الگوی بیان هورمون مهار کننده گونادوتروپین (GnIH) در هیپوتالاموس بزهای بومی فارس

سارا مرادی*[۱]، محمد رضا جعفرزاده شیرازی[۲]، محمد جواد ضمیری[۲]، محمد سعید صالحی[۱]، امین تمدن[۳]، محمد رضا نام آور[٤]، امیر اخلاقی[۲]، کازویوشی سوتسویی[٥]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه شیراز ، [۲] بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه شیراز، [۳] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، [٤] بخش علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، [٥] بخش زیست‌شناسی، دانشگاه واسِدا، توکیو، ژاپن

*نویسنده مسئول: saramrd82@gmail.com

چکیده

هورمون مهار کننده گونادوتروپین (GnIH) اثر مهاری بر سنتز و تراوش گونادوتروپین دارد و در پستانداران پپتید وابسته به آرژنین، فنیل آلانین ـ آمید (RFRP) خوانده می‌شود. هدف از انجام این پژوهش، بررسی الگوی بیان این نوروپپتید در فصل آنستروس و در گامه فولیکولی چرخه تخمدانی در خلال فصل تولیدمثلی در هسته‌های پاراونتریکولار/ پشتی- داخلی (PVN/DMH) هیپوتالاموس بزهای بومی فارس بود. بر اساس غلظت پلاسمایی پروژسترون، بزهایی که در گامه فولیکولی چرخه تخمدانی و دوره آنستروس قرار داشتند (سه بز در هر گروه) کشتار و از ناحیه داین‌سفالن هر بز برش‌هایی به ضخامت ۳۰ میکرومتر تهیه شد. برش‌های دارای هسته‌های PVN/DMH با روش ایمینوهیستوشیمی رنگ‌آمیزی و نورون‌های بیان کننده GnIH در هر برش شمارش شد. نورون‌های بیان کننده GnIH در نواحی پیشین، میانی و پسین هسته‌های PVN/DMH شناسایی شدند. شمار نورون‌های مثبت در ناحیه پیشین هسته‌ها در مقایسه با ناحیه پسین (P=۰/۰۰۲) و همچنین در دوره آنستروس در مقایسه با گامه فولیکولی بیشتر بود (P<۰/۰۰۰۱). یافته‌های این پژوهش نشان داد بیان GnIH در هسته‌های PVN/DMH بز در خلال دوره آنستروس بیشتر و در گامه فولیکولی کمتر بود که می‌تواند نمایانگر اثر GnIH در مهار محور تولیدمثلی از راه مهار تراوش GnRH/LH باشد.

واژه‌های کلیدی: GnIH؛ آنستروس؛ گامه فولیکول؛ هیپوتالاموس؛ بز

مقدمه

فرآیندهای تولیدمثلی همانند دیگر فرآیندهای فیزیولوژیک، به وسیله فرسته‌های گوناگونی همچون هورمون‌ها، فاکتورهای رشد و سازه‌های محیطی تنظیم می‌شوند. فعالیت دستگاه تولیدمثل را گروهی از هورمون‌ها که اثر مستقیم بر بافت‌های تولیدمثلی می‌گذارند، تنظیم می‌کنند. در مهره داران، کنترل نوروپپتیدهای تراوش کننده گونادوتروپین‌ها، عمدتا از طریق عمل تحریکی هورمون آزاد کننده گونادوتروپین (GnRH) است. این هورمون تراوش هر دو هورمون لوتئینه کننده گونادوتروپین (LH) و هورمون تحریک کننده فولیکول (FSH) را تنظیم می‌کند.

در سال ۲۰۰۰ میلادی نوروپپتیدی در سیستم هیپوتالاموس ـ هیپوفیز بلدرچین شناسایی شد که به دلیل اثر مهاری بر سنتز و تراوش گونادوتروپین‌ها، هورمون مهارکننده گونادوتروپین (GnIH) نامیده شد (۱). این پپتید در گونه‌های مختلف پستانداران از جمله موش، همستر، موش صحرایی، گاو، پریمات‌ها و انسان شناسایی شده و با نام پپتید وابسته به آرژنین، فنیل آلانین ـ آمید (RFRP) نیز خوانده می‌شود. نورون‌های بیان کننده GnIH در هسته پاراونتریکولار (PVN) هیپوتالاموس پرندگان،

هسته پشتی- داخلی (DMH) هیپوتالاموس همستر، موش و موش صحرایی و در هسته DMH و PVN گوسفند شناسایی شده است. همچنین ارتباطی بین آکسون نورون‌های GnIH با نورون‌های GnRH در ناحیه پیش بینایی (POA) پرندگان و پستانداران وجود دارد (۲ و ۳).

با توجه به اینکه GnIH در هیپوتالاموس مغز گوسفند به عنوان میانجی مهار محور تولیدمثلی عمل می‌کند (٤)، هدف از انجام این پژوهش، بررسی الگوی بیان GnIH در گامه فولیکولی و دوره آنستروس در هسته‌های DMH و PVN هیپوتالاموس بزهای بومی فارس بود.

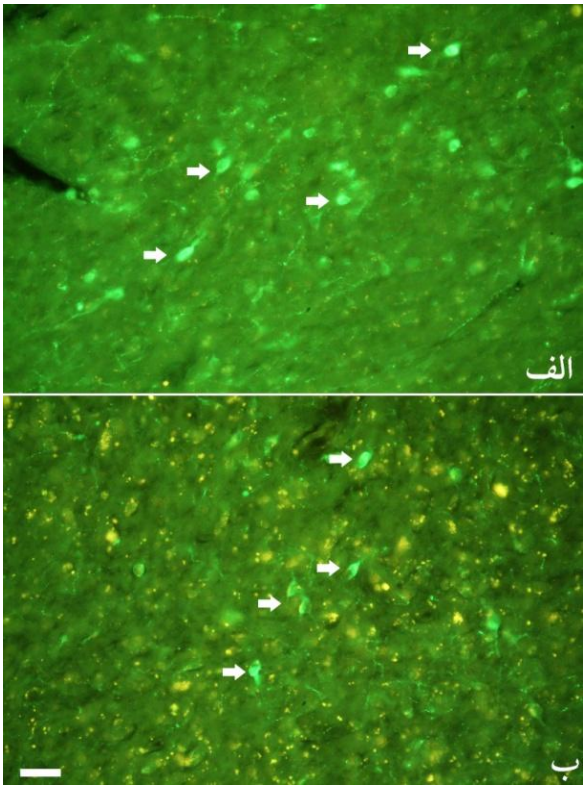
مواد و روش‌ها

شش بز بالغ با دامنه سنی ۳ تا ۵ سال، پس از گزینش در فصل تولیدمثلی و غیرتولیدمثلی در شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان نگهداری شدند. بر اساس غلظت پلاسمایی پروژسترون، بزهایی که در فاز فولیکولی چرخه تخمدانی و دوره آنستروس قرار داشتند (سه بز در هر گروه) کشتار و بیدرنگ مغز هر جانور با استفاده از بافر فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. ناحیه داین سفالن پس از ٤٨ ساعت قرار داشتن در محلول سوکروز ۳۰ درصد، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شد.

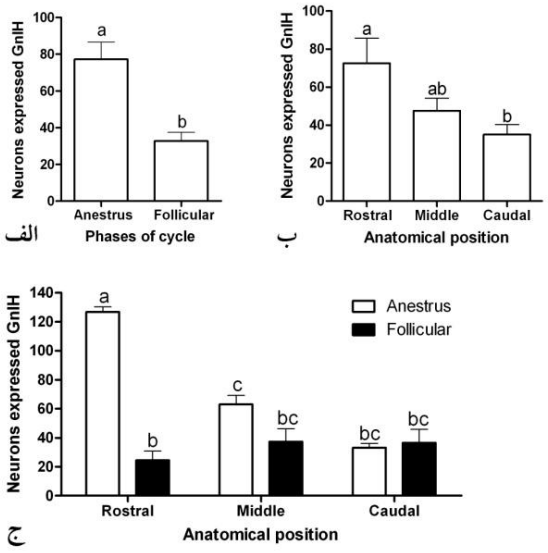
با میکروتوم انجمادی، از هر بافت برش‌هایی به ضخامت ۳۰ میکرومتر تهیه شد و برش‌های به دست آمده در چاهک‌های دارای محلول محافظ یخ زدگی (Cryoprotectant) قرار گرفته و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برش‌های دارای هسته های DMH و PVN انتخاب و با روش استاندارد ایمینوهیستوشیمی رنگ‌آمیزی شدند. به صورت خلاصه، نخست برش‌ها در بافر فرمالین ۱۰ درصد برای ۱۰ دقیقه تثبیت شده و سپس سه مرتبه با محلول بافر فسفات سالین (PBS) شسته شدند. پس از ۳۰ دقیقه قرار داشتن نمونه‌ها در محلول بلوک کننده دارای ٪۱ سرم بز و ٪۱ آلبومین سرم گاو، برای ٢٤ ساعت با آنتی بادی اولیه(Tsutsui) علیه GnIH گنجشک تولید شده در خرگوش (رقت۱:۱۰۰۰) در دمای ٤ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از گذشت این زمان، برش‌ها با محلول فسفات بافر سالین شسته و برای یک ساعت با آنتی‌بادی ثانویه IgG FITC علیه خرگوش انکوبه شدند. پس از شستشو، برش‌ها روی اسلاید تثبیت شدند. نورون‌های بیان کننده GnIH در هر برش با میکروسکوپ فلورسنت شمارش شد. آنالیز داده‌ها با Proc GLM نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با روش میانگین حداقل مربعات انجام شد.

نتایج و بحث

نورون‌های بیان کننده GnIH در گامه فولیکولی و دوره آنستروس در هسته‌های PVN/DMH هیپوتالاموس مغز بز در نگاره ۱ نشان داده شده‌اند. شمار نورون های‌بیان کننده GnIH در دوره آنستروس در مقایسه با گامه فولیکولی چرخه تخمدانی بیشتر بود (P<۰/۰۰۰۱، نگاره ۲- الف). شمار نورون‌های بیان کننده GnIH در ناحیه پیشین بیش از ناحیه پسین بود (P=۰/۰۰۲، نگاره ۲- ب). اما شمار سلول‌های مثبت در ناحیه میانی هسته‌ها، تفاوتی با نواحی پیشین یا پسین نداشت (P>۰/۰۵). فزون بر این، نورون‌های مثبت در ناحیه پیشین هسته‌های PVN/DMH هیپوتالاموس بزهایی که در فصل غیرتولیدمثلی قرار داشتند بیشتر از شمار نورون‌های این ناحیه از هسته در گامه فولیکولی بود (P<۰/۰۰۰۱، نگاره ۲- ج) اما در نواحی میانی و پسین، تفاوتی میان دو گامه مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



نگاره ۱. نمونه‌ای از نورون‌های بیان کننده GnIH (پیکان) در مرحله آنستروس (الف) و گامه فولیکولی (ب) در هسته‌های پاراونتریکولار/ پشتی ـ داخلی (PVN/DMH) هیپوتالاموس بزهای بومی فارس. شاخص ۳۰ میکرومتر است.



نگاره ۲. شمار (میانگین و خطای استاندارد) نورون‌های بیان کننده GnIH در هسته‌های پاراونتریکولار/ پشتی ـ داخلی (PVN/DMH) هیپوتالاموس بزهای بومی فارس (n=۳) الف) در گامه فولیکولی و مرحله آنستروس؛ ب) بر اساس موقعیت آناتومی و ج) مقایسه نواحی مختلف آناتومی در دو مرحله چرخه فحلی. میانگین های دارای بندواژه‌های همانند، تفاوت آماری معنی‌دار ندارند (P>۰/۰۵).

در پژوهش کنونی برای نخستین بار نورون‌های بیان کننده GnIH در هسته های DMH/PVN هیپوتالاموس مغز بز شناسایی شدند که با یافته‌های به دست آمده در گوسفند (٤) هماهنگ است. در پرندگان، اثر GnIH در سطح هیپوفیز و با مهار مستقیم آزاد شدن گونادوتروپین‌ها اعمال می‌شود اما در پستانداران این نوروپپتید بر نورون‌های GnRH اثر می گذارد و فعالیت این سلول‌ها را کاهش می‌دهد (٤).

تراوش پالسی LH که بازتابی از تراوش GnRH به درون سیاهرگ باب هیپوفیزی است، در گامه فولیکولی چرخه تخمدانی افزایش می‌یابد و موجب تخمک‌ریزی می‌شود. تراوش LH در فصل آنستروس در سطح پایه قرار دارد. یافته‌های پژوهش کنونی نشان داد بیان GnIH در هسته‌های DMH/PVN بز در گامه آنستروس افزایش و در گامه فولیکولی کاهش یافت. سازگار با این یافته، نشان داده شده است که شمار سلول‌های بیان کننده RFRP در هسته DMH هیپوتالاموس هامستر در زمان سرژ LH کاهش یافت (٥). همچنین سلول‌های بیان کننده GnIH درفصل تولیدمثلی گوسفند نسبت به فصل غیرتولیدمثلی کمتر بود (٤) و تزریق GnIH به گاو موجب کاهش غلظت پلاسمایی LH شد (٦).

از این رو امکان‌پذیر است که نورون‌های بیان کننده GnIH در خلال فاز فولیکولی کاهش یافته تا موجب تسهیل سرژ LH شود. بیان بالای این نوروپپتید در خلال فصل غیرتولیدمثلی، می‌تواند موجب مهار سرژ GnRH/LH و تخمک‌ریزی شود.

منابع

1. Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Ishii, S. and Sharp, P.J. 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. Biochemical and Biophysical Research Communications, 275(2):661-667.

2. Kriegsfeld, L.J., Gibson, E.M., Williams III, W.P., Zhao, S., Mason, A.O., Bentley, G.E. and Tsutsui, K. 2010. The roles of RFamide-related peptide-3 in mammalian reproductive function and behaviour. Journal of Neuroendocrinology, 22(7):692-700.

3. Smith, J.T. and Clarke, I.J. 2010. Gonadotropin inhibitory hormone function in mammals. Trends in Endocrinology & Metabolism, 21(4):255-260.

4. Smith, J.T., Coolen, L.M., Kriegsfeld, L.J., Sari, I.P., Jaafarzadehshirazi, M.R., Maltby, M., Bateman, K., Goodman, R.L., Tilbrook, A.J., Ubuka, T., Bentley, G.E., Clarke, I.J. and Lehman, M.N. 2008. 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(11):5770-5782.

5. Gibson, E.M., Humber, S.A., Jain, S., Williams, W.P., Zhao, S., Bentley, G.E., Tsutsui, K. and Kriegsfeld, L.J. 2008. Alterations in RFamide-Related Peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge. Endocrinology, 149(10):4958-4969.

6. Kadokawa, H., Matsui, M., Hayashi, K., Matsunaga, N., Kawashima, C., Shimizu, T., Kida, K. and Miyamoto, A. 2008. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. Journal of Endocrinology, 196(2):331-334.