Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۵ تابستان ۱۳۹۶
DOI: 10.22034/vj.2017.109238

موقعیت‌یابی ایمونوهیستوشیمی گرلین در بافت بیضه بز

• **کیفسان منصوری**
فارغ التحصیل کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام از دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج
• **برهان شکراللهی (نویسنده مسئول)**
استادیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج
تاریخ دریافت: مهر ۹۴ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۹۵
Email: Borhansh@gmail.com

چکیده

هدف از این مطالعه موقعیت‌یابی ایمونوهیستوشیمی گرلین در بافت بیضه بز نر بود. گرلین، پپتید ۲۸ اسید آمینه‌ای آسیله شده، به‌عنوان لیگاند اندوژنوسی برای گیرنده ترشحی هورمون رشد شناسایی شده بود. اخیراً نقش گرلین در تولیدمثل گزارش شده است. در این تحقیق موقعیت‌یابی ایمونوهیستوشیمی گرلین در بافت‌های بیضه بز نر، با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال موشی ضد گرلین به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی پلی‌کلونال الاغی ضد ایمونوگلوبین G (HRP) به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های بافتی از سه بز نر (۲-۱ ساله) جمع‌آوری شد و برای آزمایش IHC در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شد. سپس بلوک‌های پارافینی و مقاطع بافتی برای آزمایش IHC تهیه شد. واکنش ایمنی در اسپرماتوژنز، سلول‌های لایدیگ و سرتولی مشاهده شد. عقیده بر این است که محل بیان گرلین در مراحل اسپرماتوژنز، سلول‌های لایدیگ و سرتولی ممکن است نقش آن را در تنظیم موضعی نشان دهد. این تحقیق یکی از اولین تحقیقاتی است که شواهد مولکولی را برای وجود گرلین در بافت بیضه‌ای بز نر سالم فراهم کرده است.

کلمات کلیدی: گرلین، سلول لایدیگ، سلول سرتولی، بیضه، بز نر

www.SID.ir

Archive of SID

• Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 185-193

Immunohistochemical Localization of Ghrelin in Goat Testicular Tissue

By: Mansori, K., MSc of Animal Physiology, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Kurdestan, Iran. and Shokrollahi, B., Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Kurdestan, Iran.
Email: Borhansh@gmail.com

Received: 2015-10-16 Accepted: 2016-04-25

The aim of the present study was to investigate the immunohistochemical localization of ghrelin in testicular tissues of male goat. Ghrelin, a 28-amino acid acylated peptide, has been identified as an endogenous ligand for GH secretagogue receptor and the role of ghrelin in reproduction has been recently established. The immunohistochemical localization of ghrelin in male goat testicular tissues was performed using mouse monoclonal anti-ghrelin antibody as primary antibody and donkey anti-rabbit IgG (HRP) Polyclonal antibody as secondary antibody. Samples of testis were collected from three male goats (1.5 to 2-years old), and were kept in 10% Formalin for IHC test. Then paraffin blocks and histological sections were prepared. Immunoreactions were observed in spermatogenesis process, Leydig and sertoli cells. It is believed that the site of ghrelin expression in stages of spermatogenesis, Leydig and sertoli cells may indicate its role in local regulations. This is one of the first studies to provide molecular evidence for the presence of ghrelin within the entire testicular tissues of male goat.

Key words: Ghrelin, leydig cell, sertoli cell, testis, male goat

مقدمه

هورمون‌های اندوکرین ترشحاتی از غدد داخلی هستند که به داخل گردش خون جهت تنظیم فیزیولوژی چندگانه بدن، ریخته می‌شوند. در چند دهه گذشته، هورمون‌هایی از دستگاه گوارش شناسایی و جداسازی شده‌اند و اعمال فیزیولوژیکی آنها مطالعه شده است (۱۰). اگر چه در مطالعات اولیه غده هیپوفیز به‌عنوان غده اصلی اندوکرین بدن مورد نظر بوده است، اندام‌های دیگری نیز مانند بافت چربی، غده آدرنال، دستگاه گوارش و دستگاه تولیدمثل وجود دارند که هورمون‌های اندوکرینی تولید می‌کنند (۱۰). در میان آن‌ها، دستگاه گوارش از لحاظ حجم بزرگ‌ترین اندام اندوکرین بدن است و هورمون‌های تولید شده در دستگاه گوارش در رشد، نمو، کارکرد قلب و عروق، حرکت معده، رفتار و حفظ همئوستازی انرژی دارای اهمیت فیزیولوژیکی می‌باشد (۱۰). هورمون‌های زیادی در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش شناسایی شده‌اند (۱۰). برای مثال در معده، گاسترین و هیستامین، سوماتواستاتین، نوروپپتید 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 در روده تولید می‌شوند (۱۰). بیش از ۳۰ هورمون پپتیدی مختلف از دستگاه گوارش ترشح می‌شوند و بسیاری از آن‌ها حرکت دستگاه گوارش و همچنین همئوستازی انرژی را تنظیم می‌کنند (۳).

یاکان و همکاران (۲۰۱۱) نشان داده‌اند که سیستم نوروآندوکرین کنترل رشد سوماتیک، تعادل انرژی و تولیدمثل به‌طور 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 سیگنال‌های مولکولی مسئول برای چنین کنترل دقیقی اخیراً آغاز شده است. با توجه به اطلاعات موجود می‌توان استنباط کرد که گرلین ممکن است گزینه خوبی برای تنظیم سیستم نروآندوکرین باشد (۱۳).

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 به‌ویژه اتصال به گیرنده ضروری است. ژن گرلین در انسان روی کروموزوم ۳ واقع شده است (۱۱). این ژن از ۴ اگزون و ۳ اینترون تشکیل شده است و پروتئین بالغ توسط اگزون‌های ۱ و 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 عمدتاً توسط سلول‌های درون ریز مخاط ترشح کننده اسید معده که سلول‌های X/A نامیده می‌شوند، ساخته می‌شود (۱۱). 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 کنترل آن از مسیر سوماتواستاتین و هورمون آزاد کننده هورمون رشد که از هورمون‌های اصلی تنظیم هورمون رشد محسوب می‌شود، متفاوت است (۲). برخی از مطالعات نشان داده‌اند که گرلین موجب افزایش و تقویت

www.SID.ir

Archive of SID

تعداد پالس‌های ترشح هورمون رشد می‌شود، این کار با توانایی گرلین در بسیج کلسیم در سلول‌های هدف گیرنده‌های GHS-R1a و در نهایت ترشح هورمون رشد صورت می‌گیرد (۲). این هورمون در تنظیم اشتها نیز موثر است به‌گونه‌ای که با تحریک نوروپپتید هیپوتالاموسی اورکسین، اشتها را افزایش داده و افزایش وزن و چاقی را نیز به‌دنبال خواهد داشت (۲).

اخیراً مشخص شده است که گرلین ممکن است در کنترل محور گنادی نقش داشته باشد. یکی از رویه‌های تولیدمثلی گرلین که اولین بار ارزیابی شد، وجود گرلین و اعمال آن در گنادهای جنس نر می‌باشد (۱۳). شواهد روز افزون نشان می‌دهد که گرلین در سطوح مختلف محور گونادوتروپیک و نیز در دیگر بافت‌های تولیدمثلی بیان می‌شود یا عمل می‌کند (۲). اثرات مستقیم گسترده گرلین روی سیستم تولیدمثلی هنوز ناشناخته است. به‌نظر می‌رسد گرلین اثرات فرا گنادی روی سیستم تولیدمثلی داشته باشد. مشخص شده است که گرلین ترشح LH را مهار و پاسخ به GnRH را در شرایط آزمایشگاهی کاهش می‌دهد، درصورتی که ترشح FSH را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد (۱۳) همچنین گرلین نقش تنظیم کننده‌ای در شکل‌گیری جنین دارد بدین ترتیب که به‌عنوان پیامبرهای شیمیایی برای ارتباطات داخل سلولی درطی مراحل مختلف رشد جنین عمل می‌کند (۷). علاوه‌براین گرلین ممکن است در کنترل ترشح پرولاکتین دخیل باشد و اثرات تحریک کننده گرلین روی سطوح پرولاکتین سرم انسان بالغ ثابت شده است و گزارش شده است که گرلین ترشح پرولاکتین را در موش صحرایی مهار می‌کند (۷). گرلین به‌طورقابل توجهی قادر به مهار ترشح تستوسترون در روش وابسته به دز (تزریق سطوح مختلف گرلین) می‌باشد (۲). درواقع گرلین به‌طور مساوی گنادوتروپین جفتی انسان (hCG) وcAMP القاء کننده ترشح تستوسترون را کاهش می‌دهد. مشخص شده است که این عمل بازدارندگی باید در مرحله قبل از تشکیل cAMP اتفاق بیافتد. اثر مهاری گرلین روی ترشح تستوسترون با کاهش قابل توجه چندین فاکتور کلیدی در مسیر سنتز استروئید از قبیل پروتئین حاد تنظیم کننده استروئید (StAR) و آنزیم‌های شکننده زنجیره جانبی P450، ۳بتا-هیدروکسیل استروئید هیدروژناز (HSD) و نوع سوم ۱۷ بتا HSD مربوط است (۲). علاوه‌بر اثرات استروژنیک، گرلین ممکن است به‌طور مستقیم اعمال لوله‌های اسپرم‌ساز را تنظیم کند (۲). گرلین و گیرنده‌های آن (GHS-R1a) در اندام‌های تولیدمثلی یافت شده‌اند. گرلین نه تنها در معده و سایر بخش‌های روده بلکه در تمام بافت‌های مورد مطالعه از جمله، غده آدرنال، پستان، مخاط دهانی، مری، لوله رحمی، بافت چربی، کیسه صفرا، لنفوسیت‌های انسانی، کبد، ریه، غدد لنفاوی، ماهیچه، قلب، پانکراس، هیپوفیز، پوست، طحال، جفت، پروستات، تخمدان و بیضه یافت شده است (۱۳). حضور گرلین و گیرنده‌های آن در تخمدان انسان، بز، خوک و ماکیان، سلول‌های سوماتیک فولیکولی، سلول‌های بینابینی هیلوس انسان به‌وسیله تکنیک ایمونوهیستوشیمی ثابت شده است (۷).

برخی مولکول‌ها نقش مهمی در کنترل بالانس انرژی و تولیدمثل به‌وسیله عمل روی محور نوروآندوکرین و نیز در کنترل موضعی وقایع بیضه از جمله مکانیسم اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز دارند. لپتین مثالی از مولکول‌هایی است که روی هیپوتالاموس و بیضه عمل می‌کند، بااین‌حال، گرلین به‌عنوان آنتاگونیست عملکردی لپتین شناسایی شده است. علاوه‌براین مشخص شده است که گرلین اثرات آنتاگونیستی نسبت به فاکتور القاء کننده و تکثیر سلولی سلول زایا دارد. در بیضه گرلین به‌طور ویژه‌ای از فعالیت تکثیری سلول‌های لایدیگ بالغ، به‌وسیله تنظیم کاهشی بیان ژن فاکتور بنیادی سلول جلوگیری می‌کند (۶).

گرلین در سلول‌های لایدیگ، لوله‌های اسپرم‌ساز و سلول‌های سرتولی بیضه انسان شناسایی شده است. تعداد سلول‌های لایدیگی که واکنش ایمنی گرلین را نشان داده بودند نسبت به تعداد کل سلول‌های لایدیگ در افرادی که غلظت تستوسترون کمتری داشتند، بیشتر بود. در بیضه موش واکنش ایمنی گرلین در سلول‌های لایدیگ موقعیت‌یابی شده بود اما گیرنده GHS-RA۱ در هردوی سلول‌های لایدیگ وسرتولی شناسایی شده بود (۴).

بیان GHS-RA۱ در مجاری اسپرم ساز نشان می‌دهد که اپیتلیوم 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 آپوپتوز را در بیضه موش کنترل کند (۵).

لوکازیک و همکاران (۲۰۰۹) بیان پروتئین GHS-RA۱ در گلژی و آکروزوم‌های اسپرماتیدها و نواحی آکروزوم یا غشای سلولی سر اسپرم اپیدیدیمی را تأیید کرده اند. غلظت ۱۰-۶ میلی لیتر در لیتر گرلین، یون آزاد کلسیم داخل سلولی را در اسپرم موش افزایش داده است. بیان گیرنده GHS-RA۱ در اسپرم و نیز اثر گرلین روی جنبایی اسپرم و غلظت یون کلسیم داخل سلولی نشان می‌دهد که این چنین اثرات بیولوژیکی گرلین ممکن است تحت شرایط داخل بدنی ایجاد شود.

با توجه به اینکه تا اکنون گرلین در بیضه بز موقعیت‌یابی نشده است، هدف از تحقیق حاضر موقعیت‌یابی ایمونوهیستوشیمی گرلین در بافت بز نر می باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌برداری بافتی بیضه از ۵ دام ۴-۱ ساله کشتار شده در کشتارگاه دام سنندج انجام گرفت. نمونه‌ها که شامل قسمت‌های سر، بدنه، دم اپیدیدیم، قسمت مرکزی و حاشیه‌ای بافت بیضه به ابعاد ۱×۰/۵×۰/۵ سانتی متر بود، تهیه شد و نمونه‌ها بعد از قرار گرفتن در یونیکاست‌های پلاستیکی به مدت ۲۴ ساعت در محلول فیکساتیو بوئن (۷۵ ml اسید پیکریک اشباع شده، ml۲۵ فرمالین تجاری و ml ۵ اسید استیک گلاسیال) قرار گرفت. بعد از مراحل آبگیری (قرار دادن اسلایدها در الکل‌های با درجات مختلف، الکل مطلق، ۹۵، ۸۰، ۷۰ و ۵۰ درجه و در هر کدام به مدت سه دقیقه قرار داده شد)، شفاف‌سازی، آغشته‌سازی با پارافین، قالب‌گیری، بلوک‌های پارافینی تهیه شد و مقاطع بافتی به ضخامت ۵-۴ میکرون توسط دستگاه میکروتوم تهیه و برروی لام‌های آغشته شده به چسب سیتولوژی فیکس شدند.

روش ایمونوهیستوشیمی

ابتدا مقاطع بافتی پارافینی در گرمخانه ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. لام‌ها با استفاده از زایلین دپارافینه و با آب جاری شستشو داده شدند و سپس توسط الکل اتیلیک با درجات مختلف آبدهی شده و دوباره با آب جاری به مدت ۲ دقیقه شستشو داده شدند.

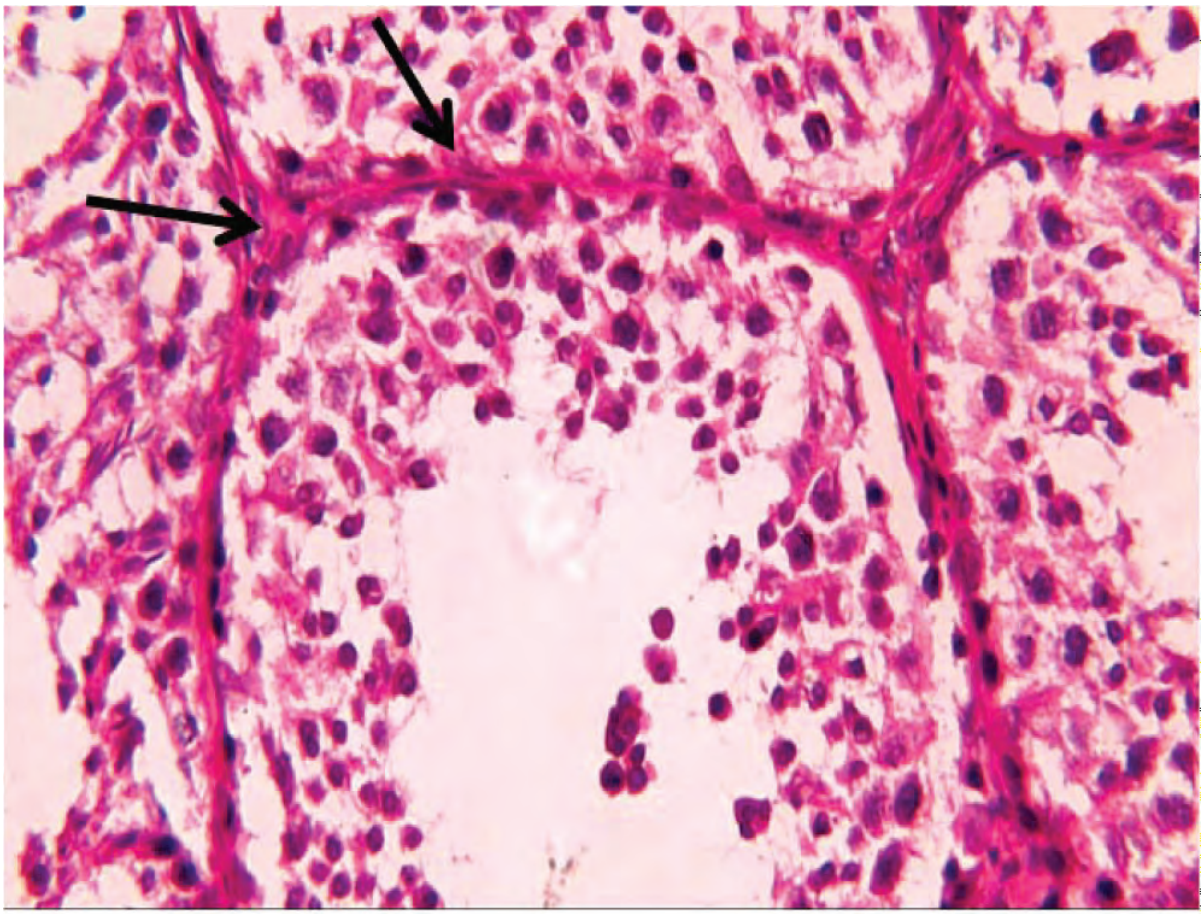
www.SID.ir

Archive of SID

سپس با محلول PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. لام‌ها در H_2O_2 ۳ درصد در PBS برای غیرفعال شـــدن فعالیت پروکســـیداز اندوژنوسی به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند. لام‌ها در PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. ســـپس لام‌ها جهت بازیابی آنتی‌ژن با استفاده از بافر سیترات ((۱۰ mM ,PH=۶ درآون مایکروویـــو در حداکثر قـــدرت به مدت ۵ دقیقه قرار داده شـــدند و این کار سه بار تکرار شد. سپس لام‌ها در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شـــدند تا خنک شـــوند. 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 آنتی‌بادی اولیه (پلی‌کلونال آنتی بادی تولید شده در موش از شرکت Abbiotec) رقیق شد به نسبت ۱ به ۲۰۰ در PBS حـــاوی ۱ درصد BSA در اتاق مرطوب در دمای ۴ درجه ســـانتی گراد به مدت یک شبانه روز خوابانده شدند. لام‌ها در PBS برای ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشـــو داده شدند. لام‌ها با آنتی‌بادی ثانویه (آنتی بادی پلی‌کلونال ضدIgG موش از شـــرکت Abbiotec) کونژوگه شده با HRP رقیق شـــده در PBS به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه خوابانده شدند. لام‌ها در PBS به مدت ۱۰ دقیقه شستشـــو داده شـــدند. بعد جهت نمایان کردن واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی از محلول سوبسترای دی‌آمینوبنزیدین (DAB) در H_2O_2 به مدت ۶-۴ دقیقه استفاده شد. لام‌ها در آب جاری شستشو داده شدند. از محلول رنگ‌آمیزی زمینه هماتوکسیلین استفاده شد. سپس لام‌ها توســـط الکل اتیلیک آبگیری و شفاف‌سازی شدند و با قرار دادن یک قطره چسپ سیتولوژی روی لام و گذاشتن لامل، عمل مونته کردن انجام و برای بررســـی اسلایدها از میکروسکوپ نوری اســـتفاده شد. با بررسی نمونه‌های تهیه شـــده، ظهور رنگ قهوه‌ای روشـــن تا تیره در مقاطع بافتی نشـــان از واکنش ایمونوپراکسیداز در نمونه‌های بافتی تهیه شده بود.

نتایج و بحث

با توجه به یافته‌های به‌دســـت آمده می‌تـــوان گزارش نمود که آنتی‌ژن گرلین در فرایند اســـپرماتوژنز، ســـلول‌های لایدیگ و سلول‌های سرتولی



شکل۱- مقطع عرضی بافت بیضه بز ۲ ساله (۴۰۰ ×)

مقطع عرضی بافت معمولی بیضه بز تهیه شده با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین-هماتوکسیلین. فلش‌ها نشان دهنده سلول‌های لایدیگ و سرتولی می‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

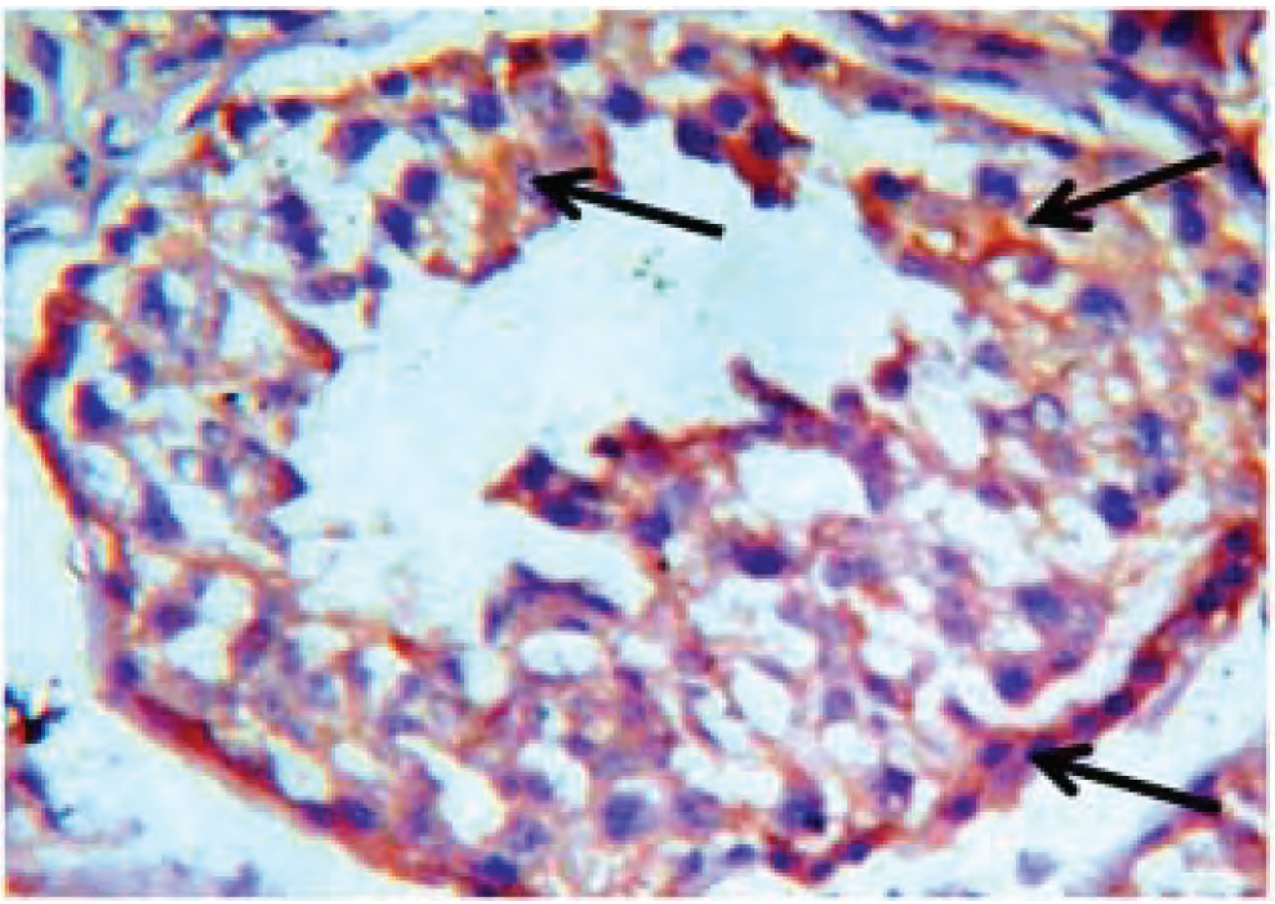
قابل‌ردیابی و شناسایی است. واکنش ایمونوپروکسیداز در سیتوپلاسم سلول‌های لایدیگ و سرتولی مشاهده شد (شکل ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶). لازم به ذکر است که شدت رنگ‌پذیری واکنش ایمونوپروکسیداز در سلول‌های لایدیگ (شکل ۶) نسبت به دیگر بافت‌ها خیلی شدید بود و شدت واکنش در سلول‌های سرتولی و مراحل اسپرماتوژنز مشابه هم بود (شدت رنگ‌پذیری که قابل مشاهده است). به‌نظر می‌رسد که هر کدام از سلول‌ها می‌توانند به‌طور متفاوت در سنتز گرلین شرکت کنند. احتمالاً گرلین موجود در این سلول‌ها به‌طور موضعی یا به روش اتوکرین / پاراکرین عملکرد این سلول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اگر چه وجود گرلین در بیضه گونه‌های مختلف (انسان، گوسفند و موش صحرایی) گزارش شده است اما حضور گرلین در دستگاه تناسلی بز نر برای اولین بار گزارش می‌گردد.

بیان GHS-RA۱ در مجاری اسپرم‌ساز نشان می‌دهد که اپیتلیوم 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 آپوپتوز را در بیضه موش کنترل کند (۵).

لوکازیک و همکاران (۲۰۰۹) بیان پروتئین GHS-RA۱ در گلژی و آکروزوم‌های اسپرماتیدها و نواحی آکروزوم یا غشای سلولی سر اسپرم اپیدیدیمی را تأیید کردند. بیان گیرنده GHS-RA۱ در اسپرم و نیز اثر گرلین روی جنبایی اسپرم و غلظت یون کلسیم داخل سلولی نشان می‌دهد که این چنین اثرات بیولوژیکی گرلین ممکن است تحت شرایط داخل بدنی ایجاد شود.

بریکان یاکان (۲۰۱۱) پیشنهاد کرد که گرلین به‌وسیله اعمال موضعی و یا سیستمیک به‌عنوان تنظیم کننده عملکرد گنادی ممکن است در کنترل 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 در لوله

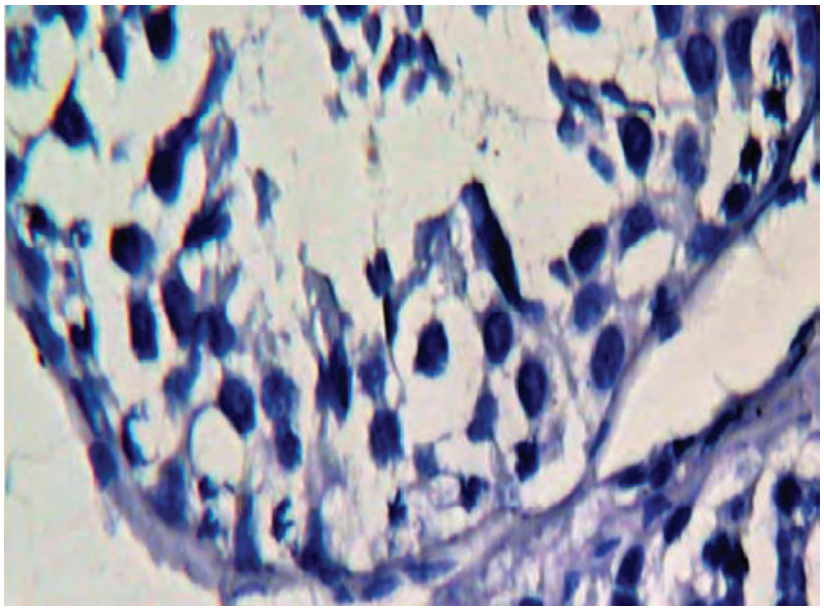


شکل۲- مقطع عرضی بافت بیضه گوسفند ۲ ساله (×۴۰۰)

کنترل مثبت: نمونه انکوبه شده با آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی ضد گرلین تهیه شده از موش. رنگ قهوه‌ای روشن در فرآیند اسپرماتوژنز (سلول‌های مائیوئید، سرتولی، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه) نشان دهنده واکنش مثبت ایمونوپروکسیداز می‌باشد.

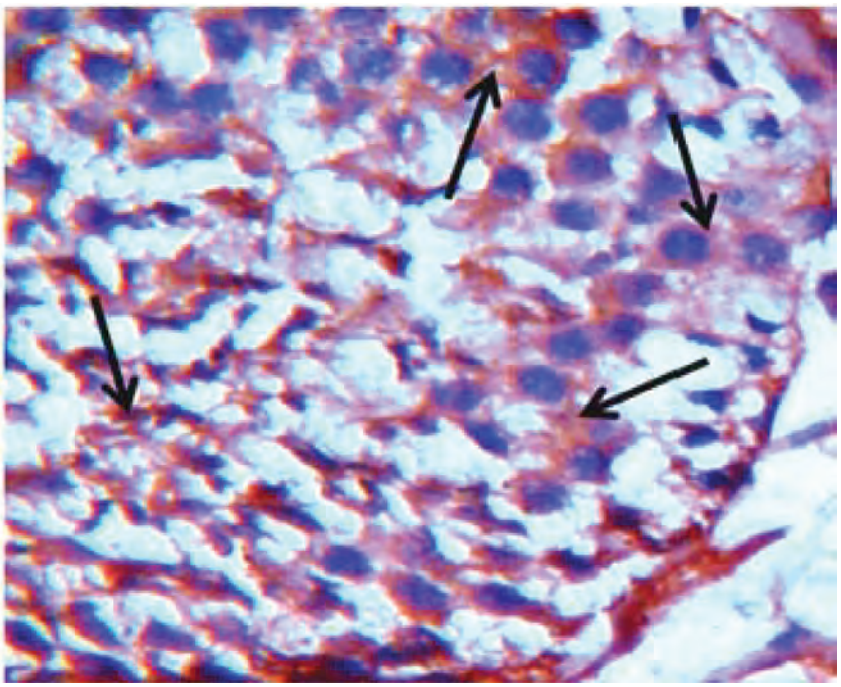
www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳- مقطع عرضی بافت بیضه بز ۲ ساله (۴۰۰ ×)

کنترل منفی: نمونه انکوبه شده با سرم خرگوشی به جای آنتی‌بادی اولیه. عدم ایجاد رنگ قهوه‌ای در سلول‌های لایدیگ نشان دهنده منفی بودن واکنش ایمونوپروکسیداز است.

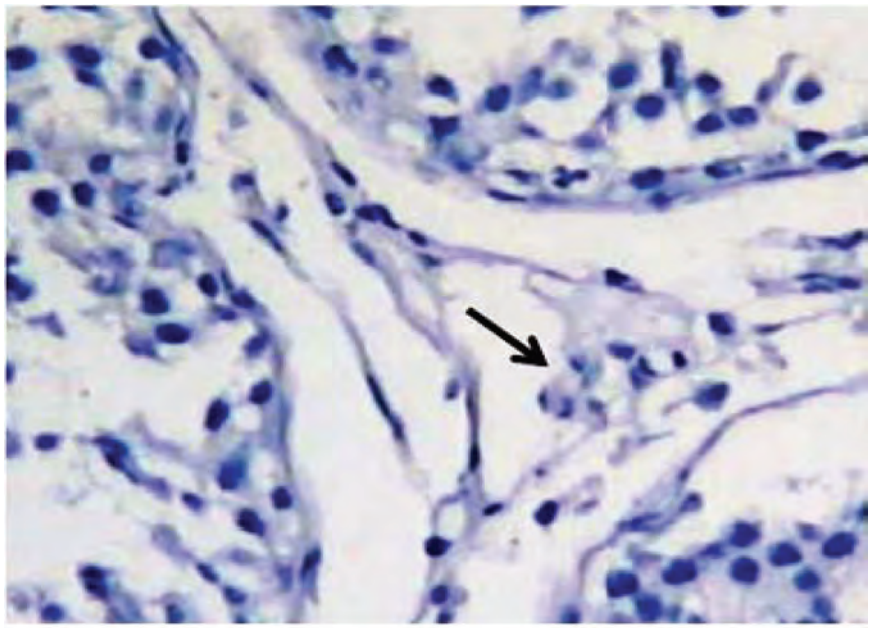


شکل۴- مقطع عرضی بافت بیضه بز ۲ ساله (۴۰۰ ×)

نمونه آزمایشی مقطع عرضی بافت بیضه بز: نمونه انکوبه شده با آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی ضد گرلین تهیه شده از موش. رنگ قهوه‌ای در سلول‌های سرتولی و مراحل اسپرماتوژنز نشان دهنده واکنش مثبت ایمونوپروکسیداز می‌باشد.

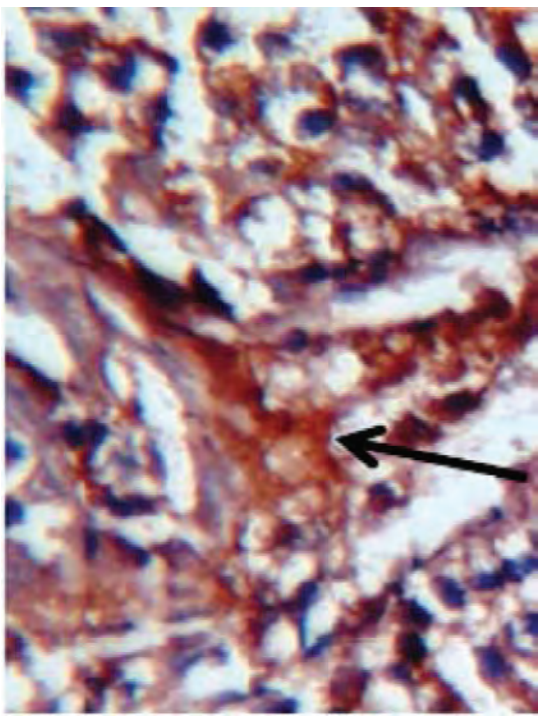
www.SID.ir

Archive of SID



شکل۵- مقطع عرضی بافت بیضه بز ۲ ساله (۴۰۰ ×)

کنترل منفی: نمونه انکوبه شده با سرم خرگوشی به جای آنتی‌بادی اولیه. عدم ایجاد رنگ قهوه‌ای در سلول‌های لایدیگ نشان دهنده منفی بودن واکنش ایمونوپروکسیداز است.



شکل۶- مقطع عرضی بافت بیضه بز ۲ ساله (۴۰۰ ×)

نمونه آزمایشی مقطع عرضی بافت بیضه بز: نمونه انکوبه شده با آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی ضد گرلین تهیه شده از موش. رنگ قهوه‌ای شدید در سلول‌های لایدیگ نشان دهنده واکنش مثبت ایمونوپروکسیداز می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

اسپرم‌ساز، ترشح تستوسترون و تکثیر سلول لایدیگ می‌باشد. علاوه‌براین، در موش صحرایی ثابت شـــده است که گرلینی که در سلول‌های لایدیگ و ســـرتولی موقعیت‌یابی شده است، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی است که می‌تواند در دیگر گونه‌ها بررسی شود (۹).

احمد حنا (۲۰۱۰) نشان داد که در صورت تعادل منفی انرژی، گرلین می‌تواند یکی از هورمون‌های مهم مســـئول برای سرکوب محور تولیدمثلی جنـــس نر در هر دو ســـطوح هورمونی و مولکولی باشـــد. بنابراین، گرلین، می‌تواند به‌عنوان رابطی بین هموســـتازی انـــرژی و توانایی تولیدمثلی در موش‌های صحرایی نر بالغ در نظر گرفته شود.

مورتی و همکاران (۲۰۱۳) نشـــان دادند که قبل از اینکه اســـپرم‌ها به اپیدیدیم برســـند، با گرلین مواجه می‌شـــوند که ممکن است تغییرات پس گنادی اسپرم، از جمله تحرک، اتصال و نفوذ به تخم را تحت تأثیر قرار دهد.

گرلین توســـط روش ایمونوفلورسنس در اسپرم انزالی انسان شناسایی شده است. گرلین در طول دم و سر اسپرم، اما در نواحی مختلف یافت شده اســـت. این نتایج جدید نشان می‌دهد که اسپرم انسان احتمالاً گیرنده‌هایی برای گرلین دارد.

مورتـــی و همـــکاران وجـــود GHS-RA۱ (گیرنده گرلیـــن) در گلژی و آکروزوم اســـپرماتیدها و نواحی آکروزومی یا غشـــای ســـلولی سر اسپرم اپیدیدیمی موش صحرایی را گزارش کردند.

در بیضه انســـان، موش صحرایی و گوســـفند اسپرماتوسیت‌ها گرلین و GHS-RA۱ را بیان کرده‌اند و برخی محققان پیشـــنهاد کرده‌اند که گرلین می‌تواند فعالیت اسپرماتوژنز را از طریق سلول‌های لایدیگ تحت تأثیر قرار دهد و ممکن است به‌عنوان تنظیم کننده موضعی در عملکرد اسپرماتوژنیک عمل کند (۶).

با بررســـی نمونه‌های تهیه شـــده، ظهور رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره در مقاطع بافتی نشـــان از واکنش مثبت ایمونوپراکسیداز در نمونه‌های بافتی تهیه شـــده بود. این نتایج با نتایج ســـایر محققین که وجـــود گرلین را در مراحل اســـپرماتوژنز، سلول‌های سرتولی و سلولهای لایدیگ در انسان (۹)، و گوســـفند (۸) شناســـایی کرده بودند، موافق بود، اما با نتایج باریرو (۱) و تناسمپر (۱۲) که گرلین را فقط در سلول‌های لایدیگ بالغ موش صحرایی شناســـایی کرده بودند و گزارش کرده‌اند که گرلین ضرورتاً در ســـلول‌های لایدیـــگ وجود دارد، مخالـــف بود. لوکازیک و همـــکاران (۲۰۰۹) به بیان گرلین، گیرنده‌های عملکردی آن و رونوشـــت‌های آنهـــا در اپیتلیوم زایای موش صحرایی به ســـلول‌های اســـپرماتوگونی، جدا از سلول‌های لایدیگ، به‌عنوان محل سنتز و عمل آنها اشاره کرده اند.

براســـاس یافته‌های این تحقیق حضور گرلین در ســـلول‌های لایدیگ، ســـلول‌های سرتولی و مراحل اســـپرماتوژنز مورد تأیید قرار گرفت. احتمالاً گرلین موجود در سلول‌های ســـرتولی و لایدیگ می‌تواند اسپرماتوژنز را به روش اتوکرین و یا پاراکرین تنظیم کند.

اگـــر چه این یافته‌ها به‌تنهایی وجود رابطه بین گرلین و باروری را ثابت نمی‌کند، این نتایج راه را برای شناخت نقش گرلین در سلول‌های بیضه‌ای، اسپرماتوژنز و در نهایت باروری در بز نر 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). 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). Immunohistochemicaland hybridocytochemical study on ghrelin signalling in the rat seminiferous epithelium. *Journal of Folia Histochemica Et Cytobiologica*. Vol. 47, No. 3.pp: 5-423.

7.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.

8.Miller, D.W., Joanne, L.H., Yvonne, A.B., Una, D., Alanna, L., Clare, L.A., Richard, G.L. (2005). Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role forghrelin in the reproductive tissues of sheep. *Journal of Reproductive Biology and Endocrinology* Vol. 3, No. 60. pp:1-14.

9.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.

www.SID.ir

Archive of SID

10.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.

11.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.

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

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

www.SID.ir