Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۴ بهار ۱۳۹۶
DOI: 10.22034/vj.2017.107798

موقعیت‌یابی گرلین در بافت بیضه واپیدیدیم قوچ

• سامان صادق وزیری
کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام از دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج
• پرهان شکراللهی (نویسنده مسئول)
استادیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج
• صباح محمدی
کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام از دانشگاه کردستان
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۱-۰۳ تاریخ پذیرش:۱۳۹۵-۰۳-۰۸
Emali: Borhansh@gmail.com

چکیده

هدف از این مطالعه موقعیت‌یابی ایمنوهیستوشیمی گرلین در بافت‌های بیضه و اپیدیدیم قوچ نژاد کردی بود. گرلین پپتید ۲۸ اسید آمینه‌ای آسیله شده، عامل مهم دخیل در بیشتر علامت‌های سوخت و سازی و هورمونی است که اعمال تولیدمثلی را در شرایط تغیر تعادل انرژی تنظیم می‌کند. در این تحقیق موقعیت‌یابی ایمنوهیستوشیمی گرلین را در بافت‌های بیضه و اپیدیدیم قوچ، با استفاده از پادتن مونوکلونال موشی ضد گرلین به‌عنوان پادتن اولیه و پادتن پلی‌کلونال الاغی ضد ایمنوگلوبین G (HRP) به عنوان پادتن ثانویه مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های بافتی از سه قوچ ۱/۵ تا ۲ ساله جمع‌آوری شد، و برای آزمایش IHC در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شدند. سپس قطعه‌های پارافینی و برش‌های بافتی برای آزمایش IHC تهیه شد. واکنش ایمنی در یاخته‌های زایا، یاخته‌های لایدیگ، یاخته‌های سرتولی و سر اپیدیدیم مشاهده شد. عقیده بر این است که محل بیان گرلین در یاخته‌های زایا، یاخته‌های لایدیگ، سرتولی و سر اپیدیدیم ممکن است نقش آن را در تنظیم موضعی (اتوکرین/پاراکرین) نشان دهد. این اولین مطالعه‌ای است که شواهد مولکولی را برای وجود گرلین در بافت بیضه‌ای و اپیدیدیم قوچ سالم فراهم کرده است.

کلمات کلیدی: گرلین، یاخته لایدیگ، یاخته سرتولی، بیضه، اپیدیدیم، قوچ نژاد کردی

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 114 pp: 75-81

Ghrelin localization in testicular and epididymis tissues of Ram

By: Sadegh Vaziri, S., MSc, Poultry Physiology, Islamic Azad University Branch Sanandaj. Shokrollahi, B., (Corresponding Author) Asistant Professor Islamic Azad University Branch Sanandaj. and Mohammadi, S., MSc in Poultry Physiology, University of Kurdestan.

Received: 2016-03-22 Accepted: 2016-05-28

Email: Borhansh@gmail.com

The aim of the present study was to immunohistochemical positioning of ghrelin in testicular and epididymis tissues of Kurdish ram. Ghrelin, a 28-amino acid acylated peptide is an important factor involved in most of the metabolic and hormonal signals which adapt the reproductive functions in conditions of altered energy balance. This study investigated the immunohistochemical localization of ghrelin in testicular and epididymis tissues of Kurdish ram, using mouse monoclonal anti ghrelin antibody as primary antibody and polyclonal donkey anti IgG Horseradish Peroxidase (HRP) antibody as secondary antibody. Samples of testis collected from three native male sheep aged of 1.5 to 2 years old, and preserved in 10% formalin for posterior inclusion in paraffin. Histological sections with 5 micron in thickness were prepared for IHC. Immunoreactions was assessed for Germ cells, Leydig and Sertoli cells and head of epididymis. It is believed that the site of ghrelin expression in the spermatogenesis process, Leydig, sertoli cells and head of epididymis may indicate its role in local (autocrine / paracrine) regulations. This is one of the first studies to provide molecular evidence for the presence of ghrelin within the entire testicular and epididymis tissues of ram.

Key words: ghrelin, leydig cell, sertoli cell, testis, epididymis, Kurdish ram

مقدمه

هورمون‌های درون‌ریز ترشحاتی از غدد داخلی هستند که به داخل گردش خون جهت تنظیم تن‌کردشناسی چندگانه بدن، ریخته می‌شوند. در چند دهه گذشته، هورمون‌هایی از دستگاه گوارش شناسایی و جداسازی شده‌اند و اعمال تن‌کردشناسی آنها مطالعه شده است. اگر چه در مطالعات اولیه غده هیپوفیز به‌عنوان غده اصلی درون‌ریز بدن مورد نظر بوده است، اندام‌های دیگری نیز مانند بافت چربی، غده فوق کلیه، دستگاه گوارش و دستگاه تولیدمثل وجود دارد که هورمون‌های درون‌ریزی تولید می‌کنند. در میان آنها، دستگاه گوارش از لحاظ حجم بزرگ‌ترین اندام درون‌ریز بدن است و هورمون‌های تولید شده در دستگاه گوارش در رشد، نمو، کارکرد قلب و عروق، حرکت معده، رفتار و حفظ هم‌ایستایی انرژی دارای اهمیت تن‌کردشناسی می‌باشد. هورمون‌های زیادی در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش شناسایی شده‌اند. برای مثال در معده، گاسترین و هیستامین، سوماتواستاتین، نروپپتید Y، گرلین و لپتین در لایه مخاطی و یا شبکه میانتریک تولید می‌شوند و کوله سیستوکینین (CCK)، پپتید-۱ شبه گلوکاگون، موتیلین، سروتونین و پپتید PYY (PYY ۳-۳۶) در روده تولید می‌شوند (۱۱).

بیش از ۳۰ هورمون پپتیدی مختلف از دستگاه گوارش ترشح می‌شوند و بسیاری از آنها حرکت دستگاه گوارش و همچنین هم‌ایستایی انرژی را تنظیم می‌کنند (۳).

دستگاه درون‌ریز عصب پایش رشد بدنی، تعادل انرژی و تولیدمثل به طور نزدیکی با همدیگر در ارتباط هستند. این چنین ارتباطی بر این اساس فرض شده است که ذخایر انرژی کافی جهت بلوغ، رشد و باروری لازم می‌باشد. با این حال شناسایی علامت‌های مولکولی مسئول برای چنین پایش دقیقی بتازگی آغاز شده است. با توجه به اطلاعات موجود می‌توان استنباط کرد که گرلین ممکن است گزینه خوبی برای تنظیم دستگاه درون‌ریز عصب باشد (۱۴).

گرلین پپتیدی ۲۸ اسید آمینه‌ای است که یک اسید چرب با زنجیره متوسط به نام n-اکتانوئیک اسید به سرین شماره ۳ آن متصل است. وجود این ریشه اسیل برای فعالیت این هورمون به ویژه اتصال به گیرنده ضروری است. ژن گرلین در انسان روی کروموزوم ۳ واقع شده است. این ژن از ۴ بیانه (اگزون) و ۳ میانه (اینترون) تشکیل شده است و پروتئین بالغ توسط بیانه‌های ۱و ۲ بیان می‌شود. ژن گرلین در انسان و موش از نظر ساختمانی به یکدیگر شبیه هستند. پیش‌ساز گرلین در انسان متشکل از ۱۱۷ اسید آمینه است. گرلین بیشتر توسط یاخته‌های درون ریز مخاط ترشح کننده اسید معده که یاخته‌های X/A نامیده می‌شوند، ساخته می‌شود (۱۲).

هورمون‌های متعددی در ترشح و یا مهار گرلین نقش دارند از جمله هورمون رشد، سوماتواستاتین، لپتین، و انسولین که از بازدارنده‌های گرلین محسوب می‌شوند (۴).

هورمون گرلین بر آزاد شدن هورمون رشد موثر است و مسیر مهار آن از مسیر سوماتواستاتین و هورمون آزاد کننده هورمون رشد که از هورمون‌های اصلی تنظیم هورمون رشد محسوب می‌شود، متفاوت است. برخی از

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات نشـــان داده‌اند که گرلین موجب افزایش و تقویت تعداد تکانه‌های ترشـــح هورمون رشد می‌شود، این کار با توانایی گرلین در بسیج کلسیم در یاخته‌های هدف گیرنده‌های GHS-R1a و در نهایت ترشـــح هورمون رشد صورت می‌گیرد. این هورمون در تنظیم اشـــتها نیز موثر است به گونه‌ای که با تحریک نروپپتید هیپوتالاموسی اورکسین، اشتها را افزایش داده و افزایش وزن و چاقی را نیز به دنبال خواهد داشت (۲).

پتازگی مشخص شده است که گرلین ممکن است در مهار محور گنادی نقش داشـــته باشد. یکی از رویه‌های تولیدمثلی گرلین که اولین بار ارزیابی شد وجود گرلین و اعمال آن در گندهای جنس نر می‌باشد (۱۴).

شـــواهد روزافزون نشان می‌دهد که گرلین در ســـطوح مختلف محور گونادوتروپیـــک و نیز در دیگر بافت‌های تولیدمثلی بیان می‌شـــود یا عمل می‌کند (۲). اثرات مســـتقیم گسترده گرلین روی دستگاه تولیدمثلی هنوز ناشـــناخته اســـت. به نظر می‌رســـد گرلین اثرات فزا گندی روی دستگاه تولیدمثلی داشـــته باشد. مشخص شده اســـت که گرلین ترشح LH را مهار و پاســـخ به GnRH را در شرایط آزمایشـــگاهی کاهش می‌دهد، در صورتی که ترشـــح FSH را تحت تاثیر قرار نمی‌دهـــد (۱۴). همچنین گرلین نقش تنظیـــم کننده‌ای در شـــکل‌گیری جنین دارد بدین ترتیـــب که به عنوان پیامبرهای شیمیایی برای ارتباطات داخل یاخته ای در طی مراحل مختلف رشـــد جنین عمل می‌کنـــد (۸). علاوه براین گرلین ممکن اســـت در مهار ترشح پرولاکتین دخیل باشـــد و اثرات تحریک کننده گرلین روی سطوح پرولاکتین ســـرم انسان بالغ ثابت شده است و گزارش شده است که گرلین ترشـــح پرولاکتین را در موش صحرایی مهار می‌کنـــد. گرلین به طورقابل توجهی قادر به مهار ترشـــح تستوسترون در روش وابسته به چنده (تزریق سطوح مختلف گرلین) می‌باشد. در واقع گرلین به‌طور مساوی گنادوتروپین جفتی انســـان (hCG) و cAMP القاء کننده ترشـــح تستوسترون را کاهش می‌دهد. مشخص شده است که این عمل بازدارندگی باید در مرحله قبل از تشـــکیل cAMP اتفاق بیافتد. اثر مهاری گرلین روی ترشح تستوسترون با کاهش قابل‌توجه چندین عامل کلیدی در مســـیر ساخت استروئید از قبیل پروتئین حاد تنظیم کننده استروئید (StAR) و آنزیم‌های شکننده زنجیره جانبی P۴۵۰، ۳ بتا-هیدروکســـیل استروئید هیدروژناز (HSD) و نوع سوم ۱۷ بتا HSD مربوط اســـت. علاوه‌بر اثرات استروژنیک، گرلین ممکن است به‌طور مســـتقیم اعمال لوله‌های اسپرم‌ســـاز را تنظیم کنـــد (۲). گرلین و گیرنده‌های آن (GHS-R1a) در اندام‌های تولیدمثلی یافت شـــده‌اند. گرلین نه تنها در معده و سایر بخش‌های روده بلکه در تمام بافت‌های مورد مطالعه از جمله، غده فوق کلیه، پســـتان، مخاط دهانی، مـــری، لوله رحمی، بافت چربی، کیسه صفرا، لنفوسیت‌های انسانی، کبد، ریه، غدد لنفاوی، ماهیچه، قلب، لوزالمعده، هیپوفیز، پوست، طحال، جفت، پروستات، تخمدان و بیضه یافت شـــده است (۱). گرلین و گیرنده‌های آن در تخمدان انسان، بز، خوک و ماکیـــان، یاخته‌های بدنی فولیکولی، یاخته‌های بینابینی هیلوس انســـان به‌وسیله روش ایمنوهیستوشیمی ثابت شده است (۸).

برخـــی مولکول‌ها نقـــش مهمی در پالایش تعادل انـــرژی و تولیدمثل به‌وســـیله عمل روی محور درون‌ریز عصب و نیـــز در پایش موضعی وقایع بیضه از جمله سازوکارهای پوشش لوله‌های اسپرم‌ساز دارند. لپتین مثالی از مولکول‌هایی است که روی هیپوتالاموس و بیضه عمل می‌کند، با این حال، گرلین به‌عنوان پادکنش عملکردی لپتین شناســـایی شده است. علاوه‌براین مشخص شده اســـت که گرلین اثرات پادکنشی نسبت به عامل القاء کننده و تکثیـــر یاخته‌ای یاخته زایا دارد. در بیضه گرلین به‌طور ویژه‌ای از فعالیت تکثیری یاخته‌های لایدیگ بالغ به‌وســـیله تنظیم کاهشـــی بیان ژن عامل بنیادی یاخته جلوگیری می‌کند (۶).

گرلین در یاخته‌های لایدیگ، لوله‌های اسپرم‌ساز و یاخته‌های سرتولی بیضه انســـان شناسایی شده اســـت. تعداد یاخته‌های لایدیگی که واکنش ایمنی گرلین را نشـــان داده بودند نســـبت به تعداد کل یاخته‌های لایدیگ در افرادی که غلظت تستوســـترون کمتری داشـــتند، بیشتر بود. در بیضه موش واکنش ایمنی گرلین در یاخته‌های لایدیگ موقعیت‌یابی شـــده بود اما گیرنده GHS-RA1 در هردوی یاخته‌های لایدیگ وســـرتولی شناسایی شده بود (۴).

بیان GHS-RA1 در مجاری اسپرم‌ســـاز نشـــان می‌دهد که برون پوش لوله‌های اسپرم‌ســـاز ممکن است بافت هدف گرلین باشد و به‌طور مستقیم عملکرد لوله‌های اسپرم‌ســـاز را تنظیم می‌کند. بنابراین پذیرفتنی است که گرلین ممکن است اعمال مهم گندی، تکثیر و خزان یاخته (آپوپتوز) را در بیضه موش مهار کند (۵).

لوکازیک و همـــکاران (۲۰۱۲) بیان پروتئیـــن GHS-RA1 در گلژی و تاژکتـــن (آکروزوم) های زام یاختک (اســـپرماتید) هـــا و نواحی آکروزوم یا غشـــای یاخته‌ای سر اســـپرم خاگی (اپیدیدیمی) را تائید کردند. غلظت ۱۰-۶ میلـــی لیتر در لیتر گرلین یون آزاد کلســـیم داخـــل یاخته‌ای را در گشناب (اسپرم) موش افزایش داد. بیان گیرنده GHS-RA1 در اسپرم و نیز اثر گرلین روی جنبایی اســـپرم و غلظت یون کلسیم داخل یاخته‌ای نشان می‌دهد که این چنین اثرات زیستی گرلین ممکن است تحت شرایط داخل بدنی ایجاد شود (۷).

بـــا توجه به اینکه تا اکنـــون گرلین در بیضـــه و اپیدیدیم قوچ کردی موقعیت‌یابـــی نشـــده اســـت، هـــدف از این تحقیـــق اخیـــر موقعیت‌یابی ایمونوهیستوشیمی گرلین در بافت بیضه و اپیدیدیم قوچ کردی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری بافتی بیضه از دام‌های ۲-۱/۵ ســـاله کشـــتار شـــده در کشتارگاه دام سنندج انجام گرفت. نمونه‌های تهیه شده شامل قسمت‌های ســـر، بدنه، دم خاگی، قســـمت مرکزی و حاشـــیه‌ای بافت بیضـــه به ابعاد ۱×۰/۵×۰/۵ سانتی متر بود، تهیه شد (از هر قسمت ۲ نمونه) و نمونه‌ها بعد از قرار گرفتن در ظروف پلاستیکی به مدت ۲۴ ساعت در محلول پایدارساز بوئن (۷۵ ml اسید پیکریک اشباع شده، ۲۵ml فرمالین تجاری و ۵ ml اسید استیک گلاســـیال) قرار گرفت. بعد از مراحل آبگیری (قرار دادن لامها در الکل‌های با درجات مختلف، الکل مطلق، ۹۵، ۸۰، ۷۰ و ۵۰ درجه و در هر کدام به مدت ســـه دقیقه قرار دادیم)، شفاف‌سازی، آغشته‌سازی با پارافین، قالب‌گیری، قطعه‌های پارافینی تهیه شـــد و مقاطع بافتی به ضخامت ۵-۴ میکرون توســـط دســـتگاه میکروتوم (ریز بر) تهیه و برروی لام‌های آغشته شده به چسب سیتولوژی پایدار شدند.

روش ایمنوهیستوشیمی

ابتدا مقاطع بافتی پارافینی در گرمخانه ۵۶ درجه ســـانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. لام‌ها با استفاده از زایلین پارافین زدایی و با آب

www.SID.ir

Archive of SID

جاری شستشو داده شدند و سپس توسط الکل اتیلیک با درجات مختلف آبدهی شده دوباره با آب جاری به مدت ۲ دقیقه شستشو داده شدند بعد با محلول PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. لام‌ها جهت بازیابی پادگن با استفاده از بافر سیترات (۱۰ mM, pH=۶) در حمام تسج در دمای ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند سپس لام‌ها در H_2O_2 ۳ درصد در PBS برای غیرفعال شدن فعالیت پروکسیداز اندوژنوسی به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند. لام‌ها در PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. سپس لام‌ها را در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد تا خنک شدند. بعد در PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. لام‌ها با سرم ۵ درصد گاوی در PBS به مدت ۱۵دقیقه برای دو بار شستشو داده شدند. سپس لام‌ها با پادتن اولیه (پادتن دودمانی تولید شده در موش از شرکت Abbiotec) رقیق شد به نسبت در PBS حاوی ۱ درصد BSA در اتاق مرطوب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز خوابانده شدند. لام‌ها در PBS برای ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. لام‌ها با پادتن ثانویه (پادتن چند دودمانی ضدIgG موش از شرکت Abbiotec) مزدوج شده با HRP رقیق شده در PBS به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه خوابانده شدند. لام‌ها در PBS به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. بعد جهت نمایان کردن واکنش پادگن و پادتن از محلول رشدمایه (سوبسترای) دی‌آمینوبنزیدین (DAB) در H_2O_2 به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. لام‌ها در آب جاری شستشو داده شدند. از محلول رنگ‌آمیزی زمینه هماتوکسیلین استفاده شد. سپس لام‌ها توسط الکل اتیلیک آبگیری و شفاف‌سازی شدند و با قرار دادن یک قطره چسب سیتولوژی روی لام و گذاشتن لامل، عمل مونته کردن انجام و برای بررسی اسلایدها از میکروسکوپ نوری استفاده شد. با بررسی نمونه‌های تهیه شده ظهور رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره در مقاطع بافتی نشان از واکنش ایمنوپراکسیداز در نمونه‌های بافتی تهیه شده بود.

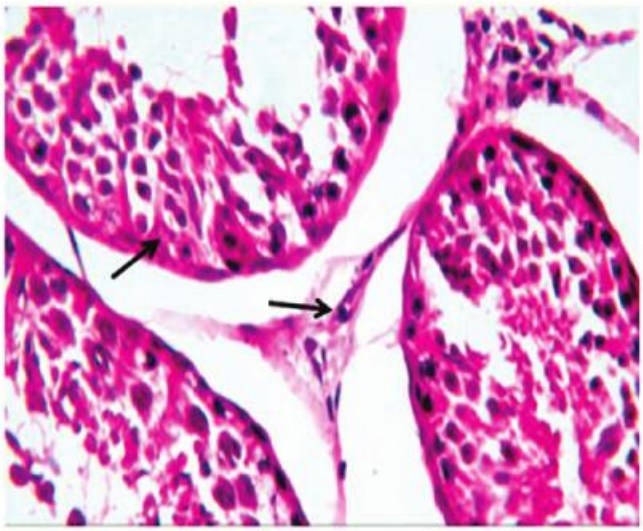
نتایج

با توجه به یافته‌های به‌دست آمده می‌توان گزارش نمود که پادگن گرلین در یاخته‌های زایا، یاخته‌های لایدیگ، یاخته‌های سرتولی و سر اپیدیدیم قابل‌ردیابی و شناسایی است. واکنش ایمنوپروکسیداز در سیتوپلاسم یاخته‌های لایدیگ، سرتولی و اپیدیدیم مشاهده شد(شکل ۳، ۵ و ۸). لازم به ذکر است که شدت رنگ‌پذیری واکنش ایمنوپروکسیداز در یاخته‌های لایدیگ و اپیدیدیم (شکل ۵ و ۸) نسبت به دیگر یافت‌ها شدید بود و شدت واکنش در یاخته‌های سرتولی و زایا مشابه هم بود (شدت رنگ‌پذیری از طریق مشاهده ارزیابی شده است). به‌نظر می‌رسد که هر کدام از یاخته‌ها می‌توانند به‌طور متفاوت در ساخت گرلین شرکت کنند. شاید گرلین موجود در این یاخته‌ها به‌طور موضعی یا به روش اتوکرین / پاراکرین عملکرد این یاخته‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اگر چه وجود گرلین در بیضه گونه‌های مختلف (انسان، و موش صحرایی) گزارش شده است اما حضور گرلین در دستگاه تناسلی قوچ کردی برای اولین بار گزارش می‌گردد.

بحث

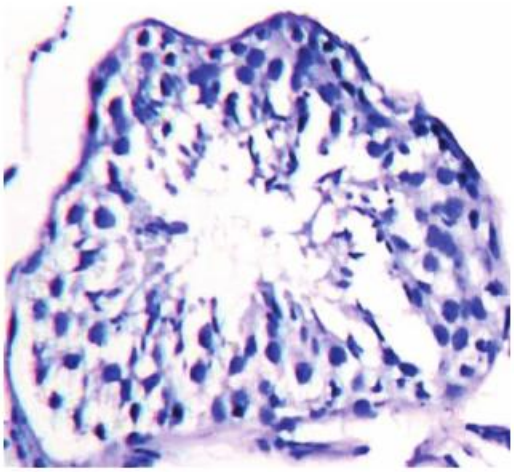
بیان GHS-RA۱ در مجاری اسپرم‌ساز نشان می‌دهد که برونپوش لوله‌های اسپرم‌ساز ممکن است بافت هدف گرلین باشد و به‌طور مستقیم عملکرد لوله‌های اسپرم‌ساز را تنظیم می‌کند. بنابراین پذیرفتنی است که گرلین ممکن است اعمال مهم گنادی، تکثیر و خزان یاخته‌ای را در بیضه موش مهار کند (۵).

لوکازیک و همکاران (۲۰۰۹) بیان پروتئین GHS-RA۱ در گلژی و تاؤکتن‌های اسپرماتیدها و نواحی آکروزوم یا غشای یاخته‌ای سر اسپرم اپیدیدیمی را تأیید کردند. بیان گیرنده GHS-RA۱ در اسپرم و نیز اثر گرلین روی جنبایی اسپرم و غلظت یون کلسیم داخل یاخته‌ای نشان



شکل ۱- مقطع عرضی بافت بیضه قوچ ۲ ساله (۴۰۰×)

مقطع عرضی بافت معمولی بیضه قوچ تهیه شده با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین-هماتوکسیلین. فلش‌ها نشان دهنده یاخته‌های لایدیگ و سرتولی می‌باشد.



شکل۲- مقطع عرضی بافت بیضه قوچ ۲ ساله (۴۰۰×)

کنترل منفی: نمونه خوابانده شده با سرم خرگوشی به جای پادگن اولیه. عدم رنگ قهوه‌ای در یاخته‌های لایدیگ نشان دهنده منفی بودن واکنش ایمنوپروکسیداز است.

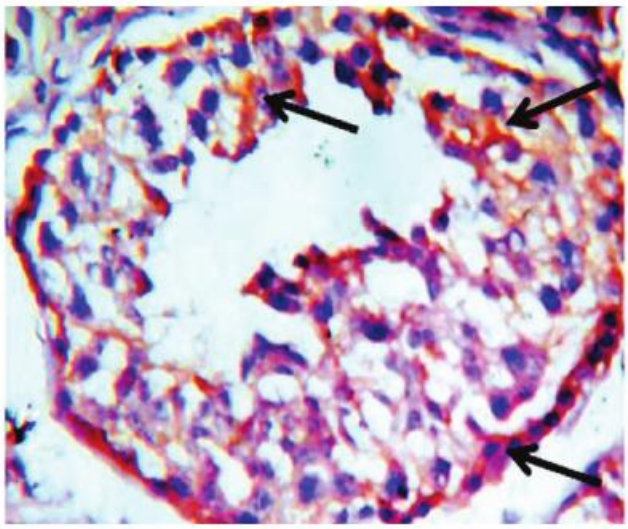
www.SID.ir

Archive of SID

می‌دهد که این چنین اثرات زیستی گرلین ممکن است تحت شرایط داخل بدنی ایجاد شود.

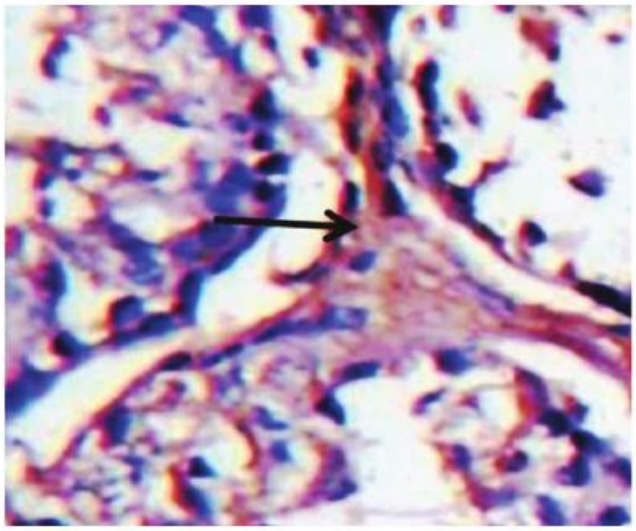
بریکان یاکان (۲۰۱۱) پیشنهاد کرد که گرلین به‌وسیله اعمال موضعی و یا عمومی به‌عنوان تنظیم کننده عملکرد گنادی ممکن است در پایش دقیق تعادل انرژی و تولیدمثل نقش داشته باشد.

مشاهدات نشان می‌دهد که گرلین می‌تواند اسپرماتوژنز را به روش اتوکرین و یا پاراکرین تنظیم کند، همچنین به خاطر شواهدی که وجود دارد گرلین قادر به تنظیم اعمال کلیدی بیضه‌ای، از جمله بیان ژن لوله اسپرم‌ساز، ترشح تستوسترون و تکثیر یاخته لایدیگ می‌باشد. علاوه‌براین، در موش صحرایی ثابت شده گرلینی که در یاخته‌های لایدیگ و سرتولی موقعیت‌یابی شده است دارای خواص پاداکسنده قابل‌توجه است که می‌تواند در دیگر گونه‌ها بررسی شود (۱۰).



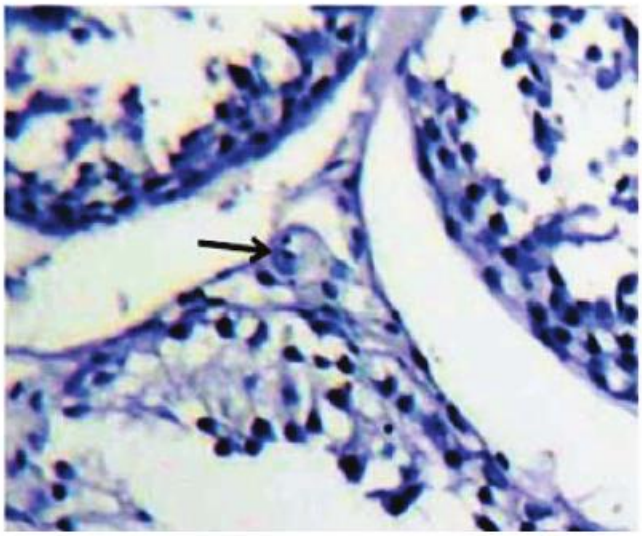
شکل ۳- مقطع عرضی بافت بیضه قوچ ۲ ساله (۴۰۰×)

نمونه آزمایشی: نمونه خوابانده شده با پادگن تک دودمانی اختصاصی ضد گرلین تهیه شده از موش. رنگ قهوه‌ای روشن در یاخته‌های زایا، سرتولی، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه نشان دهنده واکنش مثبت ایمنوپروکسیداز می‌باشد.



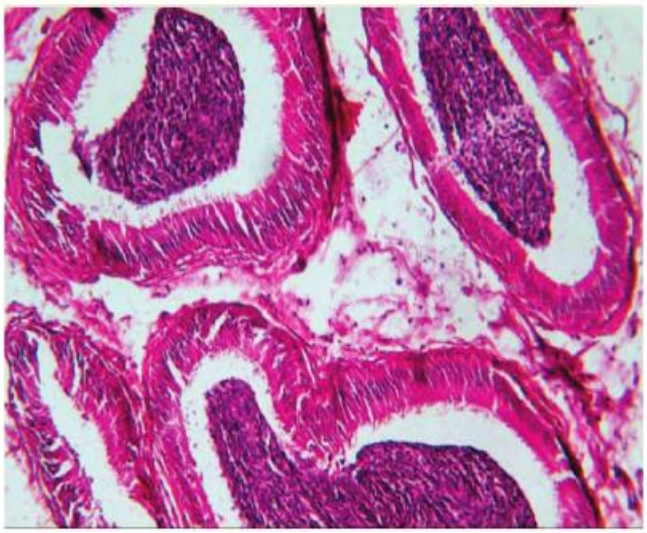
شکل ۵- مقطع عرضی بافت بیضه قوچ ۲ ساله (۴۰۰×)

نمونه آزمایشی: نمونه خوابانده شده با پادگن تک دودمانه اختصاصی ضد گرلین تهیه شده از موش. رنگ قهوه‌ای تیره در یاخته‌های لایدیگ نشان دهنده واکنش مثبت ایمنوپروکسیداز می‌باشد. شدت واکنش ایمنی در یاخته‌های لایدیگ نسبت به سایر بافت‌ها خیلی بیشتر است.



شکل ۴- مقطع عرضی بافت بیضه قوچ ۲ ساله (۴۰۰×)

کنترل منفی: نمونه خوابانده شده با سرم خرگوشی به جای پادگن اولیه. عدم رنگ قهوه‌ای در یاخته‌های لایدیگ نشان دهنده منفی بودن واکنش ایمنوپروکسیداز است.



شکل ۶- مقطع عرضی بافت اپیدیدیم قوچ ۲ ساله (۱۰۰ ×)

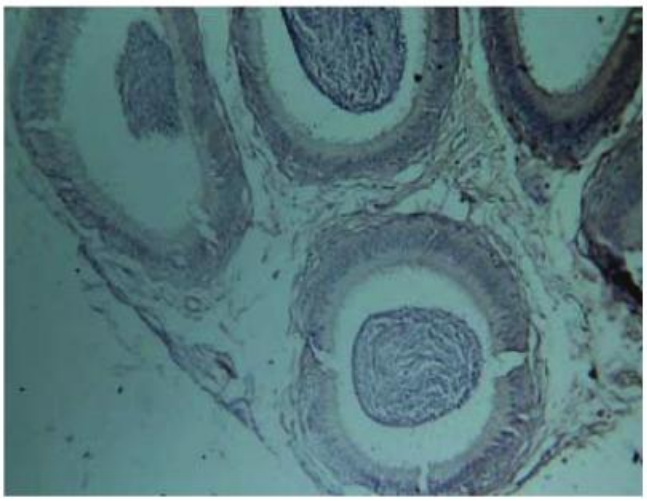
مقطع عرضی بافت معمولی اپیدیدیم قوچ تهیه شده با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین-هماتوکسیلین.

www.SID.ir

Archive of SID

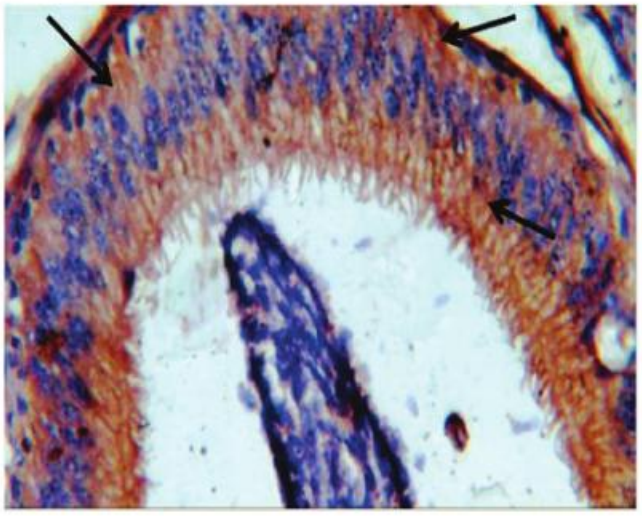
ماریه فلیکس (۲۰۱۰) اظهار کرد که در صورت تعادل منفی انرژی، گرلین می‌تواند یکی از هورمون‌های مهم مسئول برای سرکوب محور تولیدمثلی جنس نر در هر دو سطوح هورمونی و مولکولی باشد. بنابراین، گرلین، می‌تواند به‌عنوان رابطی بین هم ایستایی انرژی و توانایی تولیدمثلی در موش‌های صحرایی نر بالغ در نظر گرفته شود.

مورتی و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که قبل از اینکه اسپرم‌ها به اپیدیدیم برسند آنها با گرلین مواجه می‌شوند که ممکن است تغییرات پس گندی اسپرم، از جمله تحرک، اتصال و نفوذ به تخم را تحت تأثیر



شکل ۷- مقطع عرضی بافت اپیدیدیم قوچ ۲ ساله (۱۰۰ ×)

کنترل منفی: نمونه انکوبه شده با سرم خرگوشی به جای آنتی‌بادی اولیه. عدم رنگ قهوه‌ای در یاخته‌های اپیتلیوم سر اپیدیدیم نشان دهنده منفی بودن واکنش ایمنوپروکسیداز است.



شکل ۸- مقطع عرضی بافت اپیدیدیم قوچ ۲ ساله (۴۰۰×)

نمونه آزمایشی: نمونه انکوبه شده با آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی ضد گرلین تهیه شده از موش. رنگ قهوه‌ای در یاخته‌های اپیتلیوم سر اپیدیدیم نشان دهنده واکنش مثبت ایمنوپروکسیداز می‌باشد.

قرار دهد. گرلین توسط روش ایمونوفلورسنس در اسپرم انزالی انسان شناسایی شد. گرلین در طول دم و سر اسپرم، اما در نواحی مختلف بافت شد. این نتایج جدید نشان می‌دهد که اسپرم انسان احتمالاً گیرنده‌هایی برای گرلین دارد. همچنین وجود GHSR-1a (گیرنده گرلین) در گلژی و تاژکتین اسپرماتیدها و نواحی آکروزومی یا غشای یاخته‌ای سر اسپرم اپیدیدیمی موش صحرایی را گزارش کردند.

در بیضه انسان و موش صحرایی اسپرماتوسیت‌ها گرلین و GHSR-1a را بیان کرده‌اند و دیگر نویسندگان پیشنهاد کرده‌اند که گرلین می‌تواند فعالیت اسپرماتوژنز را از طریق یاخته‌های لایدیگ تحت تأثیر قرار دهد و ممکن است به‌عنوان تنظیم کننده موضعی در عملکرد اسپرماتوژنیک عمل کند (۶).

با بررسی نمونه‌های تهیه شده ظهور رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره در مقاطع بافتی نشان از واکنش مثبت ایمنوپراکسیداز در نمونه‌های بافتی تهیه شده بود. این نتایج با نتایج سایر محققیق که وجود گرلین را در مراحل اسپرماتوژنز، یاخته‌های سرتولی و یاخته‌های لایدیگ در انسان (۱۰) شناسایی کرده بودند موافق بود، اما با نتایج باریرو (۱) و تناسمپر (۱۳) که گرلین را فقط در یاخته‌های لایدیگ بالغ موش صحرایی شناسایی کرده بودند و گزارش کرده‌اند که گرلین ضرورتاً در یاخته‌های لایدیگ وجود دارد، مخالف بود. لوکازیک و همکاران (۲۰۰۹) به بیان گرلین، گیرنده‌های عملکردی آن و روتوشت‌های آنها در برون پوش زایای موش صحرایی به یاخته‌های اسپرماتوگونی، جدا از یاخته‌های لایدیگ، به‌عنوان محل ساخت و عمل آنها اشاره می‌کنند.

براساس یافته‌های این تحقیق حضور پادگن گرلین در یاخته‌های لایدیگ، یاخته‌های سرتولی، یاخته‌های زایا و یاخته‌های اپیتلیوم سر اپیدیدیم مورد تأیید قرار گرفت.

اگر چه این یافته‌ها به‌تنهایی وجود رابطه بین گرلین و باروری را ثابت نمی‌کند، این نتایج راه را برای شناخت نقش گرلین در یاخته‌های بیضه‌ای، اسپرماتوژنز و در نهایت باروری در قوچ نر کردی هموار می‌کند.

منابع مورد استفاده

1. Barreiro, M.L., Gaytan, F. Caminos, J.E. Pinilla, L. Casanueva, F.F. Aguilar, E. Dieguez, C. (2002). Cellular Location and Hormonal Regulation of Ghrelin Expression in Rat Testis. *Journal. Biology of Reproduction*. Vol, 67. pp: 1768–1776.

2. Barreiro, M.L., Tena-Semper, M.T. (2004). Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol, 226. pp: 1–9.

3. Falken, Y. (2013). Effect of Endogenous and Exogenous Ghrelin on Gastrointestinal Function in Rat and Human. PhD thesis, department of clinical sciences, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. pp:1-60.

4. Ishikawa, T., Hitoshi, F. Takeshi, I. Atsushi, T. Masato, F. (2007). Ghrelin Expression in Human Testis and Serum Testosterone Level. *Journal of Andrology*. Vol. 28. No. 2. pp:320-4

5. Kheradmand, A., Omid, D. Masoud, A. Bahram, R. (2012).

www.SID.ir

Archive of SID

for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep. *Journal of Reproductive Biology and Endocrinology* Vol. 3, No. 60. pp:1-14.

10. Moretti, E., Vindigni, C., Tripodi, S.A., Mazzi, L., Nuti, R., Figura, N., Collodel, G. (2013). Immunolocalisation of ghrelin and obestatin in human testis, seminal vesicles, prostate and spermatozoa. *Andrologia*. pp. 1–7.

11. Sakata, I., Takafumi, S. (2011). The Gut Peptide Hormone Family, Motilin and Ghrelin. Book. Update on Mechanisms of Hormone Action – Focus on Metabolism, Growth 4 and Reproduction. pp.4-14.

12. Sato, T., Nakamura, Y. Shimura, Y. Ohgusu, H. Kangawa, K. Kojima, M. (2011). Structure, regulation and function of ghrelin. *Journal of Biochemistry*. Vol. 151. No. 2. pp: 119-128.

13. Tena-Sempere, M. (2008). Ghrelin and reproduction: ghrelin as novel regulator of the gonadotropic axis. *Vitamins and Hormones*. Vol. 77. pp: 285-300.

14. Yakan, B. (2011). A Concise Review: Ghrelin and Reproductive System. *Erciyes Medical* Vol. 33, No.4. pp:317-320.

Ghrelin modulates testicular germ cells apoptosis and proliferation in adult normal rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol. 419. pp: 299–304.

6. Lukasyk, A., Ludmila, R., Piotr, S., Aldona, K., Karolina, O., Marcin, Rucinski., Marek, R., Jerzy, S. (2009). Immunohistochemical and hybridocytochemical study on ghrelin signalling in the rat seminiferous epithelium. *Journal of Folia Histochemica Et Cytobiologica*. Vol. 47, No. 3. pp: 5-423.

7. Lukasyk, A., Malgorzata, K., Anna, J., Aldona, K., Marcin, R., Karolina, S., Agnieszka, Z., Piotr, S., Marek, R. (2012). Expression of ghrelin receptor (GHSR-1a) in rat epididymal spermatozoa and the effects of its activation. *Reproduction biology* Vol. 12, Pp. 293-300.

8. Marie-Felix, A. (2010). Circulating Ghrelin Concentrations During the Transition Period of Dairy Cattle and the Associated Relationship with Milk Production. Thesis, Veterinary Science, the university of Arizona.

9. Miller, D.W., Joanne, L.H., Yvonne, A.B., Una, D., Alanna, L., Clare, L.A., Richard, G.L. (2005). Immunohistochemical evidence

www.SID.ir