایج مطالعه حاضر برای نخستین بار حضور نورون‌های بیان کننده GnIH در POA میش را نشان داد. پیش از این فقط وجود رشته‌های نورون‌های GnIH/RFRP در POA در پرندگان [۲۰, ۲۳]، موش [۶] و موش صحرایی [۸] نشان داده شده بود. بیان نورون‌های بیان کننده GnIH/RFRP در پرندگان در PVN [۲, ۱۷]، در موش و موش صحرایی در DMH [۱۰] و در همستر در DMH و ناحیه‌ای بین هسته شکمی ـ میانی[1] DMH [۱۰, ۱۱] نشان داده شده است. بدنه و رشته‌های سلول‌های بیان کننده RFRP در مغز موش در نواحی که مرتبط با تغذیه، درد و سیستم شنوایی است، پراکنده شده‌اند [۲۲].

اگرچه RFRP در پستانداران و GnIH در پرندگان مشابه هستند اما در پرندگان GnIH اثر خود را از راه هیپوفیز و مهار آزاد شدن گونادوتروپین‌ها می‌گذارد اما این ترکیب در پستانداران در POA اثر خود را با واسطه نورون‌های GnRH می‌گذارد [۱۱]. حضور هر دو این نورون‌ها در POA گوسفند نشان دهنده اثر احتمالی اتوکراین ـ پاراکراین نورون‌های GnIH بر نورون‌های GnRH می‌باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان GnIH در POA میش در گامه فولیکولی کاهش و در گامه لوتئال افزایش می‌یابد. مطالعات پیشین در میش نشان داد که پالس-های ترشح LH در گامه فولیکولی افزایش و در گامه لوتئال چرخه فحلی کاهش می‌یابد [۴]. همچنین، پالس‌های ترشح LH در فصل تولیدمثل افزایش و در فصل غیرتولیدمثل کاهش می‌یابد و سلول‌های بیان کننده GnIH در فصل تولید مثل نسبت به فصل غیرتولیدمثلی کاهش می‌یابد [۱۲]. نشان داده شده است که غلظت پلاسمایی LH با تزریق GnIH در گاو کاهش می‌یابد [۹]. مطالعات در همستر نشان دهنده کاهش تعداد سلول‌های بیان کننده RFRP در زمان افزایش ناگهانی LH می‌باشد [۷].

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در گامه لوتئال بیان نورون‌های GnIH در ناحیه پیش‌بینایی گوسفند بیشتر از گامه فولیکولی می‌باشد که این می‌تواند عاملی برای کاهش ترشح LH در مرحله لوتئال باشد. نتایج این مطالعه می‌تواند راهکاری برای ارائه روش‌های درمانی جدید در ناباروری دام های اهلی و سایر پستانداران از جمله انسان باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از همکاری کارمندان مزرعه وری‌بی دانشگاه موناش استرالیا سپاسگزاری می‌کنند.

1. Ventromedial nucleus

www.SID.ir

Archive of SID

References

[1] Bentley GE, Ubuka T, McGuire NL, Calisi R, Perfito N, Kriegsfeld LJ, Wingfield JC, Tsutsui K, Gonadotrophin-Inhibitory Hormone: A Multifunctional Neuropeptide. ***J Neuroendocrinol*** 21 (2009) 276-281.

[2] Calisi RM, Rizzo NO, Bentley GE, Seasonal differences in hypothalamic EGR-1 and GnIH expression following capture-handling stress in house sparrows (Passer domesticus). ***Gen Comp Endocrinol*** 157 (2008) 283-287.

[3] Clarke IJ, Qi Y, Puspita Sari I, Smith JT, Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. ***Front Neuroendocrinol*** 30 (2009) 371-378.

[4] Cumming IA, Brown JM, Goding JR, Bryant GD, Greenwood FC, Secretion of prolactin and luteinizing hormone at oestrus in the ewe. ***J Endocrinol*** 54 (1972) 207-213.

[5] Dardente H, Birnie M, Lincoln GA, Hazlerigg DG, RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod. ***J Endocrinol*** 20 (2008) 1252-1259.

[6] Ducret E, Anderson GM, Herbison AE, RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. ***Endocrinology*** 150 (2009) 2799-2804.

[7] Gibson EM, Humber SA, Jain S, Williams WP, Zhao S, Bentley GE, Tsutsui K, Kriegsfeld LJ, Alterations in RFamide-related peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge. ***Endocrinology*** 149 (2008) 4958-4969.

[8] Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS, Rat RFamide Related Peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. ***Horm Behav*** 51 (2007) 171-180.

[9] Kadokawa H, Shibata M, Tanaka Y, Kojima T, Matsumoto K, Oshima K, Yamamoto N, Bovine C-terminal octapeptide of RFamide-related peptide-3 suppresses luteinizing hormone (LH) secretion from the pituitary as well as pulsatile LH secretion in bovines. ***Domest Anim Endocrinol*** 36 (2009) 219-224.

[10] Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R, Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 103 (2006) 2410-2415.

[11] Revel FG, Saboureau M, Pevet P, Simonneaux V, Mikkelsen JD, RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. ***Endocrinology*** 149 (2008) 902-912.

[12] Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadeh Shirazi MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T, Bentley GE, Clarke IJ, Lehman MN, Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: A novel medium for seasonal breeding in the sheep. ***Endocrinology*** 149 (2008) 5770-5782.

[13] Smith JT, Li Q, Pereira A, Clarke IJ, Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. ***Endocrinology*** 150 (2009) 5530-5538.

[14] Smith JT, Li Q, Pereira A, Clarke IJ, Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. ***Endocrinology*** 150 (2009) 5530-5538.

[15] Tsutsui K, A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. ***Prog Neurobiol*** 88 (2009) 76-88.

[16] Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ, A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. ***Biochem Biophys Res Commun*** 275 (2000) 661-667.

[17] Tsutsui K, Saigoh E, Yin H, Ubuka T, Chowdhury VS, Osugi T, Ukena K, Sharp PJ, Wingfield JC, Bentley GE, A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotrophin-inhibitory hormone in birds: discovery, progress and prospects. ***J Neuroendocrinol*** 21 (2009) 271-275.

[18] Tsutsui K, Ubuka T, Yin H, Osugi T, Ukena K, Bentley GE, Ciccone N, Inoue K, Chowdhury VS, Sharp PJ, Wingfield JC, Mode of action and functional significance of avian gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): a review**.** ***J Exp Zool A Comp Exp Biol*** 305A (2006) 801-806.

www.SID.ir

Archive of SID

[19] Ubuka T, Morgan K, Pawson AJ, Osugi T, Chowdhury VS, Minakata H, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE, Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. ***PLoS ONE*** 4 (2009) e8400.

[20] Ubuka T, Ueno M, Ukena K, Tsutsui K, Developmental changes in gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (Coturnix japonica) hypothalamo-hypophysial system. ***J Endocrinol*** 178 (2003) 311-318.

[21] Ubuka T, Ukena K, Sharp PJ, Bentley GE, Tsutsui K, Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail. ***Endocrinology*** 147 (2006) 1187-1194.

[22] Ukena K, Iwakoshi E, Minakata H, Tsutsui K, A novel rat hypothalamic RFamide-related peptide identified by immunoaffinity chromatography and mass spectrometry. ***FEBS Letters*** 512 (2002) 255-258.

[23] Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K, Distribution of a novel avian gonadotropin-inhibitory hormone in the quail brain. ***Cell Tissue Res*** 312 (2003) 73-79.

www.SID.ir