

هم‌بیانی هورمون مهار کننده گونادوتروپین و هورمون آزاد کننده گونادوتروپین در نورون‌های ناحیه پیش‌بینایی هیپوتالاموس در گامه‌های چرخه فحلی میش

محمدرضا جعفرزاده شیرازی، Ph.D.*، محمدرضا نام‌آور، Ph.D.**، امین تمدن، Ph.D.***

* گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

** مرکز تحقیقات هیستومورفومتری و استریولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی، شیراز، ایران

*** بخش مدیریت بهداشت دام دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک

دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۹۰

چکیده

هدف: بررسی هم‌بیانی نورون‌های GnRH و GnIH در ناحیه پیش‌بینایی (Preoptic area, POA) هیپوتالاموس در گامه‌های چرخه فحلی میش

مواد و روش‌ها: سه میش در سه گامه پرواستروس، استروس و لوتئال (n=9) انتخاب شدند و تعداد نورون‌های GnRH و GnIH و میزان هم‌بیانی این دو نوروپتید در ناحیه POA در هر سه گامه فحلی با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی برآورد شد.

یافته‌ها: نورون‌های GnRH و GnIH در ناحیه POA در هر سه گامه چرخه فحلی حضور داشتند و هم‌بیانی آن‌ها مشاهده شد. تعداد نورون‌های GnIH به‌طور معنی‌داری در گامه لوتئال در مقایسه با گامه پرواستروس و استروس بیشتر بود ($p < 0/01$). در حالی‌که تفاوت معنی‌داری در تعداد نورون‌های GnRH در سه گامه فحلی میش در ناحیه POA وجود نداشت ($p > 0/05$). درصد نورون‌های GnRH با بیان GnIH در گامه لوتئال به‌طور معنی‌داری کمتر از گامه پرواستروس و استروس بود ($p = 0/008$).

نتیجه‌گیری: بیان نورون‌های GnIH در POA گوسفند در گامه لوتئال بیشتر از گامه فولیکولی است، در حالی‌که تفاوتی در بیان نورون‌های GnRH در این ناحیه هیپوتالاموس مشاهده نشد. این نشانگر اثر مستقیم نورون‌های GnIH در POA بر نورون‌های GnRH و کنترل غیرمستقیم ترشح LH است.

کلید واژه‌ها: هورمون مهار کننده گونادوتروپین، هورمون آزاد کننده گونادوتروپین، ناحیه پیش‌بینایی، چرخه فحلی، میش

مقدمه

دیگری به نام هورمون مهار کننده گونادوتروپین (Gonadotropin inhibitory hormone: GnIH) کشف شده که یک ترکیب دوازده پپتیدی از خانواده پپتیدهای آرژنین - فنیل‌آلانین - آمید (آر-اف آمید) (RFRP: Arginine-phenylalanine-amide-related peptide) است که نخستین بار در سیستم هیپوتالاموس - هیپوفیزی

تاکون اعتقاد بر این بوده است که هورمون آزادکننده گونادوتروپین (GnRH: Gonadotropin releasing hormone) تنظیم کننده اصلی ترشح هورمون‌های لوتئینی کننده (LH: Luteinizing hormone) و تحریک کننده فولیکول (Follicle stimulating hormone: FSH) است. به‌تازگی تنظیم کننده

آدرس مکاتبه: شیراز، خیابان کریم خان زند، دانشکده پزشکی، ساختمان شماره ۳، طبقه ۸ مرکز تحقیقات هیستومورفومتری و استریولوژی

Email: namavarm@sums.ac.ir

مواد و روش‌ها

نه رأس میش با وزن تقریبی ۴۰ کیلوگرم و سن ۳ 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 در خون [۱۲] که توسط کیت مخصوص اندازه‌گیری شدند، در ۳ گروه سه تایی گامه‌های چرخه فحلی قرار گرفتند. غلظت P_4 در گامه لوتئال ۳/۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر و غلظت LH در گامه‌های لوتئال، 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 پتوباریتال در سرخرگ کاروتید کشته شدند و سرهای آن‌ها با ۶ لیتر پارافمالدئید ۴ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار ($pH=7/4$) دارای هپارین (۱۰ واحد بر میلی‌لیتر) پرفیوز شد. پس از بیرون آوردن مغز، ناحیه حاوی POA جدا شده و در محلول سوکروز ۳۰ درصد (Sigma-Aldrich، آمریکا) قرار داده شد. بافت POA با روشی که توسط اسمیت (Smith) و همکاران [۱۳] شرح داده شده است، جمع‌آوری و آماده شد. قطعه‌های کورونال یخ زده، با ضخامت ۵۰ میکرومتر با میکروتوم (Leica، Cryostat، آلمان) برش داده شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، در محلول دارای ماده حفاظت کننده از یخ‌زدگی (Cryoprotectant) نگهداری شد.

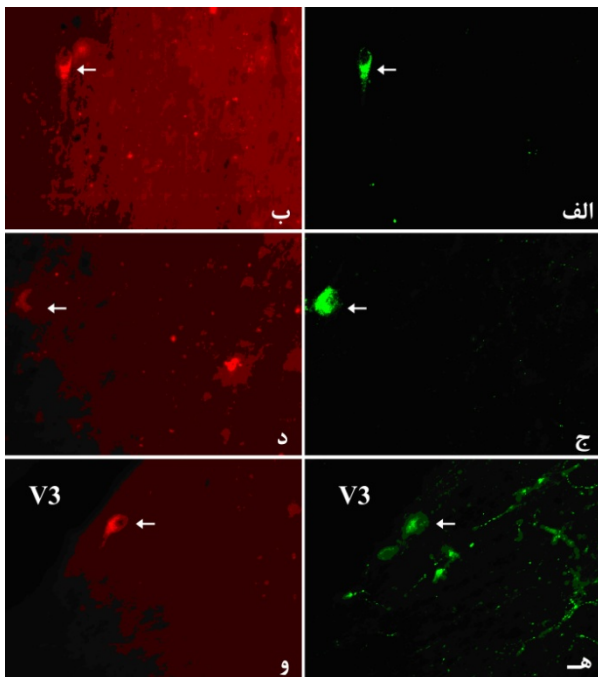
برای بررسی ایمونوهیستوشیمی، برش‌هایی از POA انتخاب و روی اسلاید میکروسکوپی تثبیت شد. برش‌های بافت به منظور بازیابی آنتی‌ژنی با محلول ۰/۰۵ مولار فسفات بافر سالین دو بار و به مدت ۵ دقیقه در اجاق میکروویو و ۲۰ دقیقه برای خشک شدن، شسته شد. سپس برش‌ها در سرم بلوک‌کننده حاوی Triton X-100 ۰/۳ درصد و سرم نرمال بز ۱۰ درصد محلول در فسفات بافر سالین ۰/۱ مولار به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن مخلوطی از آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر علیه GnRH (۱:۱۰۰۰) و GnRH (۱:۱۰۰۰) که در خرگوش تولید شده بود (Vector

بلدچین شناسایی شد [۱]. این پپتید به دلیل اثر مهاری در سنتز و ترشح گونادوتروپین‌ها به نام GnIH خوانده شد [۲]. با کشف این هورمون مسیر جدیدی در فهم فیزیولوژی تولیدمثل گشوده شد. GnIH پرندگان می‌تواند آزاد شدن LH در همستر را مهار کند [۳] و پپتید وابسته به آرژنین - فنیل‌آلانین - آمید (RFRP) آزاد شدن LH در پستانداران [۴] و از آن جمله در گوسفند [۵] را مهار می‌کند. بنابراین GnIH پرندگان و RFRP پستانداران هم از لحاظ ساختاری و هم عملکردی مشابه هستند [۶-۸].

نورون‌های GnIH در هسته اطراف بطنی (Paraventricular nucleus: PVN) هیپوتالاموس پرندگان [۹] و هسته پشتی - داخلی (DMH: Dorsomedial nucleus) هیپوتالاموس همستر، موش صحرائی و موش قرار دارد [۱۰، ۳]. مشخص شده که ارتباط بین اکسون نورون‌های GnIH با نورون‌های GnRH در ناحیه پیش‌بینایی (POA: Preoptic area) پرندگان و پستانداران وجود دارد [۱۰، ۳ و ۱۱]. همچنین این نورون‌ها با نواحی لیمبیک (Limbic regions) و هسته‌های قدامی و کمانی (Arcuate) هیپوتالاموس چونندگان نیز ارتباط دارند [۳].

در چرخه فحلی گوسفند دو گامه فولیکولی و لوتئال وجود دارد. در گامه فولیکولی که شامل مراحل پرواستروس (Proestrus) و استروس (Estrus) است، ترشح LH افزایش یافته و در نهایت به آزاد شدن ناگهانی (Surge) این هورمون ختم می‌شود. در گامه لوتئال تحت تأثیر اثر بازگشتی منفی پروژسترون، ترشح LH کاهش می‌یابد [۱۲]. با توجه به این که GnIH در هیپوتالاموس گوسفند به‌عنوان میانجی مهار محور تولیدمثلی عمل می‌کند؛ فرض بر این است که ممکن است بخشی از جمعیت نورونی POA میش، GnIH را بیان کنند و در زمان تغییرات گامه‌ای چرخه تولیدمثل بر اساس وضعیت ترشحی LH تغییراتی نشان دهند. بنابراین هدف اصلی پژوهش کنونی بررسی هم‌بینایی GnIH و GnRH در نورون‌های ناحیه پیش‌بینایی در گامه‌های چرخه تولیدمثل میش است. در این پژوهش تغییرات بیان GnIH و GnRH در طول گامه‌های چرخه فحلی میش نیز انجام شد.

شد. همچنین درصدی از نورون‌های تولید کننده GnIH پروتئین GnRH را نیز بیان کردند. به علاوه پروتئین GnIH توسط درصدی از نورون‌های تولید کننده GnRH تولید شد که میزان بیان این پروتئین‌ها در گامه‌های مختلف چرخه فحلی متفاوت بود. شکل ۱ حضور نورون‌های بیان کننده GnIH و GnRH و همچنین هم بیانی این نورون‌ها را در POA می‌ش، در گامه‌های پرواستروس، استروس و لوتئال چرخه فحلی نمایش می‌دهد. میزان نورون‌های بیان کننده GnIH در گامه لوتئال (51.7 ± 13.9) بیشتر از گامه‌های استروس (19.0 ± 6.1 ; $p=0.004$) و پرواستروس (15.7 ± 1.5 ; $p=0.002$) بود (شکل ۲). تفاوت معنی‌داری بین تعداد نورون بیان کننده GnIH در گامه‌های استروس و پرواستروس مشاهده نشد ($p=0.89$). همچنین بین تعداد نورون‌های بیان کننده GnRH در POA می‌ش در گامه‌های لوتئال، پرواستروس و استروس چرخه فحلی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۲، $p>0.05$).



شکل ۱. نمونه‌ای از هم بیانی نورون‌های (پیکان) بیان‌کننده هورمون مهارکننده گونادوتروپین (GnIH) (الف، ج، ه) و هورمون آزاد کننده گونادوتروپین (GnRH) (ب، د، و) در هسته پیش‌بینایی و در گامه‌های پرواستروس (الف، ب)، استروس (ج، د) و لوتئال (ه، و) چرخه فحلی می‌ش. V3، بطن سوم.

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 بر علیه خرگوش الکسا ۴۸۸ (Alexa 488) و الکسا ۵۶۸ (Alexa 568) (۱:۲۵۰) (Jackson Immunoresearch Laboratories، آمریکا) به ترتیب برای نمایان شدن GnIH و GnRH به مدت یک ساعت اضافه شد. بعد از این که نمونه‌ها با محلول فسفات بافر سالین ۰/۰۵ مولار شسته شد، در زیر میکروسکوپ کنترل و سپس با محلول تثبیت کننده ضد کمرنگ شدگی (Antifade) ماده فلوروسنت (Dako، آمریکا) پوشانیده شد. برای کنترل منفی مرحله انکوبه آنتی‌بادی اولیه حذف و کلیه مراحل ایمونوهیستوشیمی انجام شد که نورون بیان‌کننده GnRH و GnIH یافت نشد [۲۲]. مراحل نمونه برداری و آماده سازی در مزرعه وربی دانشگاه موناخ استرالیا و ارزیابی نمونه‌ها بعد از انتقال در دانشگاه شیراز انجام شد. کلیه مراحل پژوهش تحت نظارت کمیته مراقبت و استفاده از حیوانات دانشگاه موناخ انجام شد.

در هر برش POA تعداد نورون‌های واکنش دهنده ایمنی GnRH و GnIH با میکروسکوپ فلورسنت (Zeiss، آلمان) و الکسا ۴۸۸ در طول موج ۵۰۵ نانومتر و الکسا ۵۶۸ در طول موج ۵۴۳ شمارش شد (شکل ۱). تعداد نورون‌های دارای GnRH و GnIH درصد هم‌بیانی آن‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار آن گزارش شد. تفاوت تعداد نورون‌های دارای GnRH و یا GnIH هر کدام به تنهایی و نیز به صورت درصد هم بیان شدن در هر سه گروه با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تکمیلی LSD برای مقایسه میانگین‌ها تجزیه و تحلیل آماری شد (نرم افزار SPSS ۱۱/۵، آمریکا). $p<0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

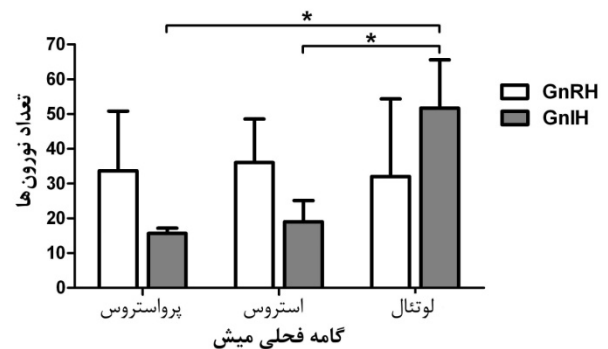
یافته‌ها

پس از انجام ایمونوهیستوشیمی برش‌های حاوی POA، وجود نورون‌های بیان کننده GnRH و GnIH مشخص و اثبات

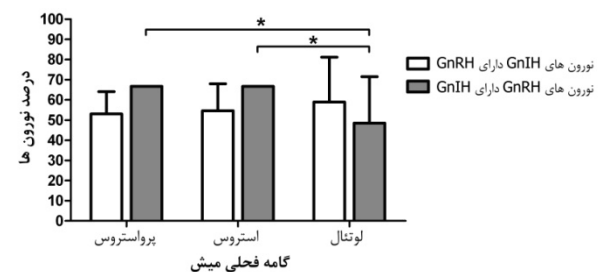
که قبلاً فقط حضور رشته‌های نورون‌های GnIH/RFRP در POA در پرندگان [۱۴, ۱۵]، موش [۱۶] و موش صحرایی [۱۷] نشان داده شده بود. حضور نورون‌های بیان‌کننده GnIH/RFRP در هسته اطراف بطنی (PVN) پرندگان [۹, ۱۰]، در هسته DMH موش و موش صحرایی [۳] و در هسته (Ventromedial nucleus) و ناحیه‌ای بین هسته شکمی - داخلی (DMH همستر [۳, ۱۸] نشان داده شده است. جسم سلولی و رشته‌های سلول‌های بیان‌کننده RFRP در مغز موش در نواحی که مرتبط با تغذیه، درد و سیستم شنوایی است، پراکنده شده است [۱۹]. اگرچه RFRP در پستانداران و GnIH در پرندگان مشابه است، در پرندگان GnIH اثر خود را در سطح هیپوفیز و مهار مستقیم آزاد شدن گونادوتروپین‌ها می‌گذارد اما در پستانداران تأثیر خود را با واسطه نورون‌های GnRH در POA اعمال می‌نماید [۱۸]. حضور هردوی این نورون‌ها در POA گوسفند می‌تواند نشان دهنده اثر احتمالی نورون‌های GnIH بر نورون‌های GnRH با شیوه اتوکراین - پاراکراین نیز باشد.

پالس‌های ترشحی LH در گامه فولیکولی افزایش و در گامه لوتئال چرخه فحلی می‌کاهش می‌یابد [۱۲]. با توجه به اینکه نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان GnIH در POA در گامه فولیکولی کاهش و در گامه لوتئال افزایش می‌یابد، این تغییرات می‌تواند نشانه اثر مهاری نورون‌های بیان‌کننده GnIH بر نورون‌های بیان‌کننده GnRH در POA گامه لوتئال باشد. در نتیجه بیان GnIH سبب کاهش میزان تولید LH در این گامه می‌شود. در زمان افزایش ناگهانی LH در همستر تعداد سلول‌های بیان‌کننده RFRP در همستر کاهش می‌یابد [۲۰]. همچنین نشان داده شده است که غلظت پلاسمایی LH با تزریق GnIH در گاو کاهش می‌یابد [۲۱]. این یافته‌ها با

بین میانگین درصد نورون‌های GnIH که GnRH را نیز در POA هیپوتالاموس می‌ش در هر سه گامه فحلی بیان می‌کرد، تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$ ، شکل ۳). اما درصد نورون‌های GnRH که GnIH را نیز بیان می‌کرد، گامه لوتئال ($23/0 \pm 8/4$ درصد) به طور معنی‌داری کمتر از گامه پرواستروس و استروس بود ($66/7 \pm 0$ درصد؛ $p = 0.008$).



شکل ۲. اثر گامه‌های چرخه فحلی بر تعداد نورون‌های بیان‌کننده هورمون مهارکننده گونادوتروپین (GnIH) و هورمون آزادکننده گونادوتروپین (GnRH) در هسته پیش‌بینایی در سه گروه مطالعه می‌ش ($n=3$). ستاره نشانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین گامه‌ها است ($p < 0.05$). نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است.



شکل ۳. اثر گامه‌های چرخه فحلی بر درصد هم‌بیانی نورون‌های هورمون مهارکننده گونادوتروپین (GnIH) و هورمون آزادکننده گونادوتروپین (GnRH) در هسته پیش‌بینایی در سه گروه مطالعه می‌ش ($n=3$). ستاره نشانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین گامه‌ها است ($p < 0.05$). نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است.

بحث

نتایج مطالعه حاضر برای نخستین بار هم‌بیانی نورون‌های GnRH و GnIH در POA می‌ش را نشان داد. این درحالی است

بیان نورون‌های GnRH در این ناحیه هیپوتالاموس مشاهده نشد که نشان‌دهنده اثر مستقیم نورون‌های GnIH در POA بر نورون‌های GnRH و کنترل غیرمستقیم ترشح LH است. از نتایج این مطالعه می‌توان استنباط کرد که تاحدودی بیان GnIH و GnRH در تضاد است، اگرچه ممکن است عوامل دیگری نیز در مهار GnRH نقش داشته باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از همکاری کارمندان مزرعه وربی دانشگاه موناخ استرالیا سپاسگزاری می‌کنند.

نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد که در گامه فولیکولی که میزان LH بالاست، تعداد نورون بیان‌کننده GnIH کاهش یافته است. پالس‌های ترشحی LH در فصل تولیدمثل افزایش و در فصل غیرتولیدمثل کاهش می‌یابد و مشخص شده که سلول‌های بیان‌کننده GnIH در فصل تولیدمثل نسبت به فصل غیرتولیدمثلی کاهش می‌یابد [۲۲].

نتایج مطالعه حاضر وجود نورون‌های بیان‌کننده GnIH در POA را نشان داد. همچنین در مطالعه حاضر هم‌بینی GnIH و GnRH در هر سه گامه چرخه فحلی مشاهده شد. این مطالعه نشان داد که در گامه لوتئال بیان نورون‌های GnIH در POA گوسفند بیشتر از گامه فولیکولی است، در حالی که تفاوتی در

References

1. Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, et al. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 661-7.
2. 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* 2006; 147: 1187-94.
3. Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, et al. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2410-5.
4. Ubuka T, Morgan K, Pawson AJ, Osugi T, Chowdhury VS, Minakata H, et al. Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *PLoS ONE* 2009; 4: e8400.
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* 2008; 20: 1252-9.
6. Clarke IJ, Qi Y, Puspita Sari I, Smith JT. Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Front Neuroendocrinol* 2009; 30: 371-8.
7. Bentley GE, Ubuka T, McGuire NL, Calisi R, Perfeto N, Kriegsfeld LJ, et al. Gonadotrophin-Inhibitory Hormone: A Multifunctional Neuropeptide. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 276-81.
8. Tsutsui K, Ubuka T, Yin H, Osugi T, Ukena K, Bentley GE, et al. Mode of action and functional

- significance of avian gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): a review. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2006; 305A: 801-6.
9. **Tsutsui K, Saigoh E, Yin H, Ubuka T, Chowdhury VS, Osugi T, et al.** A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotrophin-inhibitory hormone in birds: discovery, progress and prospects. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 271-5.
 10. **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* 2008; 157: 283-7.
 11. **Tsutsui K.** A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. *Prog Neurobiol* 2009; 88: 76-88.
 12. **Cumming IA, Brown JM, Goding JR, Bryant GD, Greenwood FC.** Secretion of prolactin and luteinizing hormone at oestrous in the ewe. *J Endocrinol* 1972; 54: 207-13.
 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* 2009; 150: 5530-8.
 14. **Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K.** Distribution of a novel avian gonadotropin-inhibitory hormone in the quail brain. *Cell Tissue Res* 2003; 312: 73-9.
 15. **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* 2003; 178: 311-8.
 16. **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* 2009; 150: 2799-804.
 17. **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* 2007; 51: 171-80.
 18. **Revel FG, Saboureau M, Pevet P, Simonneaux V, Mikkelsen JD.** RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* 2008; 149: 902-12.
 19. **Ukena K, Iwakoshi E, Minakata H, Tsutsui K.** A novel rat hypothalamic RFamide-related peptide identified by immunoaffinity chromatography and mass spectrometry. *FEBS Letters* 2002; 512: 255-8.
 20. **Gibson EM, Humber SA, Jain S, Williams WP, Zhao S, Bentley GE, et al.** Alterations in RFamide-related peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 2008; 149: 4958-69.
 21. **Kadokawa H, Shibata M, Tanaka Y, Kojima T, Matsumoto K, Oshima K, et al.** 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* 2009; 36: 219-24.
 22. **Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadeh Shirazi MR, Maltby M, et al.** 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* 2008; 149: 5770-82.