نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۳۹۹؛ ۱۴(۱):۷۳-۸۰.

موقعیت‌یابی ایمنوهیستوشیمیایی گرلین در بافت بیضه خروس

وریا غفوری[۱]، برهان شکراللهی[۲*]، علی‌اکبر امیری[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج- ایران.
۲. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج- ایران.
۳. مربی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج- ایران.

دریافت: ۱۷ مهرماه ۹۷ **پذیرش:** ۴ خردادماه ۹۸

چکیده

هدف از این مطالعه موقعیت‌یابی ایمنوهیستوشیمیایی (IHC) گرلین در بافت بیضه خروس بود. گرلین تنظیم‌کننده پلیوتروپیک گسترده اعمال اندوکرین و غیراندوکرین محسوب می‌شود. در پستانداران گزارش‌هایی در خصوص بیان گرلین و گیرنده‌های آن در گنادها، اثر گرلین بر کنترل عملکرد گنادها و نیز اثرات مستقیم گرلین بر کنترل ترشح بیضه‌ای و تکثیر سلولی وجود دارد، اما تاکنون بیان و یا نقش عمل-کردی گرلین در گنادهای گونه‌های غیر پستانداران بررسی نشده است. در این پژوهش موقعیت‌یابی ایمنوهیستوشیمیایی گرلین در بافت بیضه خروس با آنتی‌بادی مونوکلونال موشی ضد گرلین به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی پلی‌کلونال دانکی ضد ایمنوگلوبین G (HRP) به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه بررسی شد. نمونه‌های بافتی از ۵ خروس ۴۵ روزه جمع‌آوری شد و برای آزمایش IHC در فرمالین ۱۰ درصد نگه-داری شدند، سپس بلوک‌های پارافینی و مقاطع بافتی برای آزمایش IHC تهیه شد. ارزیابی ایمونوهیستوشیمیایی بیان گرلین در بیضه خروس نشان داد که واکنش ایمنی در سلول‌های زایا، سلول‌های لایدیگ و سلول‌های سرتولی مشاهده می‌شود. عقیده بر این است که بیان گرلین در سلول‌های زایا، سلول‌های لایدیگ و سلول‌های سرتولی ممکن است نقش آن را در تنظیم موضعی نشان دهد. این اولین مطالعه‌ای است که شواهد مولکولی را برای وجود گرلین در بافت بیضه خروس فراهم کرده است.

واژه‌های کلیدی: بیضه، سلول لیدیگ، سلول سرتولی، گرلین، خروس.

مقدمه

هورمون گرلین به طور غالب در بافت‌های معده، دئودنوم و ژژنوم ترشح می‌شود. مطالعات نشان داده است که تولید و ترشح گرلین در بافت‌های مختلف تحت تأثیر عوامل متابولیکی، تغذیه‌ای و هورمونی است. این هورمون در سطح هیپوتالاموسی، ترشح هورمون‌های رشد، LH، FSH، پرولاکتین، ACTH و وازوپرسین را تنظیم می‌کند، وجود گرلین و گیرنده آن در بافت‌های هدف هورمون‌های هیپوفیزی نشان‌دهنده این است که این هورمون دارای اثر میانجی‌کننده بر ترشح فیدبکی هورمونهای سیستم هیپوتالاموسی-هیپوفیزی است. از سویی گرلین در دیگر اندام‌های محیطی بر اعمال بیولوژیکی آن اندام‌ها اثر می-گذارد، برای مثال در دستگاه گوارش موجب تنظیم ترشح هورمون‌های مختلف و تنظیم تکثیر سلولی می‌گردد (۸، ۱۱ و ۲۲).

این هورمون اثرات گوناگونی بر فرآیندهای مختلف تولید مثلی دارد (۴ و ۹). مطالعات مختلف نشان داده‌است که گرلین در دستگاه تولید مثلی نر و ماده پستانداران بیان می‌شود و بر ترشح بسیاری از هورمون‌های تولیدمثلی اثر می‌گذارد (۱۴، ۲۳ و ۲۴). نشان داده شده است که گرلین در بافت‌های تولیدمثلی رحم و تخمدان بیان می-شود (۶ و ۲۱). گیرنده گرلین در بافت اندومتریوم و تخمدان بیان می‌شود و گرلین موجب لانه گزینی جنین می‌گردد (۱۰ و ۲۰). نشان داده شده است که گرلین، گیرنده آن و mRNA گرلین در قسمت‌های مختلف دستگاه تولید مثلی تلیسه هلشتاین از قبیل اندومتریوم و

* پست الکترونیکی نویسنده مسؤول: Borhansh@gmail.com

www.SID.ir

اویـداکت حضـور دارد (۷). ترشـح پایـه گـرلین در بافـت اندومتریال در اوایل آبستنی در مقایسه با فـاز فولیکـولی و دیگر مراحل آبستنی بیشتر است (۲۰)، همچنـین گـرلین ترشح LH را مهار می‌کند و پاسخ به GnRH را در شـرایط آزمایشگاهی کاهش می‌دهد، امـا بـر ترشـح FSH تـأثیری ندارد. یکـی از نقـش‌هـای تولیـدمثلی گـرلین، اثـر آن بـر گنادهای جنس نر است (۲۵). گرلین به‌طور قابـل تـوجهی قادر به مهـار ترشـح تستوسـترون اسـت (۴). اثـر مهـاری گـرلین روی ترشـح تستوسـترون بـا کـاهش قابـل توجـه چندین فاکتور کلیدی در مسیر سـنتز اسـتروئید از قبیـل پـروتئین حـاد تنظـیم‌کننـده اسـتروئید (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) و آنزیم‌های شکننده زنجیره جانبی P450، ۳بتا-هیدروکسیل استروئید هیدروژناز و نوع سـوم ۱۷ بتـا HSD مربـوط اسـت (۴). عـلاوه بـر اثـرات استروژنیک، گرلین ممکن اسـت بـه‌طـور مسـتقیم اعمـال لوله‌های اسپرم‌ساز را تنظیم کند (۴).

گرلین در سلول‌های لایدیگ، لوله‌هـای اسـپرم‌سـاز و سلول‌های سرتولی بیضه انسـان، گـاو، گوسـفند و بـز نیـز شناسـایی شـده اسـت (۵، ۱۶، ۱۸ و ۱۹). در مطالعـه‌ای نشان داده شد که تعداد سلول‌های لایـدیگی کـه واکـنش ایمنی گرلین را نشـان داده بودنـد نسـبت بـه تعـداد کـل سلول‌هـای لایـدیگ در افـرادی کـه غلظـت تستوسـترون کمتری داشتند، بیشتر بود (۱۸). در بیضه مـوش واکـنش ایمنی گرلین در سلول‌های لایدیگ موقعیت‌یابی شده بود، اما گیرنده گرلین (GHS-RA1) در سلول‌هـای لایـدیگ و سرتولی شناسایی شده بود (۱۲). بیـان گیرنـده گـرلین در مجاری اسپرم‌ساز نشان مـی‌دهـد کـه اپیتلیـوم لولـه‌هـای اسپرم‌ساز ممکن اسـت بافـت هـدف گـرلین باشـد و ایـن هورمون به‌طـور مسـتقیم مـی‌توانـد عمـل‌کـرد لولـه‌هـای اسپرم‌ساز را تنظیم کند (۱۳).

تا به حال پژوهشی در خصوص حضور گرلین و نقـش آن در پرندگان انجام نشده است، با توجه به اثرات مهم این هورمون بر اعمال گنادی در پستانداران، هدف این پژوهش موقعیت یابی ایمنوهیستوشیمیایی گرلین در بیضه خروس بود.

مواد و روش کار

نمونه برداری بافت بیضه از خروس‌های کشـتار شـده نژاد رأس ۳۰۸ در کشتارگاه طیور سـنندج انجـام گرفـت. نمونه‌های تهیه شده شامل قسمت‌های مرکزی و حاشیه‌ای بافت بیضه بـه ابعـاد ۱×۰/۵×۰/۵ سـانتی‌متـر بـود (از هـر قسـمت ۳ نمونـه) و نمونـه‌هـا بعـد از قـرار گـرفتن در یونیکاست‌های پلاستیکی به مـدت ۲۴ سـاعت در محلـول فیکساتیو فرمالین ۱۰٪ قرار گرفتند. پس از مراحل آبگیری (قرار دادن اسلایدها در الکل‌های با درجات مختلـف، الکـل مطلق، ۹۵، ۸۰، ۷۰ و ۵۰ درجه و در هر کدام به مدت سه دقیقه قرار گرفت)، شفاف‌سازی، آغشته‌سـازی بـا پـارافین، قالب‌گیری بلوک‌های پارافینی تهیه شد و مقاطع بافتی بـه ضخامت ۵-۴ میکرون بـا دسـتگاه میکروتـوم تهیـه و روی لام‌های آغشته شده به چسب سیتولوژی تثبیت شدند.

در انجـام ایمنوهیستوشـیمیایی ابتـدا مقـاطع بـافتی پارافینی در گرم‌خانه ۶۰ درجه سانتی‌گراد بـه مـدت یـک ساعت قرار داده شدند. لام‌ها با زایلین پـارافین‌زدایـی و بـا آب جاری شست و شو داده شدند و سپس با الکل اتیلیـک با درجات مختلف آبدهی شـده و دوبـاره بـا آب جـاری بـه مدت ۲ دقیقه و سپس با محلول PBS بـه مـدت ۵ دقیقـه شست و شو داده شدند. برای بازیابی آنتی‌ژن ظرف حـاوی بافر سیترات (۱۰ nM, pH=6) به مـدت ۵ دقیقـه در بـن ماری در دمای ۹۵ درجـه سـانتی‌گـراد قـرار داده شـدند و سپس برای خنک شدن، لام‌ها در دمای اتاق بـه مـدت ۲۰ دقیقه نگه‌داری شدند. سرانجام در PBS به مدت ۵ دقیقـه شسـت‌وشـو داده شـدند. بـرای غیـر فعـال شـدن فعالیـت پروکسـیداز اندوژنوسـی، لام‌هـا بـه مـدت ۳۰ دقیقـه بـا Peroxidase Block در محیط تاریک مواجهـه شـده و بـه مدت ۵ دقیقه در PBS شست‌وشو داده شدند؛ سپس برای کاهش پیوندهای غیر ویژه به مدت ۱۰ دقیقه اسـلایدها در Protein Block خوابانده شـدند. در مرحلـه بعـد لام‌هـا بـا آنتی‌بـادی اولیـه (Mouse monoclonal to Ghrelin, Cat No: ab57222, Abcam) (رقیق شده به نسبت ۱ بـه ۵۰۰ در بافر PBS) در اتاق مرطوب در دمای ۴ درجـه سـانتی-گراد به مدت یک شـبانه روز خوابانـده شـدند و سـپس در بافر PBS برای ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شست‌وشـو داده شـدند؛ سـپس اسـلایدها بـا Post Primary Block جهت افزایش نفوذ معرف‌های بعـدی بـه مـدت ۳۰ دقیقـه

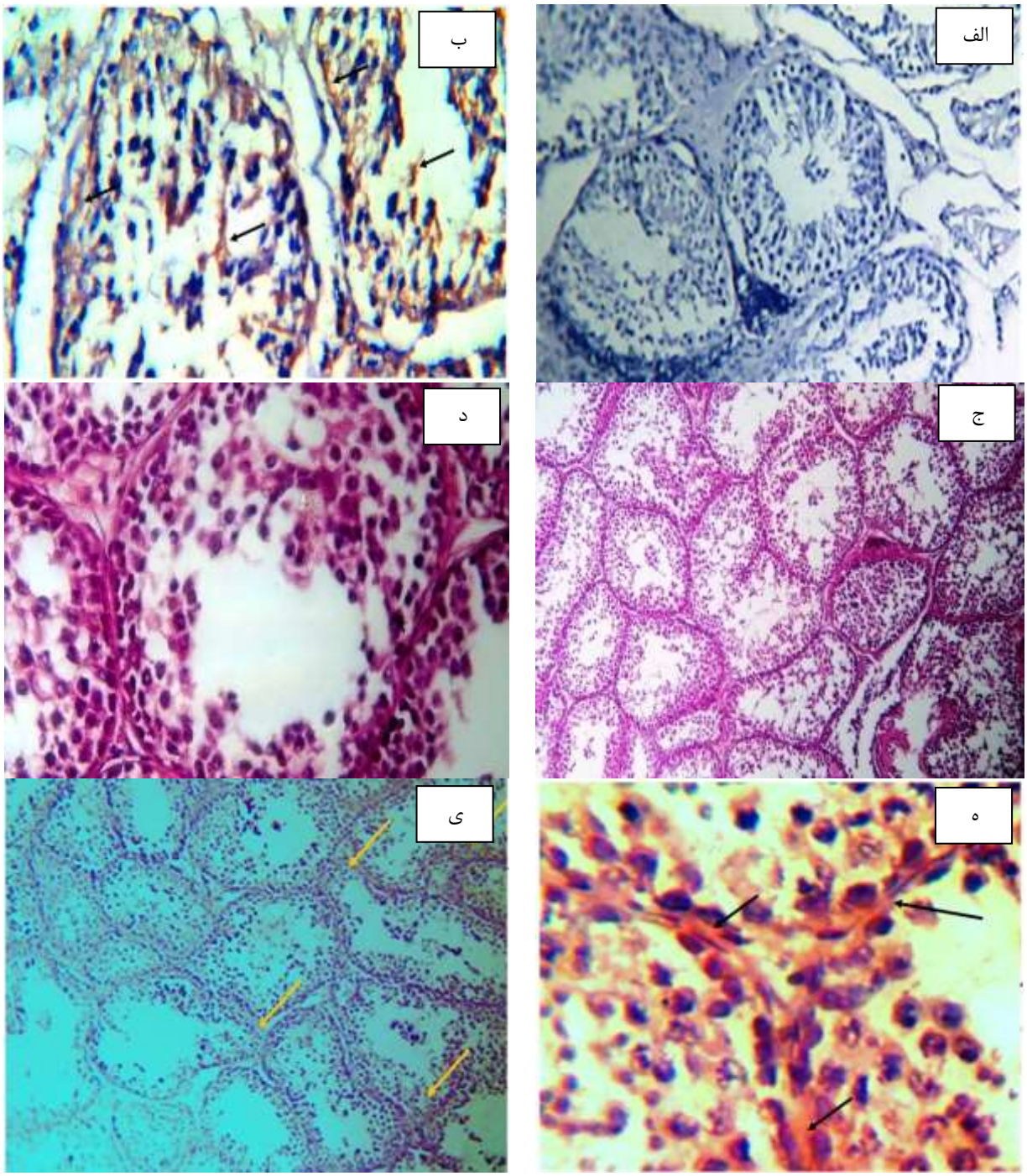
www.SID.ir
نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران

خوابانده شدند. در گام بعدی لام‌ها با آنتی‌بادی ثانویه (آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد IgG Cat No: ab7083, Abcam) کونژوگه شده با HRP رقیق شده در بافر PBS به نسبت ۱ به ۳۰۰، به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه خوابانده شدند و به مدت ۱۰ دقیقه شست وشو داده شده و سپس اسلایدها با NovoLink™ Polymer که برای شناسایی ایمنوگلوبولین‌های موشی و خرگوشی استفاده می‌شود (این پلی‌مر هر نوع آنتی‌بادی اولیه باند شده با بافت را تشخیص می‌دهد)، خوابانده شدند (مدت ۳۰ دقیقه)؛ سپس اسلایدها در PBS دو بار و هر بار ۵ دقیقه شست وشو داده شدند، سرانجام برای 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 شست وشو داده شدند. از محلول رنگ‌آمیزی زمینه هماتوکسیلین استفاده شد، سپس با قرار دادن یک قطره چسپ سیتولوژی روی لام و گذاشتن لامل، عمل مونته کردن انجام گردید 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 (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸ و ۱۹).

نتایج

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که آنتی‌ژن گرلین در سلول‌های لایدیگ و سلول‌های سرتولی خروس قابل ردیابی و شناسایی است. واکنش ایمنوپروکسیداز در سیتوپلاسم سلول‌های لایدیگ و سرتولی مشاهده شد (شکل ۱، ه و ی). در شکل‌های ج و د مقطع عرضی بافت بیضه خروس رنگ‌آمیزی شده ائوزین-هماتوکسیلین مشاهده می‌گردد. براساس گزارش قبلی Miller و همکاران که وجود گرلین را در بافت بیضه گوسفند تأیید کرده بودند (۱۷)، مقطع بافتی بیضه گوسفند نر به عنوان کنترل مثبت به منظور تأیید صحت آزمایش استفاده شد. در این آزمایش، مثبت بودن واکنش ایمنوپروکسیداز در بیضه گوسفند به عنوان کنترل مثبت تأیید شد (شکل ۱، ب). با توجه به آن که احتمال بروز واکنش کاذب و غیر واقعی و امکان اتصال آنتی‌بادی اولیه به جایگاه‌های غیر اختصاصی وجود داشت، قرار دادن یک نمونه کنترل منفی الزامی بود. با توجه به آن که در اکثر مقالات برای کنترل منفی از سرم حیوانات مختلف استفاده شده بود در این مطالعه از سرم خرگوشی به‌جای آنتی‌بادی اولیه برای کنترل منفی استفاده شد. بدین منظور ابتدا از یک خرگوش خون‌گیری به عمل آمد، سپس نمونه‌ی خون برای جداسازی سرم سانتریفیوژ گردید. از سرم خرگوشی به عنوان آنتی‌بادی اولیه استفاده شد. سرم تهیه شده غنی از آنتی‌بادی‌های مختلف است. این آنتی‌بادی‌ها با آنتی‌بادی علیه گرلین که آن هم در موش تهیه شده بود، به لحاظ بازوی Fc، مشترک و یکسان هستند؛ لذا آنتی‌بادی ثانویه توانایی اتصال به هر دو آنتی‌بادی مذکور را دارد. در صورت ظهور رنگ قهوه‌ای یا واکنش مثبت در هر دو مقطع فوق، نشان از بروز واکنش‌های آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی‌های موجود در سرم با جایگاه‌های غیراختصاصی در مقاطع بافتی است. لازمه اتصال آنتی‌بادی ثانویه به آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی‌های موجود در سرم، تثبیت این آنتی بادی‌ها در مقاطع بافتی است. آنتی‌بادی‌های اولیه بسیار اختصاصی عمل می‌کنند و فقط آن‌هایی به بافت می‌چسبند که Fab آنتی ژن اختصاصی آن در بافت حضور داشته باشد. در مقطع بافتی مورد آزمایش که گرلین وجود دارد، آنتی بادی اختصاصی آن متصل می‌شود. در حالی که به دلیل عدم حضور آنتی‌ژن‌های اختصاصی آنتی‌بادی‌های سرم در مقاطع بافتی توانایی تثبیت شدن را نداشته و در زمان شست وشوی لام‌ها تمامی آن‌ها از روی لام شسته شده و دیگر آنتی‌بادی وجود ندارد تا با آنتی‌بادی ثانویه واکنش دهد و رنگ قهوه‌ای ظاهر شود؛ درحالی که مقاطع بافتی خوابانده شده با آنتی‌بادی اولیه به دلیل وجود آنتی ژن اختصاصی (گرلین) در بافت، پس از شست و شو همچنان به بافت متصل باقی مانده و با اضافه کردن آنتی‌بادی ثانویه واکنش مثبت مشاهده می‌شود. نتایج کنترل منفی در این آزمایش نشان داد که واکنش ایمونوپروکسیداز انجام نگرفته‌است (شکل ۱، الف).

www.SID.ir



شکل ۱- موقعیت‌یابی ایمونو هیستوشیمیایی گرلین در بیضه خروس. نمونه‌ها با آنتی گرلین موشی به عنوان آنتی بادی اولیه و سپس با آنتی بادی پلی کلونال دانکی (HRP) به عنوان آنتی بادی ثانویه انکوبه شدند. **الف)** کنترل منفی، انکوبه شده با سرم خرگوشی به جای آنتی بادی اولیه، نشان‌دهنده واکنش منفی ایمونوپروکسیداز در سلول‌های زایا و سرتولی بیضه گوسفند ۲ ساله (۱۰۰×). **ب)** کنترل مثبت، انکوبه شده با آنتی بادی مونوکولونال آنتی گرلین) نشان‌دهنده واکنش مثبت ایمونوپروکسیداز در سلول‌های زایا و سرتولی بیضه گوسفند ۲ ساله (۴۰۰×). **ج)** (۱۰۰×) و **د)** (۴۰۰×)، مقطع عرضی بافت معمولی بیضه خروس تهیه شده با رنگ‌آمیزی ائوزین-هماتوکسیلین. **ه)** نشان‌دهنده واکنش مثبت ایمونوپروکسیداز در سلول‌های سرتولی و لایدیگ مقطع عرضی بیضه خروس (۴۰۰×). **ی)** نشان‌دهنده واکنش مثبت ایمونوپروکسیداز در سلول‌های لایدیگ مقطع عرضی بیضه خروس (۱۰۰×). در شکل‌های ب، ه و ی واکنش ایمونوپروکسیداز با فلش نشان داده شده است.

www.SID.ir
نشریه علوم درمانگاهی در پزشکی ایران

بحث

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که گرلین در سلول‌های لایدیگ و سرتولی بیضه خروس بیان می‌شود و به نظر 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. اگرچه وجود گرلین در بیضه گونه‌های مختلف (انسان، گوسفند و موش صحرایی) گزارش شده است (۳، ۵، ۱۷ و ۱۸)، اما حضور گرلین در دستگاه تناسلی خروس برای اولین بار گزارش می‌گردد. بیان گیرنده گرلین 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، اعمال مهم گنادی، تکثیر و آپوپتوز را در بیضه موش کنترل کند (۱۳). لوکازیک و همکاران (۱۵) بیان گیرنده در گلژی و آکروزوم‌های اسپرماتیدها و نواحی آکروزوم یا غشای سلولی سر اسپرم اپیدیدیمی را تأیید کردند. بیان گیرنده گرلین در اسپرم و نیز اثر گرلین روی جنبایی اسپرم و غلظت یون کلسیم داخل سلولی نشان می‌دهد که این اثرات بیولوژیکی گرلین ممکن است در شرایط داخل بدنی ایجاد شود. بریکان یاکان (۲۵) 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 به روش اتوکرین و یا پاراکرین اسپرماتوژنز را تنظیم کند، همچنین شواهد نشان می‌دهند که گرلین قادر به تنظیم اعمال کلیدی بیضه‌ای، از جمله بیان ژن لوله اسپرم‌ساز، ترشح تستوسترون و تکثیر سلول لایدیگ است.

علاوه بر این، در موش صحرایی ثابت شده است که گرلینی که در سلول‌های لایدیگ و سرتولی موقعیت‌یابی شده است، خواص آنتی‌اکسیدانتی قابل‌توجهی دارد (۱۸). Ahmed و همکاران نشان دادند 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 (۱)؛ بنابراین، گرلین می‌تواند به‌عنوان رابطی بین هموستازی انرژی و توانایی تولیدمثلی در موش‌های صحرایی نر بالغ در نظر گرفته شود. Moretti و همکاران نشان دادند که قبل از این که اسپرم‌ها به اپیدیدیم برسند آن‌ها با گرلین مواجه می‌شوند (۱۸)، بنابراین هورمون گرلین ممکن است تغییرات پس گنادی اسپرم، از جمله تحرک، اتصال و نفوذ به تخم را تحت تأثیر قرار دهد. در پژوهشی دیگر گرلین با روش ایمونوفلورسنس در اسپرم انزالی انسان شناسایی شد. این نتایج نشان می‌دهد که اسپرم انسان احتمالاً گیرنده‌هایی برای گرلین دارد؛ همین پژوهشگران وجود گیرنده گرلین در گلژی و آکروزوم اسپرماتیدها و نواحی آکروزومی یا غشای سلولی سر اسپرم اپیدیدیمی موش صحرایی را گزارش کردند (۱۸). با توجه به موقعیت یابی گرلین و گیرنده آن در بیضه انسان، موش صحرایی و گوسفند بیان شده است که گرلین می‌تواند فعالیت اسپرماتوژنز را از طریق سلول‌های لایدیگ تحت تأثیر قرار دهد و ممکن است به‌عنوان تنظیم‌کننده موضعی در عمل‌کرد اسپرماتوژنیک عمل کند (۱۵).

بررسی نمونه‌های تهیه شده در این پژوهش، ظهور رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره در مقاطع بافتی بیضه خروس نشان از واکنش مثبت ایمنوپراکسیداز در نمونه‌های بافتی تهیه شده بود (شکل ۱، ی و ه). این نتایج با نتایج سایر پژوهشگران که وجود گرلین را در مراحل اسپرماتوژنز، سلول‌های سرتولی و سلول‌های لایدیگ در انسان (۱۸)، گاو (۵)، گوسفند (۱۷ و ۱۹) و بز (۱۶) شناسایی کرده بودند موافق بود، اما با نتایج Barreiro و همکاران (۴) و Tena-Sempere (۲۲) که گرلین را فقط در سلول‌های لایدیگ بالغ موش صحرایی شناسایی کرده بودند و گزارش کرده‌اند که گرلین ضرورتاً در سلول‌های لایدیگ وجود دارد، مخالف بود.

براساس یافته‌های این پژوهش حضور گرلین در سلول‌های لایدیگ، سلول‌های سرتولی و سلول‌های زایا تأیید شد. احتمالاً گرلین موجود در سلول‌های سرتولی و لایدیگ می‌تواند اسپرماتوژنز را به روش اتوکرین و یا پاراکرین تنظیم کند. اگر چه این یافته‌ها به‌تنهایی وجود رابطه بین گرلین و باروری را ثابت نمی‌کند، اما این نتایج راه را برای شناخت نقش گرلین در سلول‌های بیضه‌ای، اسپرماتوژنز و در نهایت باروری در خروس را هموار

www.SID.ir

می‌کند، بنابراین باید پژوهش‌های بیشتری برای شناسایی گیرنده‌های گرلین و نقش‌های این هورمون در بیضه پرندگان انجام پذیرد.

منابع

1- Ahmed, H.H.; Wagdy, K.B.; Wafaa, G.S.; El-Sayed, M.E.; Emad, F.E. and Rehab, E.S.; Molecular Genetic and Biochemical Evaluation of Ghrelin Hormone as a Novel Signal of Gonadal Function in Adult Male Rats. J Arab Societ Med Res; 2010; 5(2): 89-100.

2- Angelidis, G.; Dafopoulos, K.; Messini, C.I.; Valotassiou, V.; Georgoulias, P. and Messinis, I.E.; Ghrelin: new insights into female reproductive system-associated disorders and pregnancy. Reprod Sci; 2012; 19(9): 903-10.

3- Barreiro, M.L.; Gaytan, F.; Caminos, J.E.; Pinilla, L.; Casanueva, F.F.; Aguilar, E.; Dieguez, C. and Tena-Sempere, M.; Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. Biol Reprod; 2002; 67(6): 1768-76.

4- Barreiro, M.L. and Tena-Sempere, M.; Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? Mol Cell Endocrinol; 2004; 226: 1–9.

5- Bayezidi-Azar, A. and Shokrollahi, B.; Immunohistochemical Localization of Ghrelin in Testicular Tissues of Holstein Bulls. Iran J Applied Anim Sci; 2016; 6(3): 551-555.

6- Caminos, J.E.; Tena-Sempere, M.; Gaytan, F.; Sanchez-Criado, J.E.; Barreiro, M.L.; Nogueiras, R.; Casanueva, F.F.; Aguilar, E.; Dieguez.; C.;Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. Endocrinology; 2003; 144:1594–602.

7- Deaver, S.E.; Hoyer, P.B.; Dial, S.M.; Field, M.E.; Collier, R.J.; Rhoads, M.L.; Localization of ghrelin and its receptor in the reproductive tract of Holstein heifers. J Dairy Sci; 2013; 96:150–7.

8- Fernandez-Fernandez, R.; Tena-Sempere, M.; Navarro, V.M.; Barreiro, M.L.; Castellano, J.M.; Aguilar, E. and Pinilla, L.; Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. Neuroendocrinology 2006; 82: 245–255.

9- Garcia, M.C. Lopez, M. Alvarez, C.V. Casanueva, F. Tena-Sempere, M. Dieguez, C.; Role of ghrelin in reproduction. Reproduction 2007; 133: 531–40.

10- Gaytan,F.;Barreiro,M.L.;Chopin, L.K.; Herington, A.C.; Morales, C.; Pinilla, L.; Casanueva, F.F.; Aguilar, E.; Dieguez, C.; Tena-Sempere, M.; Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. J Clin Endocrinol Metab; 2003; 88:879–87.

www.SID.ir
نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران

11- Iglesias, M.J.; Pineiro, R.; Blanco, M.; Gallego, R.; Dieguez, C.; Gualillo, O.; Gonzalez-Juanatey, J.R. and Lago, F.; Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. Cardiovasc Res; 2004; 62(3): 481-8.

12- Ishikawa, T.; Fujioka, H.; Ishimura, T.; Takenaka, A. and Fujisawa, M.; Ghrelin expression in human testis and serum testosterone level. J Androl; 2007; 28(2): 320-4.

13- Kheradmand, A.; Dezfoulian, O.; Alirezaei, M. and Rasoulian, B.; Ghrelin modulates testicular germ cells apoptosis and proliferation in adult normal rats. Biochem Biophys Res Commun; 2012; 419(2): 299-304.

14- Lebrethon, M.C.; Aganina, A.; Fournier, M.; Gerard, A.; Parent, A.S.; Bourguignon, J.P.; Effects of in vivo and in vitro administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophinreleasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty. J Neuroendocrinol; 2007;19:181–8.

15- Łukaszyk, A.; Rafińska, L.; Sawiński, P.; Kasprzak, A ;.Olejniczak, K.; Ruciński, M.; Ruchała, M. and Sowiński, J.; Immunohistochemical and hybridocytochemical study on ghrelin signalling in the rat seminiferous epithelium. Folia Histochem Cytobiol; 2009; 47(3): 415-23.

16- Mansori, K. and Shokrollahi, B ;. Immunohistochemical localization of ghrelin in goat testicular tissue. Vet J (pajouhesh-va-sazandegi); 2017; 30(2115): 185-193.

17- Miller, D.W.; Harrison, J.L.; Brown, Y.A.; Doyle, U.; Lindsay, A.; Adam, C.L. and Lea, R.G.; Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep. Reprod Biol Endocrinol; 2005; 3: 60.

18- Moretti, E.; Vindigni, C.; Tripodi, S.A.; Mazzi, L.; Nuti, R.; Figura, N. and Collodel, G.; Immunolocalisation of ghrelin and obestatin in human testis, seminal vesicles, prostate and spermatozoa. Andrologia; 2014; 46(9): 979-85.

19- Sadegh, V.S.; Shokrollahi, B. and Mohammadi, S.; Ghrelin localization in testicular and epididymis tissues of ram. Vet J (pajouhesh-va-sazandegi); 2017; 30(1114): 75-81.

20- Tanaka, K.; Minoura, H.; Isobe, T.; Yonaha, H.; Kawato, H.; Wang, D.F.; Yoshida, T.; Kojima, M.; Kangawa, K.; Toyoda, N.;Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:2335–40.

21- Tawadros, N.; Salamonsen, L.A.; Dimitriadis, E.; Chen, C.; Facilitation of decidualization by locally produced ghrelin in the human endometrium. Mol Human Reprod; 2007;13:483–9.

www.SID.ir

22- Tena-Sempere, M.; Exploring the role of ghrelin as novel regulator of gonadal function. Growth Horm IGF Res; 2005; 15(2): 83-8.

23- Viani, I.; Vottero, A.; Tassi, F.; Cremonini, G.; Sartori, C.; Bernasconi, S.; Ferrari, B.; Ghizzoni, L.; Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells. J Clin Endocrinol Metab; 2008; 93:1476–81.

24- Vulliemoz, N.R.; Xiao, E.; Xia-Zhang, L.; Germond, M.; Rivier, J.; Ferin, M.; Decrease in luteinizing hormone pulse frequency during a five-hour peripheral ghrelin infusion in the ovariectomized rhesus monkey. J Clin Endocrinol Metab; 2004; 89:5718–23.

25- Yakan, B.; A Concise Review: Ghrelin and Reproductive System. Erciyes Med J; 2011; 33(4): 317-320.

www.SID.ir
نشریه علوم دامگاهی دامپزشکی ایران

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2020; 14(1):73-80.

Immunohistochemical localization of Ghrelin in Testicular Tissues of rooster

Ghafouri, V.[1]; Shokrollahi, B.[2*]; Amiri, A.A.[3]

1. MSc graduated, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj- Iran.
2. Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj- Iran.
3. Lecturer, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj- Iran.

Received: 10 October 2019 ***Accepted:*** 24 May 2019

Summary

This study was aimed to investigate the immunohistochemical localization of ghrelin in testicular tissues of rooster. Ghrelin is a pleiotropic regulator of a wide array of endocrine and non-endocrine functions. In the mammal, the expression of ghrelin and its receptors in the gonads, the effect of ghrelin on the control of gonadal function as well as the direct effects of ghrelin on control of testicular secretion and cell proliferation has been reported, however, the expression and/or functional role of ghrelin has not been studied in gonads of non-mammalian species until now. In those study, the immunohistochemical localization of ghrelin in testicular tissues of rooster, using mouse monoclonal anti ghrelin antibody as the primary antibody and donkey anti rabbit IgG (HRP conjugated) and polyclonal antibody as the secondary antibody was investigated. The testis samples were collected from five roosters (45 day olds) and kept in 10% formalin for IHC analysis. Then paraffin blocks and histological section for IHC test were prepared. Evaluation of the pattern of cellular expression of ghrelin protein in rooster testis using immunohistochemistry demonstrated that ghrelin peptide was located in the interstitial leydig, sertoli cells, and germ cells. We have suggested that the ghrelin expression in germ cells, leydig cells and sertoli cells may indicate its role in the local regulation. This is the first study to provide molecular evidence for the presence of ghrelin within the entire testicular tissues of rooster.

Keywords: Ghrelin, Leydig cell, Sertoli cell, testis, rooster.

* Corresponding Author E-mail: Borhansh@gmail.com

www.SID.ir