



دانشگاه صنعتی اصفهان

بیمایش ملی نقش بیوتکنولوژی در علوم دامی
گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان
۳۱ شهریور ماه ۱۳۹۰



همایش ملی
نقش بیوتکنولوژی در علوم دامی

بیان ژن کیس - ۱ در گامه‌های فحلی در هیپوتالاموس موش صحرائی

محمد سعید صالحی^{۱*}؛ محمد رضا جعفرزاده شیرازی^۲؛ محمد جواد ضمیری^۳؛ فرید پڑوهی^۱؛ محمد رضا نام‌آور^۴؛ علی نیازی^۵؛ امین رضائی^۶؛ نادر تنیده^۶؛ امین تمدن^۶

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ۲- بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ۳- مرکز تحقیقات هیستومورفومتری و استریولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ۴- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز ۵- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانس ژنیک و گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ۶- گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانس ژنیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

* نویسنده مسئول: محمد سعید صالحی، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، صندوق پستی: ۶۵۱۸۶-۷۱۴۴۱-۷۱۴۴۱@gmail.com

چکیده

کیس‌پتین‌ها، خانواده‌ای از پپتیدهایی هستند که به وسیله ژن KiSS-1 بیان می‌شوند و از راه GnRH سبب تحریک آزادسازی LH می‌شوند. هدف از این پژوهش، بررسی الگوی بیان KiSS-1 mRNA در مغز موش صحرائی، در گامه‌های چرخه فحلی بود. داین سفالن ۱۵ موش صحرائی بالغ ماده پس از تعیین گامه فحلی، خارج و در نیتروژن مایع پودر شد. با به کارگیری Real time PCR، میزان بیان KiSS-1 mRNA در هر گامه ی چرخه فحلی تعیین شد. کمترین سطح بیان KiSS-1 mRNA در داین سفالن موش‌های صحرائی در گامه استروس (فحلی) مشاهده شد ($P < 0.05$) اما سطوح KiSS-1 mRNA در دیگر گامه‌ها، همانند بود ($P > 0.05$). به نظر می‌رسد برآیند فعالیت نورون‌های کیس‌پتین در هسته‌های هیپوتالاموس، تراوش گونادوتروپین‌ها را در سراسر چرخه فحلی کنترل می‌کنند.

واژگان کلیدی: کیس‌پتین، چرخه فحلی، هیپوتالاموس، موش صحرائی

مقدمه

اگرچه به شیوه کلاسیک، تراوش هورمون آزادکننده گونادوتروپین (GnRH) از نورون‌های GnRH هیپوتالاموس، به عنوان رخداد آغاز فعالیت‌های تولیدمثلی و هدایتگر محور گونادی در نظر گرفته می‌شود، اما شواهد جدید نشان داده اند که سیستم^۱ KiSS-1/GPR54 در پله-های بالاتری از نردبان تولیدمثلی عمل می‌کند و با انگیزش نورون‌های GnRH، موجب تحریک تراوش هورمون لوتئینیزه کننده (LH) می‌شود. کیس‌پتین‌ها، خانواده‌ای از پپتیدهایی هستند که به وسیله ژن KiSS-1 بیان می‌شوند و گیرنده G پروتین^۲ را فعال می‌کنند. تاثیر کیس‌پتین بر LH، با آنتاگونیست GnRH خنثی شد که نشان می‌دهد کیس‌پتین از راه GnRH سبب تحریک آزاد سازی LH می‌شود (Roa et al., 2009). این پژوهش بر این فرضیه استوار بود که ممکن است میزان بیان کیس‌پتین در گامه‌های گوناگون چرخه فحلی موش

¹- G protein-coupled receptor

²- GPR54

صحرائی متفاوت باشد. هدف از انجام این پژوهش، بررسی الگوی بیان KiSS-1 mRNA در گامه‌های چرخه فحلی، در مغز موش صحرائی بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از ۱۵ موش صحرائی (*Rattus norvegicus*) بزرگسال استفاده شد. موش‌های صحرائی پس از تعیین گامه‌های چرخه فحلی (بررسی میکروسکوپی اسمیر واژن) با روش جابجایی مهره‌های گردن کشتار شدند (سه موش صحرائی در هر گامه). سه موش صحرائی نیز ۱۵ روز پس از تخمدان برداری کشتار شدند (به عنوان گروه شاهد). سپس مغز هر جانور بی‌درنگ خارج و بخش داین‌سفالن در نیتروژن مایع یخ زده شد و تا زمان انجام RT-PCR در دمای -80°C نگهداری شد. استخراج RNA، تیمار با آنزیم DNase I جهت حذف آلودگی‌های ژنومی و سنتز رشته اول cDNA (همگی توسط کیت‌های شرکت فرمتاز و مطابق دستورالعمل) انجام گرفت. برای طراحی پرایمر ژن KiSS-1 (NM_181692) و ژن کنترل داخلی GAPDH (M32599) از نرم‌افزار ALLELEID 6 استفاده شد. واکنش Real Time PCR به صورت مقایسه‌ای (Relative) با ۴۰ سیکل و دمای اتصال ۵۷ درجه سانتی‌گراد انجام و با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان بیان محاسبه شد:

$$\Delta\Delta Ct = (CT \text{ KiSS-1} - CT \text{ GAPDH}) \text{ phase} - (CT \text{ KiSS-1} - CT \text{ GAPDH}) \text{ OVX}$$

میانگین و انحراف معیار بیان مقایسه‌ای ژن‌های KiSS-1 در گامه‌های فحلی در هیپوتالاموس موش‌های صحرائی با آزمون من-ویتنی مقایسه شد (نرم افزار SPSS).

نتایج و بحث

کمترین سطح بیان KiSS-1 mRNA در داین‌سفالن موش‌های صحرائی در گامه استروس مشاهده شد و سطوح KiSS-1 mRNA در دیگر گامه‌ها، همانند بود ($P < 0.05$; نگاره ۱). پژوهش‌های پیشین نشان دادند که پپتید و mRNA کیس‌پپتین در دو جمعیت نورونی عمده در هسته آرکوات و هسته پیرا بطنی جلویی - شکمی^۱ (AVPV) هیپوتالاموس جوانندگان تمرکز یافته است (Kauffman et al., 2007). تخمدان برداری موجب افزایش معنی‌دار KiSS-1 mRNA در هسته آرکوات هیپوتالاموس می‌شود و ممکن است نورون‌های کیس‌پپتین این هسته میانجی اثر فیدبکی منفی استروژن بر تراوش گونادوتروپین باشند. بر خلاف هسته آرکوات، بیان KiSS-1 mRNA در هسته AVPV پس از تخمدان برداری کاهش و با ایمپلانت استرادیول افزایش می‌یابد و این احتمال مطرح شده که هسته AVPV ممکن است در ایجاد سرژ پیش از تخمک‌ریزی GnRH/LH نقش داشته باشد (Smith et al., 2005). در سال ۲۰۰۷، بیان KiSS-1 mRNA هسته آرکوات و AVPV در گامه‌های مختلف چرخه فحلی موش صحرائی بررسی شد (Adachi et al., 2007). بر پایه آن گزارش، سطوح KiSS-1 mRNA در AVPV در بعد از ظهر پرواستروس بیشینه و در مت استروس کمینه بود. از سوی دیگر، سطوح بیان KiSS-1 mRNA در آرکوات در دای استروس حداکثر و در پرواستروس حداقل بود و نظر می‌رسد در طول چرخه فحلی، بیان کیس-پپتین از گامه پرواستروس تا دای استروس به تدریج افزایش می‌یابد. نتایج پژوهش کنونی نشان داد بی KiSS-1 mRNA داین‌سفالن در گامه پرواستروس بالا بود ($P < 0.05$); از آنجایی که در این گامه بیان ژن در هسته AVPV زیاد و در آرکوات کم است چنین نتیجه‌ای منطقی به نظر می‌رسد. کمترین سطوح بیان ژن در گامه استروس مشاهده شد که با پایین بودن بیان ژن در هر دو هسته، سازگار است. در گامه‌های

³-Anteroventro-periventricular nucleus



دانشگاه صنعتی اصفهان

بهائش ملی نقش بیوتکنولوژی در علوم دامی
گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان
۳۱ شهریور ماه ۱۳۹۰

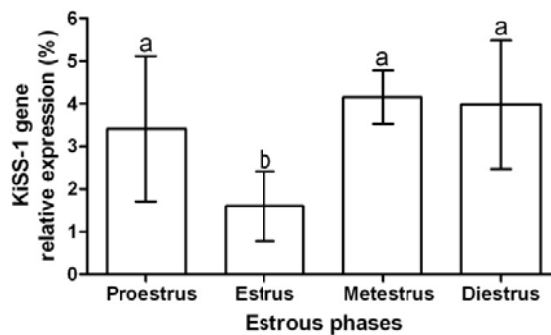


مجلس علمی
نقش بیوتکنولوژی در علوم دامی

متاستروس و دای استروس نیز سطوح بالایی از KiSS-1 mRNA مشاهده شد که با بالا بودن بیان ژن در هسته آرکوات در این دو گامه هماهنگی دارد. در پایان می‌توان گفت ممکن است برآیند فعالیت نورون‌های کیس‌پپتین هسته آرکوات و AVPV در برقراری الگوی تراوش GnRH/LH در سراسر چرخه فحلی نقش داشته باشد.

منابع

1. Adachi, S., S. Yamada, Y. Takatsu, H. Matsui, M. Kinoshita, K. Takase, H. Sugiura, T. Ohtaki, H. Matsumoto, Y. Uenoyama, H. Tsukamura, K. Inoue, K. Maeda. 2007. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *Journal of Reproduction and Development*, 53:367–378.
2. Kauffman, A.S., M.L. Gottsch, J. Roa, A.C. Byquist, A. Crown, D.K. Clifton, G.E. Hoffman, R.A. Steiner, M. Tena-Sempere. 2007. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology*, 148:1774-1783.
3. Roa, J., J.M. Castellano, V.M. Navarro, D.J. Handelsman, L. Pinilla, M. Tena-Sempere. 2009. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides*, 30:57-66.
4. Smith, J.T., M.J. Cunningham, E.F. Rissman, D.K. Clifton, R.A. Steiner. 2005. Regulation of kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146:3686-3692.



نگاره ۱- میانگین (± انحراف معیار) بیان نسبی ژن KiSS-1 در گامه‌های چرخه فحلی، در هیپوتالاموس موش صحرایی (n=3). میانگین‌های دارای بند واژه ی همانند، تفاوت آماری معنی داری ندارند (P>0.05).

Expression of KiSS-1 genes in hypothalamus of rat during estrous cycle

Mohammad Saied Salehi ^{1,*}, Mohammad Reza Jafarzadeh Shirazi ², Farid Pazhoohi ¹, Mohammad Javad Zamiri ²,
Mohammad Reza Namavar ³, Ali Niazi ⁴, Amin Ramazani ⁴, Nader Tanideh ⁵, Amin Tamadon ⁶

1- Graduate Student, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University, 2- Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University, 3- Histomorphometry and Stereology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, 4- Biotechnology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, 5- Stem Cell and Transgenic Technology Research Center & Department of Pharmacology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, 6- Division of Animal Health Management, School of Veterinary Medicine, Shiraz University & Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

* Corresponding author: sisas33@gmail.com

Abstract

Kisspeptins belong to a family of peptides which are expressed by KiSS-1 gene and through GnRH stimulate LH release. The aim of the present study was to evaluate the expression pattern of KiSS-1 mRNA during various phases of estrous cycle in the rat brain. The diencephalons of 15 female mature rats during various phases of estrous cycle were powdered in liquid nitrogen. Real time PCR was performed on tissue samples and expression of KiSS-1 mRNA was determined. Expression of KiSS-1 mRNA was lowest during estrus compared with other phases of the cycle ($P < 0.05$); however, no significant difference was found between mRNA expression during met-estrus, diestrus and pro-estrus. It may be concluded that co-ordinated actions of kisspeptin in various hypothalamic nuclei control the secretion of GnRH during estrous cycle.

In the present study, the expression level of KiSS-1 mRNA in diencephalon of rats was the lowest ($P < 0.05$) and levels of KiSS-1 mRNA in other phases were the same ($P > 0.05$). In conclusion it can be stated that resultant function of kisspeptin neurons in hypothalamic nucleus control the gonadotropin secretion during estrous cycle.

Keywords: KiSS-1, Estrous cycle, Hypothalamus, Rat