Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۵ (۲)، ۲۰۱ – ۲۰۹
تابستان ۱۳۹۰

هم بیانی هورمون مهار کننده گنادوتروپین با پپتید وابسته به آگوتی در نورون‌های هسته کمانی میش

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

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

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

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

دریافت: ۳ آذر ۸۹ پذیرش: ۱۸ اسفند ۸۹

چکیده

مقدمه: هورمون مهار کننده گونادوتروپین (GnIH، Gonadotropin inhibitory hormone) و پپتید وابسته به آگوتی (AgRP، Agouti-related peptide) دو نوروپپتید محرک اشتها هستند که در نورون‌های هسته کمانی (Arc، Aracuate nucleus) هیپوتالاموس میش بیان می‌شوند. همچنین اثرات GnIH و AgRP در کاهش ترشح هورمون محرک گونادوتروپین در برخی پستانداران روشن شده است. هدف مطالعه حاضر بررسی هم بیان شدن نورون‌های GnIH و AgRP در Arc هیپوتالاموس میش بود.

روش ها: نه راس میش به گروه‌های فولیکولی، لوتئال و تخمدان برداری شده (n=۳) تقسیم شدند و تعداد نورون‌های بیان کننده GnIH و AgRP و درصد هم بیان شدن این دو پپتید در Arc هر گروه با روش ایمیونوهیستوشیمی تعیین شد.

یافته ها: ۱۹ تا ۳۲٪ از نورون‌های AgRP و GnIH در Arc هیپوتالاموس در حالت‌های مختلف تخمدانی میش با هم بیان شدند.

نتیجه گیری: یافته‌های مطالعه حاضر نقش مشترک احتمالی AgRP و GnIH در Arc هیپوتالاموس را در کنترل فعالیت‌های تخمدانی میش نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: هورمون مهار کننده گونادوتروپین، پپتید وابسته به آگوتی، هسته کمانی، میش

مقدمه

هورمون مهار کننده گونادوتروپین (GnIH، Gonadotropin inhibitory hormone) یک ترکیب دوازده پپتیدی از خانواده پپتیدهای آر ـ اف آمید (آرژنین ـ فنیل‌آلانین) (RFamide peptide) است که نخستین بار در سیستم هیپوتالاموس ـ هیپوفیزی بلدرچین شناسایی شد [۲۴]. این پپتید به دلیل اثر مهاری در سنتز و ترشح گونادوتروپین‌ها به نام GnIH خوانده شد [۲۸]. نورون‌های GnIH در هسته اطراف بطنی (Paraventricular nucleus) و سایر نواحی هیپوتالاموس پرندگان قرار دارند [۲۵]. ارتباط بین آکسون نورون‌های GnIH با نورون‌های GnRH در پرندگان و پستانداران نشان داده شده است [۳, ۱۵]. پپتید GnIH باعث کاهش ترشح هورمون آزاد کننده گونادوتروپین (GnRH، Gonadotropin releasing hormone) می‌شود.

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: namavarm@sums.ac.ir

وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

www.SID.ir

Archive of SID

در پستانداران [۲۷] و از آن جمله در گوسفند [۸] پپتید وابسته به آرژنین ـ فنیل‌آلانین ـ آمید (RFRP، Arginine-phenylalanine-amide-related peptide) که شامل RFRP-1، RFRP-2 و RFRP-3 می‌شود، اثرات مشابه GnIH دارد. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که mRNA و پپتید GnIH/RFRP در هسته‌های پشتی- داخلی (Dorsomedial) هیپوتالاموس موش صحرایی و همستر متمرکز شده‌اند [۱۲, ۱۵] و تزریق داخل بطن مغزی و تزریق عمومی RFRP ترشح هورمون لوتئینی کننده (LH، Luteinizing hormone) در همستر را مهار می‌کند [۱۵]. به تازگی مشخص شده است که RFRP-3 در هسته‌های پشتی ـ داخلی میش سبب مهار ترشح گونادوتروپین می‌شود [۲۰].

از سوی دیگر پپتید وابسته به آگوتی (AgRP، Agouti-related peptide) نیز یک پپتید اشتهاآور است [۲۱]. نورون‌های بیان کننده این پپتید نیز به شکل گسترده‌ای در هیپوتالاموس گوسفند به خصوص هسته کمانی (Arc، Arcuate nucleus) پراکنده شده‌اند [۲]. نورون‌های زیادی در Arc هم AgRP و هم نوروپپتید Y (NPY، Neuropeptide Y) را بیان می‌کنند که پپتید اشتهاآور دیگری است [۱۱]. Arc به عنوان واسطه تاثیر سیگنال‌های متابولیکی عمل می‌کند و نورون‌های NPY/AgRP در این هسته به عنوان واسطه‌های کلیدی در پاسخ به کمبودهای غذایی و تنظیم تعادل انرژی عمل می‌کنند. هورمون‌های مختلفی (انسولین، لپتین، گلوکوکورتیکوئیدها و غیره) سبب تغییرات بیان شدن AgRP بر اساس تنظیم مکانیزم هموستاز انرژی می‌شوند [۲۱]. نشان داده شده است که NPY در تنظیم تولیدمثل نیز موثر می‌باشد [۱].

همچنین نشان داده شده است که نورون‌های بیان کننده NPY به بدنه نورون‌های ترشح کننده GnRH در ناحیه پیش-بینایی (Preoptic area) هیپوتالاموس اتصالاتی برقرار می‌کنند [۱۰]. با تزریق درون بطنی NPY در موش‌های صحرایی تخمدان برداری شده ترشح LH مهار شد [۱۳]. با توجه به این که GnIH و AgRP در هیپوتالاموس گوسفند به عنوان میانجی مهار محور تولیدمثلی عمل می کنند و ارتباط بین تولید مثل و انرژی مشخص است؛ فرض بر این است که ممکن است بخشی از جمعیت نورونی Arc هیپوتالاموس میش، GnIH و AgRP را با هم بیان کنند و پپتید GnIH و AgRP در زمان نبود تحریکات تخمدانی نسبت به زمان فعالیت تخمدانی بیشتر بیان شوند. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی هم بیان شدن هورمون مهار کننده گونادوتروپین و پپتید وابسته به آگوتی در نورون‌های هسته کمانی هیپوتالاموس میش انجام شد.

مواد و روش ها

نه راس میش از نژاد مخلوط با وزن تقریبی ۴۰ کیلوگرم و سن ۳ سال در فصل جفت‌گیری، انتخاب و در شرایط مشابه محیطی و تغذیه‌ای قرار داده شدند. بر اساس غلظت پلاسمایی LH و پروژسترون [۷] زمانی که میش‌ها در مرحله فولیکولی (۳ میش) و مرحله لوتئال (۳ میش) قرار داشتند، دو تزریق هپارین به میزان ۲۵۰۰۰ واحد با فاصله ۱۰ دقیقه انجام شد. سه میش دیگر نیز از ۳ هفته پیش از شروع مطالعه تخمدان‌برداری شدند و به همان صورت هپارین به آنها تزریق شد.

بلافاصله بعد از تزریق هپارین میش‌ها با تزریق سدیم پنتوباربیتال (حدود ۲ گرم در ۷ میلی‌لیتر سالین نرمال) در سرخرگ کاروتید کشته شدند و سرهای آنها به شکل دو طرفه با ۶ لیتر پارافرمالدهاید ۴٪ در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷/۴) دارای هپارین (۱۰ واحد بر میلی‌لیتر) پرفیوز شدند. بافت حاوی Arc جمع‌آوری و به شرح زیر آماده‌سازی شد. پس از بیرون آوردن مغز، ناحیه حاوی Arc جدا شده و در محلول ثابت کننده بافر پارافرمالدهاید ۴٪ در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک شب قرار داده شد. سپس در محلول سوکروز ۳۰٪ در بافر فسفات ۰/۱ مولار در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. قطعه‌های منجمد با ضخامت ۵۰ میکرومتر با دستگاه میکروتوم فریز کننده (لیکا، آلمان) به صورت کورونال برش داده شدند و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد، در محلول دارای ماده حفاظت کننده از یخ‌زدگی تا زمان آزمایش ایمیونوهیستوشیمی نگهداری شدند.

برای بررسی ایمیونوهیستوشیمی، قطعاتی از ناحیه جلویی، میانی و پشتی Arc انتخاب و روی اسلاید میکروسکوپی تثبیت شدند. قطعه‌های بافت به منظور بازیابی آنتی‌ژنی با محلول ۰/۰۵ مولار فسفات بافر سالین دو بار و به مدت ۵ دقیقه در

www.SID.ir

اجاق میکروویو شسته شدند. سپس قطعه‌ها در سرم بلوک کننده حاوی تریتون ایکس ـ۱۰۰ (Triton X-100) ۰/۳٪ و سرم نرمال بز ۱۰٪ محلول در فسفات بافر سالین ۰/۱ مولار قرار گرفتند. سپس قطعات به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. بعد مخلوطی از آنتی‌بادی پلی‌کلنال GnIH (۱:۱۰۰۰) و AgRP (۱:۱۰۰۰) بز که در خرگوش تولید شده است (آنتی‌بادی استرالیا، ملبورن، استرالیا) اضافه و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد.

قطعه‌ها ابتدا با محلول فسفات بافر سالین ۰/۰۵ مولار شسته شده و سپس آنتی‌بادی ثانویه بر علیه خرگوش آلکسا ۴۸۸ (Alexa 488) و آلکسا ۵۶۸ (Alexa 568) (۱:۲۵۰) (جکسون ایمیونوریسرچ لابوریتوریز، آمریکا) به ترتیب برای نمایان شدن GnIH و AgRP اضافه شدند.

بعد از اینکه نمونه ها با محلول فسفات بافر سالین ۰/۰۵ مولار شسته شدند. اسلایدها با محلول تثبیت کننده ضد کمرنگ شدگی (Antifade) ماده فلورسنت (داکو، آمریکا) پوشانیده شدند. مراحل نمونه برداری 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 جایگاه‌های مختلف Arc هیپوتالاموس نورون‌های واکنش دهنده ایمنی GnIH با میکروسکوپ فلورسنت (زایس، آمریکا) و آلکسا ۴۸۸ در طول موج ۵۰۵ نانومتر و آلکسا ۵۶۸ در طول موج ۵۴۳ شمارش شدند. در هر قطعه تعداد نورون‌های بیان کننده GnIH و نورون‌های بیان کننده AgRP و همچنین میزان هم بیان شدن GnIH و AgRP شمارش شدند.

تفاوت تعداد و درصد نورون‌های دارای GnIH و AgRP، هر کدام به تنهایی و نیز به صورت هم بیان شدن، در هر سه گروه، با و بدون در نظر گرفتن بخش‌های سه‌گانه (جلویی، میانی و پشتی) Arc، با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تکمیلی LSD برای مقایسه میانگین‌ها آنالیز آماری شدند (نرم‌افزار SPSS ۱۱/۵ تحت ویندوز).

$P\leq$۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. در این تحقیق نکات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است.

www.SID.ir

یافته ها

Archive of SID

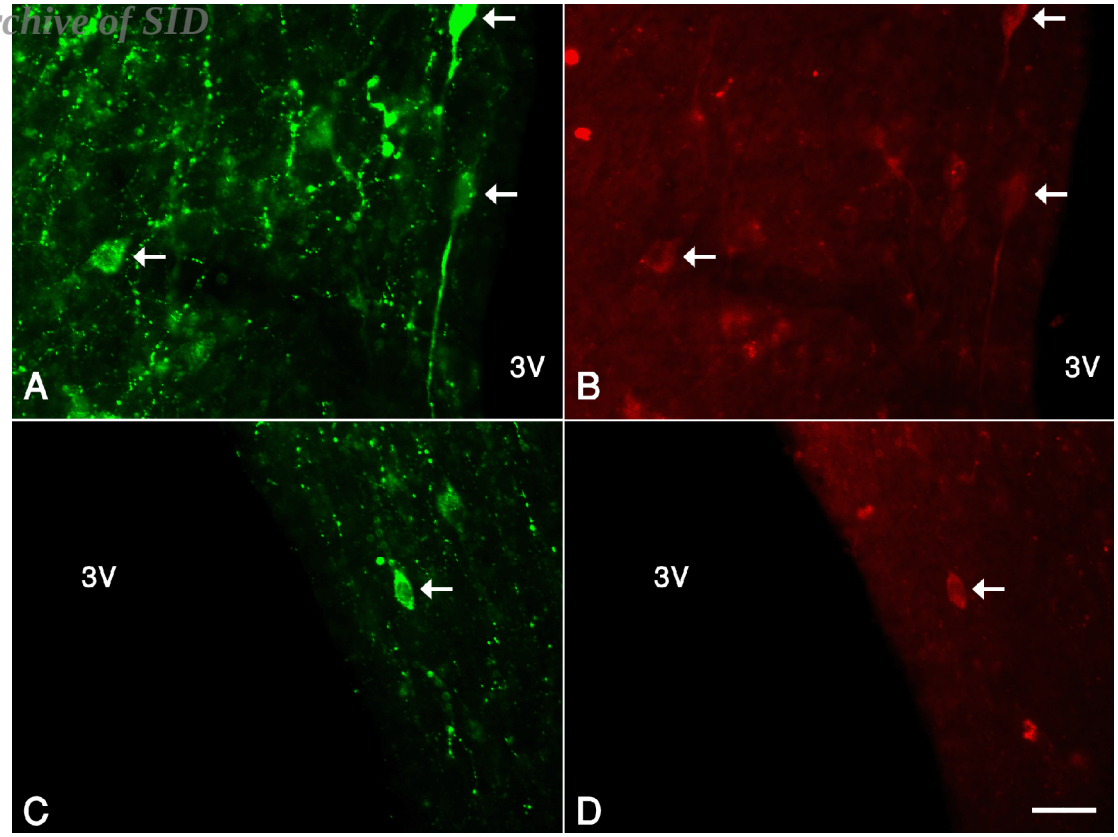
در شکل ۱ نمونه‌ای از حضور نورون‌های بیان کننده GnIH در هسته کمانی میش که AgRP را نیز بیان می‌کنند در میش تخمدان‌برداری شده نشان داده است. آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که در دو گروه لوتئال و تخمدان-برداری شده، تعداد نورون‌های GnIH در بخش میانی Arc هیپوتالاموس به طور معنی‌داری نسبت به دو بخش دیگر بیشتر بود ($P<$۰/۰۵، شکل ۲ـ الف) ولی تعداد نورون‌های AgRP در هر سه بخش (یعنی جلویی، میانی و پشتی) Arc هیپوتالاموس اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>$۰/۰۵، شکل ۳ـ الف). همچنین بدون در نظر گرفتن بخش‌های مختلف Arc هیپوتالاموس در بین سه گروه مطالعه، تعداد نورون‌های GnIH و نورون‌های AgRP به صورت معنی‌داری در گروه تخمدان‌برداری شده بیشتر از دو گروه دیگر بود ($P<$۰/۰۱، شکل ۴ـ الف).

درصد نورون‌های GnIH با بیان AgRP در هر سه گروه مطالعه و در هر سه بخش Arc هیپوتالاموس اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند ($P>$۰/۰۵، شکل ۲ــ ب). همچنین درصد نورون‌های AgRP با بیان GnIH در هر سه گروه مطالعه و در هر سه بخش اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>$۰/۰۵، شکل ۳ــ ب). از سوی دیگر بدون در نظر گرفتن بخش‌های مختلف Arc هیپوتالاموس در بین سه گروه مطالعه درصد نورون‌های GnIH که AgRP را نیز بیان می‌کردند، اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>$۰/۰۵)؛ ولی درصد نورون‌های AgRP که GnIH را نیز بیان می کردند، در گروه تخمدان برداری شده به طور معنی‌داری بیشتر از دو گروه دیگر بود ($P=$۰/۰۲، شکل ۴ـ ب).

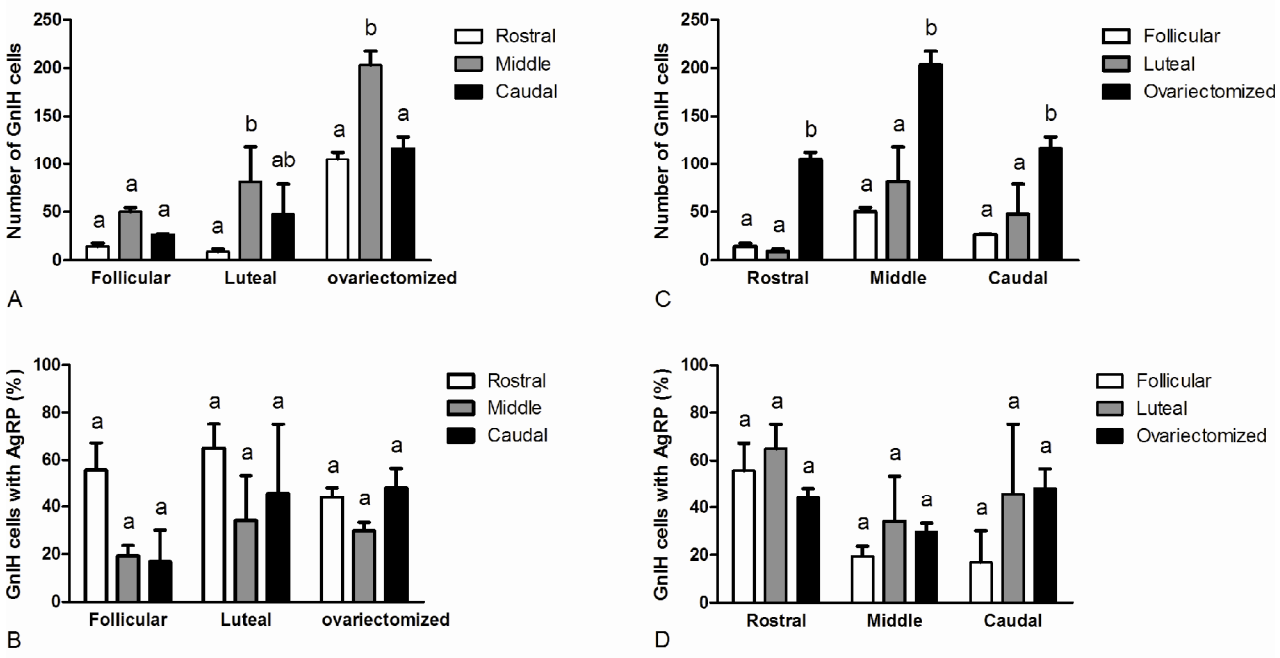
در هر سه ناحیه Arc تعداد نورون‌های GnIH در گروه تخمدان برداری شده به طور معنی‌داری بیشتر از دو گروه مطالعه دیگر بود ($P<$۰/۰۵، شکل ۲ــ ج) ولی این برتری معنی‌دار در تعداد نورون‌های AgRP میش‌های تخمدان برداری شده فقط در بخش‌های جلویی و پشتی Arc مشاهده شد ($P<$۰/۰۵، شکل ۳ـ ج).

بین سه گروه مطالعه درصد نورون‌های GnIH که AgRP را نیز بیان می‌کردند، در هر بخش Arc به صورت جداگانه، اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند ($P>$۰/۰۵، شکل ۲ـ د) ولی درصد نورون‌های AgRP که GnIH را نیز بیان می‌کردند،

Archive of SID



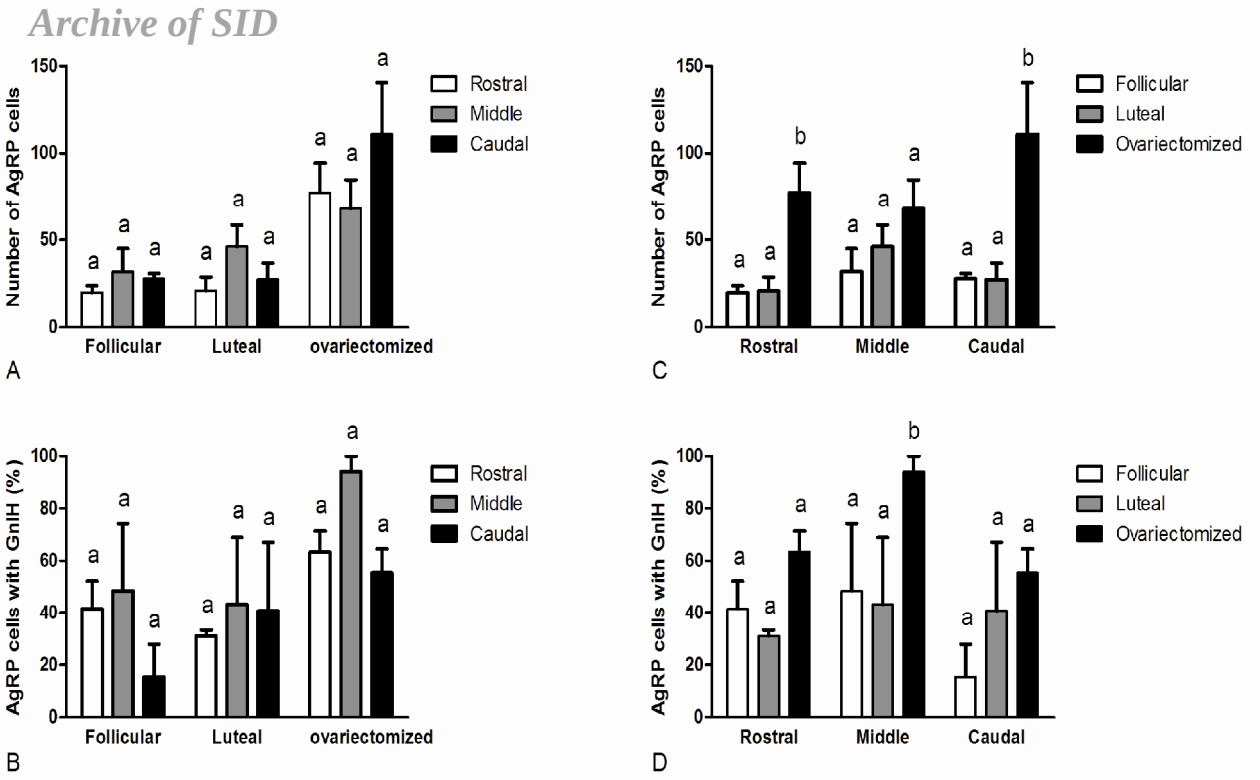
شکل ۱- نمونه‌ای از نورون‌های (پیکان) بیان کننده GnIH (A و C) در هسته کمانی میش که AgRP (B و D) را نیز بیان می‌کنند. شکل‌ها مربوط به ناحیه پشتی (A و B) و ناحیه جلویی (C و D) هسته کمانی در میش تخمدان‌برداری شده می‌باشند. شاخص ۲۰ میکرومتر است.



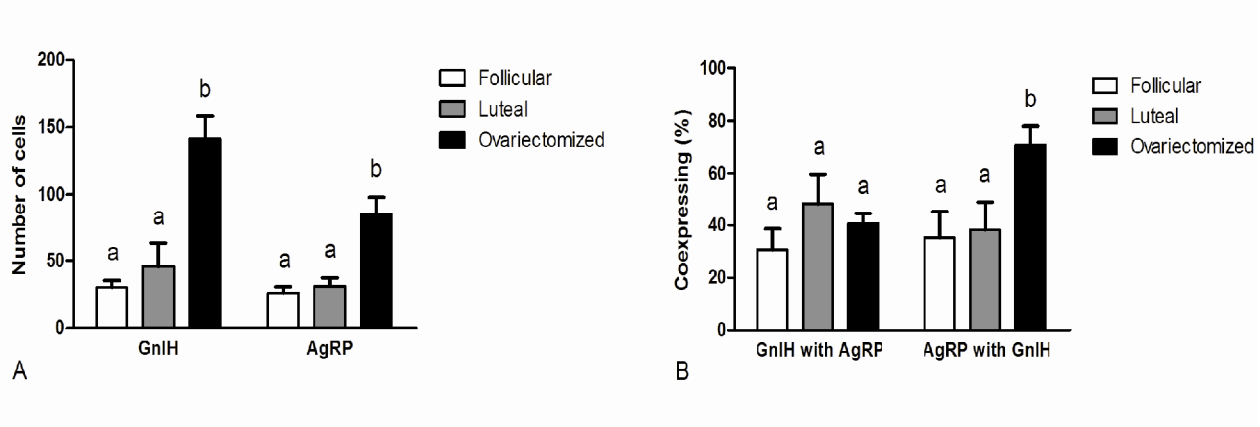
شکل ۲- A: تعداد نورون‌های بیان کننده GnIH و B: درصد نورون‌های GnIH که AgRP را نیز بیان می‌کنند، در بخش‌های مختلف هسته کمانی هیپوتالاموس در سه گروه مطالعه میش (n=۳). C: تعداد نورون‌های بیان کننده GnIH و D: درصد نورون‌های GnIH که AgRP را نیز بیان می‌کنند، در گروه‌های مطالعه مختلف بسته به بخش نورون (n=۳) در هسته کمانی هیپوتالاموس مغز میش. حروف نامتشابه بالای هر سه ستون مجاور نشانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) در همان دسته ستون می‌باشد. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳– A: تعداد نورون‌های بیان کننده AgRP و B: درصد نورون‌های AgRP که GnIH نیز بیان می‌کنند، در بخش‌های مختلف هسته کمانی هیپوتالاموس در سه گروه میش (n=۳). C: تعداد نورون‌های بیان کننده AgRP و D: درصد نورون‌های AgRP که GnIH را نیز بیان می‌کنند، در گروه‌های مطالعه مختلف بسته به بخش نورون (n=۳) در هسته کمانی هیپوتالاموس مغز میش. حروف نامتشابه بالای هر سه ستون مجاور نشانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) در همان دسته ستون می‌باشد. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است.



شکل ٤– A: تعداد نورون‌های بیان کننده GnIH و AgRP و B: درصد نورون‌های GnIH که AgRP و نورون‌های AgRP که GnIH را در هسته کمانی هیپوتالاموس در سه گروه مطالعه میش (n=۳) بیان می‌کنند. حروف نامتشابه بالای هر سه ستون مجاور نشانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) در همان دسته ستون بین سه گروه مطالعه می‌باشد. نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده است.

فقط در بخش میانی در گروه تخمدان برداری شده به طور معنی‌داری بیشتر از دو گروه دیگر بود (P<۰/۰۵، شکل ۳ـ د).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در گامه فولیکولی ۱۸/۷۵٪، در گامه لوتئال ۲۳/۸٪ و در گروه تخمدان‌برداری شده ۳۱/۷٪ از مجموع نورون‌های بیان کننده AgRP و بیان کننده GnIH در Arc هیپوتالاموس به طور همزمان این دو پپتید را بیان می‌کنند.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد کـه AgRP و GnIH در ۱۹ تا ۳۲٪ از نورون‌هـای Arc هیپوتـالاموس در مراحـل مختلـف چرخه تولیدمثلی میش به طور همزمان بیان می شوند که نقش احتمـالی مشـترک AgRP و GnIH در کنتـرل فعالیـت‌هـای تخمدانی میش را نشان می‌دهد. همچنین نتایج مطالعـه حاضـر نشان داد که بدون در نظر گـرفتن بخـش‌هـای مختلـف Arc هیپوتالاموس در بین سه گروه مطالعه تعداد نورون‌های GnIH و نورون‌های AgRP در گروه تخمدان‌برداری شده بیشـتر از دو گروه دیگر بود. همـانطور کـه مشـخص شـده اسـت برداشـتن تخمدان باعث افزایش ناگهانی میزان پالس‌های LH در مـیش می‌شود [۱۷] و چون پپتید GnIH ترشح LH را کاهش می‌دهد [۵]، میزان بیان شدن آن در گروه تخمدان‌برداری شـده نسـبت به دو گروه دیگر افزایش یافته است. افزایش بیان نـورون‌هـای AgRP در گروه تخمدان برداری شده نیز می‌تواند تاییـدی بـر عملکرد مشابه این پپتید بر ترشح LH در میش باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد هم بیـانی نـورون-های GnIH با AgRP و نیـز درصـد هـم بیـانی نـورون‌هـای AgRP با GnIH در هر سه گروه مطالعه و در هر سـه بخـش Arc هیپوتالاموس تفاوتی نداشتند. این یافته نشانگر هم بیـان شدن این دو پپتید در نورون‌های Arc هیپوتـالاموس مـیش در مراحل مختلف تولیدمثلی است. بیش از این، بیان شدن AgRP در نورون‌های Arc هیپوتالاموس مـیش نشـان داده شـد ولـی اثری از تاثیر گامه‌های تولید مثلی بر میزان بیان شدن این پپتید مشاهده نشد [۹]. نورون‌هـای در برگیرنـده NPY بـه صـورت تقریباً صد در صد بـا AgRP بیـان مـی‌شـوند [۱۱]. همچنـین پایانه‌های فعال شده ایمنی با AgRP کـه توسـط نـورون‌هـای NPY سنتز می‌شود با نورون‌هـای GnRH سـیناپس تشـکیل می‌دهند [۲۶]. نشان داده شده است که NPY افزایش ناگهانی LH را مهار می‌کند [۱۴] و این عمل توسط AgRP نیز انجـام می‌شود [۲۹]. از سوی دیگر نشان داده شده اسـت کـه GnIH مهار کننده ترشح LH است [۱۵].

مشخص شده است که هورمون‌های استروئیدی فاکتورهای ایجاد کننده بی‌اشتهایی هستند [۴]. از سوی دیگـر نشـان داده شده است که پپتیـد GnIH بـا کاسـتن سـطح اسـتروئیدها بـه عنوان یک پپتید اشتهاآور عمل می‌کند [۲۳]. همچنین نـورون-های AgRP نیز در تعادل انرژی در برخی گونه‌ها مثل گوسفند نقش دارند [۱۶]. افزایش ترشح پالسی LH باعث افزایش تولید استرادیول از فولیکول‌هایی می‌شـوند کـه در حـال رشـد بـرای تخمک‌ریزی می‌باشند، و افـزایش مقـدار اسـترادیول در زمـان کاهش غلظت پروژسترون سبب آزادسازی ناگهانی LH می‌شود [۱۸]. اسـترادیول بیـان شـدن ژن AgRP و NPY در Arc و همچنـین بیـان شـدن NPY در هسـته اطـراف بطنـی (Paraventricular nucleus) هیپوتـالاموس مـوش‌هـای تخمدان برداری شده را کاهش می‌دهد [۲۲]. همچنین کـاهش ترشح استرادیول در حیوانات تخمدان برداری شده بـه افـزایش بیان شدن ژن NPY و AgRP در هیپوتـالاموس مـی‌انجامـد [۶]. نشان داده شده کـه تزریـق AgRP بـه میمـون و مـوش صحرایی تخمدان برداری شـده بـه ترتیـب باعـث کـاهش آزاد شدن پالسی LH و کاهش ترشح ناگهـانی LH مـی‌شـود [۱۹, ۲۹]. برداشتن تخمدان در این حیوانات باعث کاهش استرادیول می‌شود که به نوبـه خـود سـبب افـزایش بیـان شـدن AgRP می‌شود.

بنابراین مطالعه حاضر هم بیان شدن هورمون مهـار کننـده گونادوتروپین و پپتید وابسته به آگـوتی در نـورون‌هـای هسـته کمانی هیپوتالاموس میش را نشان داد که نقش احتمـالی ایـن دو پپتید را در چرخه تولیدمثل میش بیان می‌کند. همچنین این پژوهش نشان داد که استروئیدهای تخمدانی بر بیان شدن ایـن دو پپتید در هسته کمانی هیپوتالاموس میش موثر هستند و پلی بین هموستاز انرژی و تولیدمثل در میش باشند.

سپاسگزاری

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

www.SID.ir

Archive of SID

References

[1] Acosta-Martinez M, Horton T, Levine JE, Estrogen receptors in neuropeptide Y neurons: at the crossroads of feeding and reproduction. ***Trends Endocrinol Metab*** 18 (2007) 48-50.

[2] Adam CL, Archer ZA, Findlay PA, Thomas L, Marie M, Hypothalamic gene expression in sheep for cocaine- and amphetamine-regulated transcript, pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y, agouti-related peptide and leptin receptor and responses to negative energy balance. ***Neuroendocrinology*** 75 (2002) 250-256.

[3] Bentley GE, Perfito N, Ukena K, Tsutsui K, Wingfield JC, Gonadotropin-inhibitory peptide in song sparrows (*Melospiza melodia*) in different reproductive conditions, and in house sparrows (*Passer domesticus*) relative to chicken-gonadotropin-releasing hormone. ***J Neuroendocrinol*** 15 (2003) 794-802.

[4] Butera PC, Estradiol and the control of food intake. ***Physiol Behav*** 99 (2010) 175-180.

[5] Clarke IJ, Sari IP, Qi Y, Smith JT, Parkington HC, Ubuka T, Iqbal J, Li Q, Tilbrook A, Morgan K, Pawson AJ, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE, Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. ***Endocrinology*** 149 (2008) 5811-5821.

[6] Clegg DJ, Brown LM, Zigman JM, Kemp CJ, Strader AD, Benoit SC, Woods SC, Mangiaracina M, Geary N, Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. ***Diabetes*** 56 (2007) 1051-1058.

[7] 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.

[8] 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 Neuroendocrinol*** 20 (2008) 1252-1259.

[9] Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CVR, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ, Kisspeptin Neurons in the Arcuate Nucleus of the Ewe Express Both Dynorphin A and Neurokinin B. ***Endocrinology*** 148 (2007) 5752-5760.

[10] Guy J, Li S, Pelletier G, Studies on the physiological role and mechanism of action of neuropeptide Y in the regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. ***Regul Pept*** 23 (1988) 209-216.

[11] Hill JW, Elmquist JK, Elias CF, Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. ***Am J Physiol Endocrinol Metab*** 294 (2008) E827-832.

[12] Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, Iijima N, Matsumoto Y, Hosoya M, Fujii R, Watanabe T, Kikuchi K, Terao Y, Yano T, Yamamoto T, Kawamata Y, Habata Y, Asada M, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Tanaka M, Ibata Y, Fujino M, New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. ***Nat Cell Biol*** 2 (2000) 703-708.

[13] Kalra SP, Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. ***Endocr Rev*** 14 (1993) 507-538.

[14] Krasnow SM, Steiner RA: Physiological mechanisms integrating metabolism and reproduction; in Neill JD (ed Knobil and Neills Physiology of reproduction. St. Louis, MO, USA, **Academic Press**, 2006, pp 2587.

[15] 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.

[16] Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD, NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. ***Science*** 310 (2005) 683-685.

[17] Montgomery GW, Martin GB, Pelletier J, Changes in pulsatile LH secretion after ovariectomy in Ile-de-France ewes in two seasons. ***J Reprod Fertil*** 73 (1985) 173-183.

[18] Rawlings NC, Bartlewski PM: Clinical reproductive physiology of ewes; in Youngquist RS, Threlfall WR (eds): Current therapy in large animal theriogenology. St. Louis, Missouri, ***Saunders***, 2007, pp 642-649.

[19] Schioth HB, Kakizaki Y, Kohsaka A, Suda T, Watanobe H, Agouti-related peptide prevents steroid-induced luteinizing hormone and prolactin surges in female rats. ***Neuroreport*** 12 (2001) 687-690.

www.SID.ir

Archive of SID

[20] Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi 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.

[21] Stütz AM, Morrison CD, Argyropoulos G, The Agouti-related protein and its role in energy homeostasis. ***Peptides*** 26 (2005) 1771-1781.

[22] Titolo D, Cai F, Belsham DD, Coordinate regulation of neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression by estrogen depends on the ratio of estrogen receptor (ER) alpha to ERbeta in clonal hypothalamic neurons. ***Mol Endocrinol*** 20 (2006) 2080-2092.

[23] 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.

[24] 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.

[25] 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.

[26] Turi GF, Liposits Z, Moenter SM, Fekete C, Hrabovszky E, Origin of neuropeptide Y-containing afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons in male mice. ***Endocrinology*** 144 (2003) 4967-4974.

[27] 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.

[28] 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.

[29] Vulliemoz NR, Xiao E, Xia-Zhang L, Wardlaw SL, Ferin M, Central infusion of agouti-related peptide suppresses pulsatile luteinizing hormone release in the ovariectomized rhesus monkey. ***Endocrinology*** 146 (2005) 784-789.

www.SID.ir