

بررسی فعالیت زیستی کیس پپتین ماهی قرمز بعد از افزودن گروه استیل به باقیمانده تیروزین انتهایی

آمینی

نوید امیدیان^۱، سید محسن اصغری^۲، بهروز حیدری^۳، عبدالمجید ولی پور^۱، هانیه ربوطی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، ایران

۳- گروه علوم دریایی، پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

در مطالعه حاضر، کیس پپتین-۱ ماهی قرمز با استفاده از روش سنتز فاز جامد و بر اساس به توالی ژن کیس-۱ ماهی قرمز (*Carassius auratus*) سنتز شد. سپس جهت بهبود فعالیت زیستی، گروه استیل به باقیمانده تیروزین انتهایی آمینی اضافه شد. پپتید سنتز شده (موسوم به ACKiss1) به روش RP-HPLC خالص‌سازی و ساختمان آن با استفاده از طیف سنجی جرمی ESI تأیید شد. جهت تعیین فعالیت زیستی، پپتید ACKiss1، کیس پپتین طبیعی (KISS1) و هورمون GnRH تجاری رایج به ماهی قرمز تزریق شده و برخی از پارامترهای مهم فیزیولوژی تولیدمثل این ماهی مورد مطالعه قرار گرفت. ACKiss1 و Kiss1 با دوز ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی و هورمون GnRH با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن تزریق شدند. ۶ ساعت بعد از تزریق خون‌گیری انجام شد و هورمون‌های جنسی در پلاسما اندازه‌گیری شدند. ۲۴ ساعت بعد از تزریق در یک گروه از ماهی‌ها شاخص‌های تولیدمثلی اندازه‌گیری شد. در گروه دیگری از ماهی‌ها ۲۴ ساعت بعد از تزریق بافت تخمدان و مغز برای مطالعات بافت‌شناسی و بیان ژن‌های (*kiss1* و *gpr54a*, *cyp19b*) جدا گردید. نتایج نشان داد که تغییرات قابل توجهی در پارامترهای بیوشیمیایی رخ داده است. همچنین، بیان ژن‌های *kiss1*, *cyp19b* و *gpr54a* در نمونه‌های بافت مغز و هم در بافت تخمدان در تیمار ACKISS1 نسبت به تیمار Kiss1 افزایش قابل توجهی را نشان داد. همچنین در بافت‌شناسی تخمدان مشخص شد که تحت تأثیر کیس پپتین و GnRH تعداد اووسیت‌های رسیده به‌صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرده است.

کلید واژه‌ها: طراحی پپتید، کیس پپتین، کیس-۱، تولیدمثل، هورمون

مقدمه

برای نخستین بار Lee و همکارانش در سال ۱۹۹۶ ژن جدیدی را کشف کردند که در سرکوبگری متاستاز سرطان ملانومای انسانی نقش داشت. پپتیدی که به‌وسیله این ژن کد می‌شود، ابتدا متاستین^۱ و سپس کیس پپتین^۲ (KISS1) نام گرفت که حروف SS در آن به معنی توالی سرکوبگر^۳ است [۱۶]. کیس پپتین‌ها از خانواده نوروپپتیدها هستند. نوروپپتیدها، مولکول‌های کوچکی هستند که فعالیت مغز و سایر سیستم‌های بدن را در مسیری اختصاصی تحت تأثیر خود قرار می‌دهند. این مولکول‌های فعال، عملکردی وسیع در مغز مهره‌داران دارند و با متأثر کردن گیرنده‌ها، ارتباط نورونی را در سطح سلولی تنظیم می‌کنند [۱۸]. ترشح هورمون‌های آزادکننده گنادوتروپینی در هیپوتالاموس یک مسیر محوری برای شروع فرآیند تولیدمثل و کنترل آن است. با وجود این محور و نقش اصلی GnRH محدودیت‌هایی وجود دارد که یکی از این محدودیت‌ها پیام‌رسان‌ها هستند. کیس پپتین‌ها را می‌توان یکی از این پیام‌رسان‌ها دانست که در بالادست نورون‌های تولیدکننده GnRH حضور دارند. کیس پپتین‌ها در این جایگاه نسبت به باز خورد ترشح هورمون‌های جنسی حساس هستند. پس می‌توان گفت که کیس پپتین‌ها به‌عنوان تنظیم‌کننده فرآیند تولیدمثل

¹ metastin² kisspeptin³ suppressor sequence

و بلوغ، ترشح GnRH و گنادوتروپین‌ها را کنترل می‌کند [۱۲، ۲۷] نوروتهایی که کیس پپتین را می‌سازند تقریباً در نزدیکی نوروتهای GnRH در هیپوتالاموس قرار دارند. ترشح این پپتیدها منجر به تحریک نوروتهای GnRH می‌شود. میزان ترشح کیس پپتین‌ها به محرک‌های داخلی از جمله استروئیدهای جنسی و محرک‌های خارجی مانند دوره‌ی نوری بستگی دارد. طبق یافته‌ها واکنش‌های بازخورد منفی استروئیدهای جنسی بر تولید GnRH و گنادوتروپین‌ها در هر دو فرد نر و ماده، توسط نوروتهای سازنده‌ی کیس پپتین کنترل می‌شود [۱۱].

استروئیدهای جنسی که در مهره‌داران توسط غدد جنسی تولید می‌شوند روی هیپوتالاموس اثر بازخوردی دارند. این اثر که ممکن است مثبت یا منفی باشد، منجر به تحریک ترشح یا پایان تولید GnRH می‌گردد. گیرنده‌های استروژن معمولاً به دو صورت آلفا و بتا حضور دارند که با اتصال به توالی خاصی از DNA به تغییرات استروژن پاسخ می‌دهند؛ بنابراین یا باعث تحریک یا باعث سرکوب رونویسی ژن‌های مربوط به کنترل استروژن می‌شود. آزمایش‌ها ثابت کردند که کیس پپتین‌ها در هیپوتالاموس نقش اصلی را در کنترل ترشح هورمون‌هایی که باعث تحریک ترشح استروژن می‌شوند، دارند [۱۴].

مطالعات حاکی از آن هستند که ژن کیس ۱ و ژن مربوط به گیرنده‌ی کیس پپتین (Gpr54) در غدد جنسی ماهیان نر بیان شده و هر سال نقش مهمی در رسیدگی جنسی و تولیدمثل آن‌ها دارد [۲۲]. مطالعات گزارش کردند که بیان ژن کیس ۱ در تخمدان‌ها نشان داده شده و وجود گیرنده‌های کیس پپتین در تخمدان ثابت شده است [۹]. در سطح غدد جنسی ارتباط مستقیمی بین بیان ژن کیس و گیرنده‌ی آن با رشد غدد جنسی وجود دارد [۲۱].

جهت بازسازی زخایر گونه‌های درخطر انقراض در شرایط مصنوعی، هم‌زمان‌سازی رسیدگی تخمک‌ها در مولدین و القای تخم‌ریزی به کمک هورمون درمانی صورت می‌گیرد. با توجه به محدودیت زمانی و مکانی حاکم در مراکز بازسازی زخایر، کیفیت و قیمت هورمون‌های مورد استفاده در این صنعت و تحریم‌ها، یافتن کاندیدای مناسب جهت افزایش راندمان زادآوری و هم‌زمان‌سازی رسیدگی تخمک‌ها از اهمیت ویژه برخوردار است.

مواد و روش‌ها

سنتز پپتیدها

پپتیدهای سنتز شده عبارت‌اند از کیس پپتین مربوط به ژن کیس ۱ ماهی قرمز (Kiss1)، کیس پپتین ژن کیس ۱ ماهی قرمز که گروه استیل به آمینواسید تیروزین شماره یک آن اضافه شده است (ACKiss1) و GnRH ماهی سالمون. توالی آمینواسیدی پپتید Kiss1 با توجه به توالی نوکلئوتیدهای مربوط به کیس پپتین ۱۰ آمینواسیدی در ژن کیس ۱ ماهی قرمز تعیین شد.

همه پپتیدها به روش سنتز فاز جامد^۴ ساخته شدند و به روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا^۵ خالص سازی شدند. پپتید Kiss1 با درجه خلوص ۹۷٪، پپتید ACKiss1 با درجه خلوص ۹۳٪ و GnRH با درجه خلوص ۹۴٪ به دست آمدند. ساختار شیمیایی این پپتیدها با روش طیف‌سنجی جرمی^۶ تأیید شد.

آماده سازی محلول تزریقی

⁴ Standard Fmoc solid-phase peptide synthesis chemistry

⁵ Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

⁶ Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS)

محلول تزریقی با نسبت یک میلی‌لیتر بر یک کیلوگرم وزن ماهی تهیه شد. یک میلی‌لیتر از محلول تزریقی کیس‌پپتین‌ها شامل ۱۰۰ میکروگرم پپتید به همراه ۱۰ میلی‌گرم دامپریدون (به‌عنوان بازدارنده‌ی دوپامین) بود که در حلال پروپیلن گلیکول حل شده بودند. این دوز مورد نظر به کمک یک پیش‌آزمون که در آن غلظت‌های مختلف کیس‌پپتین از ۱۰ میکروگرم تا ۲۰۰ میکروگرم مورد آزمایش قرار گرفته بودند تعیین شد. محلول تزریقی هورمون GnRH شامل ۲ گروه بود که در گروه اول ۱۰۰ میکروگرم از GnRH به همراه ۱۰ میلی‌گرم از دامپریدون که در پروپیلن گلیکول حل شده بودند. در گروه دوم به جای ۱۰۰ میکروگرم از GnRH، ۲۰۰ میکروگرم از آن در این محلول وجود داشت.

ماهی مولد

مولدین ماده ماهی قرمز با سن ۱۱ ماه و میانگین وزنی $74/5 \pm 0/5$ گرم و میانگین طول $15/5 \pm 0/5$ سانتیمتر که از نظر جنسی رسیده بودند از مزرعه گیلانپور در رشت تهیه شد. برای سازگاری مولدین با شرایط آزمایشگاهی، آن‌ها با آب کلرزدایی شده به مدت یک هفته نگهداری شدند و در این مدت به‌صورت ۲ بار در روز با پودر اصفهان مکمل تغذیه شدند. در محیط نگهداری مولدین دمای آب $21/5 \pm 0/8$ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول $8/4 \pm 0/1$ میلی‌گرم بر لیتر و $pH = 7/4$ بود و هیچ‌گونه دست‌کاری‌ای در شرایط فیزیکیوشیمیایی آب صورت نگرفت. بعد از سازگاری، مولدین به ۶ گروه تقسیم شدند، ۴ گروه تیمار پپتیدی که شامل تیمارهای KISS1، ACKISS1، H GnRH و L GnRH، یک گروه کنترل دامپریدون و یک گروه کنترل منفی. هر کدام از این گروه‌ها ۳ تکرار داشت که در هر تکرار ۱۰ قطعه ماهی بود. به‌طور کلی در هر گروه ۳۰ قطعه ماهی وجود داشت (۳ تکرار و در هر تکرار ۱۰ عدد مولد).

تیمارها

علاوه بر کنترل منفی که هیچ تزریقی در آن صورت نگرفت و کنترل دامپریدون که به نمونه‌های آن پروپیلن گلیکول و دامپریدون تزریق شد ۴ تیمار دیگر جود دارد. تیمار KISS1 که به نمونه‌های آن ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن ماهی پپتید Kiss1 تزریق شد، تیمار ACKISS1 که به نمونه‌های آن ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن ماهی پپتید ACKISS1 تزریق شد. تیمار L GnRH که به نمونه‌های آن ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن ماهی پپتید GnRH تزریق شد. تیمار H GnRH که به نمونه‌های آن ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن ماهی پپتید GnRH تزریق شد. پپتید GnRH سالمون به‌عنوان یک هورمون تجاری روتین برای خانواده کپور ماهیان به‌عنوان کنترل مقایسه‌ای تزریق شد. همه‌ی تزریقات به کمک سرنگ انسولین در عضله‌ی باله‌ی سینه‌ای مولدین صورت گرفت. مدت‌زمان آزمایش اثر پپتیدها بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون ۸ ساعت و برای شاخص‌های تولیدمثلی، بافت‌شناسی و بیان ژن ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد.

خون‌گیری

۸ ساعت بعد از تزریق خون‌گیری صورت گرفت. قبل از خون‌گیری مولدین در محلول پودر گل میخک با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر قرار داده شدند تا بی‌هوش شوند. پس از بی‌هوشی خون‌گیری توسط سرنگ‌های ۵ سی‌سی هپارینه و از سیاهرگ باله‌ی مخرجی صورت گرفت. خون‌ها بلافاصله در میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شده و در سانتریفیوژ با دور 3000 rpm سانتریفیوژ شدند تا پلاسما از سلول‌ها جدا شود. بعد از جدا شدن، پلاسما توسط یونولیت حاوی پودر یخ به آزمایشگاه جهت اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی منتقل شد.

اندازه‌گیری هورمون‌ها

برای اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی پلاسما از کیت شرکت Monobind ساخت کشور آمریکا (Product Code:4925-300) استفاده شد. این کیت از روش الیزا-ELISA برای اندازه‌گیری استفاده می‌کند.

تخمک‌کشی از مولدین

مدت زمان لازم بین تزریق پیتیدها و تخمک کشی ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت بعد از تزریق برای مقایسه‌ی اثر انواع پیتیدها از مولدین تخمک کشی صورت گرفت. برای این کار ناحیه زیرین و اطراف مخرج مولد توسط حوله خشک شد سپس با فشار نرم به ناحیه شکم به طوری که جهت فشار از سمت سر به سمت مخرج باشد تخمک‌ها در داخل سطل شسته‌ی خشک و تمیز ریخته شد. برای به دست آوردن میزان همآوری هر مولد، مقدار تخم‌های آن با ترازوهای دقیق اندازه‌گیری و شمارش شد.

اسپرم گیری و لقاح

بعد از اینکه تخمک‌ها در سطل ریخته شدند روی آن‌ها اسپرم ریخته شد تا لقاح خشک صورت گیرد. برای این کار دوباره ناحیه‌ی شکمی و مخرجی مولدین نر با حوله خشک شد و با فشار نرم اسپرم روی تخمک‌ها ریخته شد. برای لقاح اسپرم و تخمک این تست‌ها به مدت ۵ دقیقه به صورت خشک تکان داده شد سپس به آرامی مقداری آب تمیز از دیواره‌ی تشتت به تخم‌ها اضافه شد و تکان دادن کماکان ادامه داشت. چند ساعت بعد که تخم‌ها به صورت کامل آبگیری کردند در ویس گذاشته شدند.

محاسبه‌ی درصد لقاح

حدود ۲۴ ساعت بعد از لقاح تخم‌هایی که در داخل ویس‌ها بودند از نظر اینکه لقاح کرده‌اند یا خیر قابل تشخیص بودند. برای محاسبه‌ی درصد لقاح مقداری از تخم‌ها با آب در داخل پتری دیش ریخته شد و در زیر لوپ مقدار تخم‌های لقاح یافته و لقاح نیافته شمارش شد.

$$100 \times (\text{تعداد کل تخم‌های لقاح یافته} / \text{تعداد تخم‌های لقاح یافته شمارش شده}) = \text{درصد لقاح}$$

محاسبه‌ی درصد تفریح

۵ روز بعد از لقاح که تمام لاروها از تخم بیرون آمده بودند تمام لاروهای داخل هر ویس شمارش شد و تعداد آن‌ها به دست آمد و چون از قبل تعداد کل تخم‌های ریخته شده در هر ویس شمرده شده بود با استفاده از فرمول زیر درصد تفریح به دست آمد.

$$100 \times (\text{تعداد کل تخم‌های داخل ویس} / \text{تعداد لارو داخل ویس}) = \text{درصد تفریح}$$

بافت شناسی

۲۴ ساعت پس از تزریق، بافت مغز و تخمدان نمونه‌ها جهت مطالعات بافت‌شناسی تخمدان و اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های مرتبط با تولیدمثل (*cyp19b* و *gpr54a kiss1*) جدا شدند [۲۹]. برای بافت‌شناسی، ۲۴ ساعت بعد از تزریق تخمدان‌ها جدا شده و به مدت ۶ ساعت در محلول بوئن تثبیت شدند. بافت‌های تثبیت‌شده، توسط اتانول ۷۰ درصد چندین بار شسته شده و سپس توسط ایزوپروپانول آبگیری شدند. شفاف‌سازی و آبگیری نهایی بافت‌ها توسط سری اتانول و زایلن صورت گرفت و در آخر بافت‌ها به حمام پارافین انتقال یافتند. رنگ‌آمیزی بافت‌ها به روش هماتوکسین و اتوزین انجام شدند [۲۵].

بیان ژن

به منظور استخراج RNA از روش (TRIzol) استفاده شد که پروتکل آن شامل ۱۰۰-۵۰ mg از نمونه بافت کبد توسط نیتروژن مایع کوبیده شد و به نمونه ۱ میلی‌لیتر تریزول اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ۴۰۰ میکرو لیتر کلروفرم اضافه شد و به مدت ۱۵ ثانیه تحت تکان شدید قرار گرفت و به مدت ۳-۲ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. نهایتاً محلول حاصله در سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور (RCF) ۱۲۰۰۰ قرار داده شد. بعد از ایجاد سه فاز، فاز رویی حاوی RNA به آرامی جدا شد. از هر نمونه حدود ۳۰۰-۴۰۰ میکرو لیتر عصاره به میکروتیوب جدید منتقل شد. سپس ۵۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانول اضافه و به آرامی برای ۶ بار تکان داده شد تا دو فاز (ایزوپروپانول و عصاره RNA) باهم مخلوط شوند و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه

سانتی گراد با دور (RCF) ۱۲۰۰۰ در سانتریفیوژ قرار گرفت و سپس ایزوپروپانول از رسوب تشکیل شده جدا شد. سپس ۱۰۰۰ میکرو لیتر اتانول ۷۵٪ به رسوب اضافه و در سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور (RCF) ۷۵۰۰ قرار گرفت. این مرحله دو بار انجام شد. بعد از خالی نمودن اتانول میکروتیوب حاوی رسوب RNA به مدت ۲ دقیقه زیر هود قرار گرفت تا اتانول باقی مانده بپرد. سپس ۶۰ میکرو لیتر آب DEPC اضافه شد و در بن ماری به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت (تمام مراحل در زیر هود استریل انجام شد). در نهایت نمونه‌ها تا انجام آنالیز در فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

DNase

به منظور از بین بردن آلودگی ناشی از DNA از روش DNase برای نمونه‌ها استفاده شد که از طریق پروتکل DNase کیت فرمتاز (ترمو، آمریکا) انجام شد.

بر این اساس به ۱۶ میکرو لیتر از RNA استخراج شده، ۲ میکرو لیتر DNase و ۲ میکرو لیتر بافر DNase، اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس ۱ میکرو لیتر، EDTA اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در نهایت ۴ میکرو لیتر از نمونه جدا شده و به همراه مابقی RNA در فریزر -۷۰ نگهداری شد.

نانودراپ

برای به دست آوردن غلظت RNA و نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ از روش نانودراپ (Thermo Scientific) استفاده شد. ابتدا دستگاه با آب DEPC به عنوان بلانک صفر شد و سپس غلظت RNA و نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ سنجیده شد.

سنتز cDNA

برای سنتز cDNA از کیت Thermo scientific استفاده شد.

طراحی پرایمر

برای طراحی پرایمر، توالی ژن HSP70 در گونه مورد نظر با استفاده از بانک‌های توالی ژن (www.NCBI.NIH.gov/GeneBank)، جستجو شد. سپس با استفاده از نرم افزار Gene Runner، قطعه مورد نظر انتخاب شده و ۲۲-۱۸ باز اولیه به عنوان پیشرو و معکوس اختصاصی برای ژن HSP70 طراحی شد. سپس به منظور ایجاد اطمینان از طراحی اختصاصی پرایمر، توالی به دست آمده در سایت NCBI، بلاست شد. پرایمرها توسط شرکت Sinaclon سنتز شد (جدول ۱).

جدول ۱- توالی پرایمر ژن‌های تولیدمثلی

Gene	Forward	Reverse
<i>kiss1</i>	TGAGTGCAAATCCTCACCGAA	CAAGATTTAGCCCGACCCAG
<i>gpr54a</i>	TTCCATCAAAGACCCACGAGA	TTCCACAGAGGCTTGTCCA
<i>cyp19b</i>	GCCAGCAACTACTACAACAGC	CCCTGTTTCATGCATTCCGAT
β -actin	GACTTCGAGCAGGAGATGGG	CCGCAAGATTCCATACCCAGG

آنالیز آماری

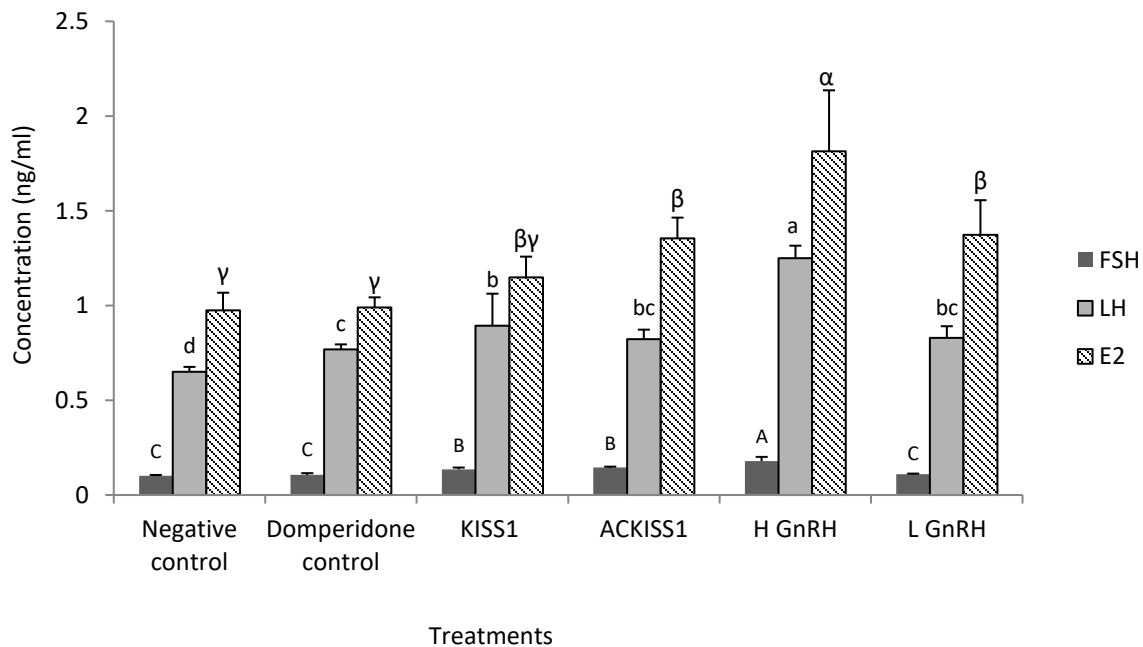
از نرم افزار SPSS برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد. همچنین از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف برای سنجش نرمال بودن داده‌ها استفاده شد. تعیین سطح معنی داری با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و پس از آزمون Duncan در سطح معناداری ۵ درصد ($p < 0.05$) استفاده شد.

نتایج

هورمون FSH، LH و E2

غلظت هورمون FSH و LH در گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدها بودند افزایش معنی داری نسبت به گروه‌های کنترل نشان دادند ($p < 0.05$) (شکل ۱). همچنین غلظت این هورمون‌ها در گروه H GnRH افزایش معنی داری نسبت سایر گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدها بودند داشت. گروه L GnRH افزایش معنی داری نسبت به گروه‌های کنترل نشان نداد. بیشترین غلظت این هورمون‌ها در تیمار H GnRH و کمترین غلظت آن‌ها در گروه کنترل منفی مشاهده شد.

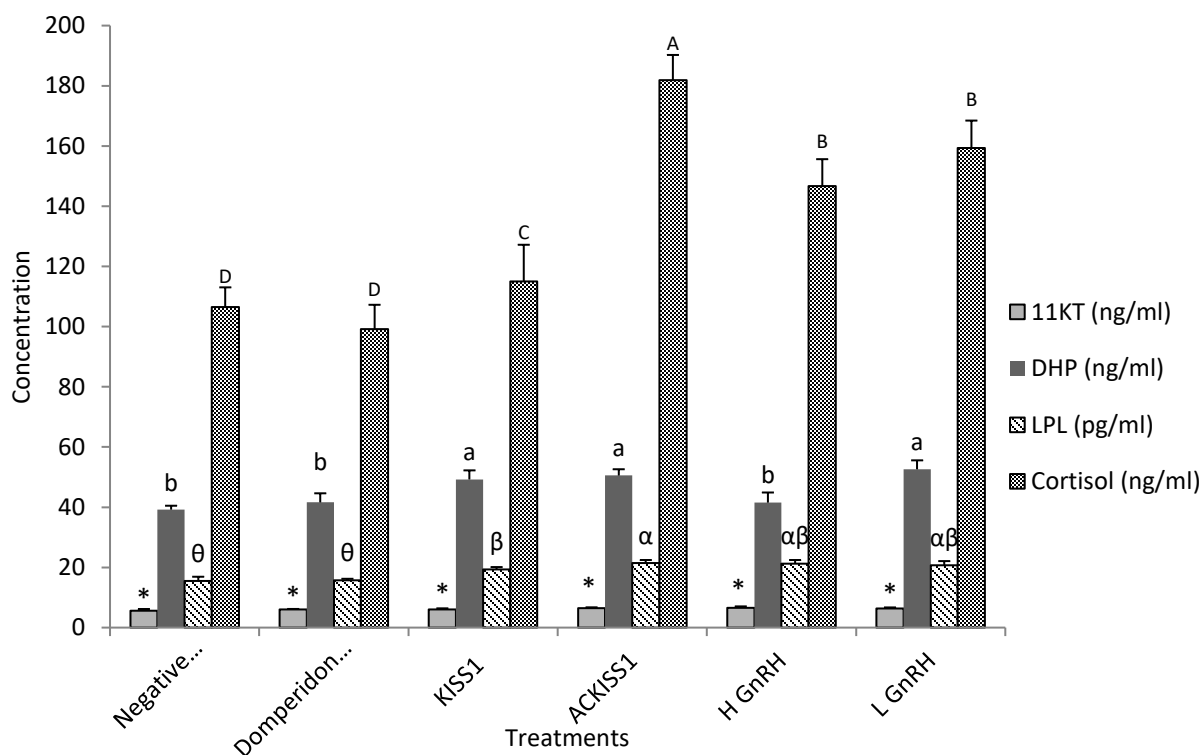
در نمونه‌هایی که تحت تأثیر غلظت‌های مختلف GnRH و ACKISS1 بودند افزایش معنی داری در غلظت هورمون E2 (۱۷ بتا استرادیول) مشاهده شد ($p < 0.05$) (شکل ۱). در گروه KISS1 تغییر معنی داری در غلظت این هورمون نسبت به نمونه‌های کنترل مشاهده نشد ($p > 0.05$). بیشترین غلظت این هورمون در گروه H GnRH و کمترین غلظت آن در نمونه‌های گروه کنترل مثبت یا کنترل دامپریدون ثبت شد.



شکل ۱- تغییرات غلظت هورمون FSH، LH و E2 در پلاسمای مولدین ماده ماهی قرمز که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف قرار داشتند. حروف متفاوت بالای نمودار نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار در گروه‌های مختلف می‌باشد.

هورمون DHP، 11KT، کورتیزول و آنزیم LPL

بیشترین غلظت هورمون DHP (17 alpha 20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one) در نمونه‌هایی که تحت تأثیر غلظت پایین هورمون GnRH قرار داشتند و کمترین غلظت آن در گروه کنترل منفی ثبت شد ($p < 0.05$) (شکل ۲). نمونه‌هایی که تحت تأثیر غلظت بالای هورمون GnRH قرار داشتند تغییر معنی‌داری در غلظت هورمون DHP نشان ندادند ($p > 0.05$). در هیچ‌یک از گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بودند تغییر معنی‌داری در غلظت هورمون 11KT (۱۱ کتوتسترون) نسبت به گروه‌های کنترل یا نسبت به یکدیگر مشاهده نشد ($p < 0.05$). غلظت هورمون کورتیزول در نمونه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بودند افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$) (شکل ۲). غلظت این هورمون در گروه ACKISS1 از گروه‌هایی که تحت تأثیر غلظت‌های بالا و پایین هورمون GnRH قرار داشتند بالاتر بود ($p < 0.05$). غلظت این هورمون در گروه KISS1 از گروه‌های کنترل بالاتر ولی از سایر گروه‌ها پایین‌تر بود ($p < 0.05$). غلظت آنزیم LPL (لیپوپروتئین لیپاز) در گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بودند افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل داشت ($p < 0.05$) (شکل ۲). بیشترین غلظت این آنزیم در گروه ACKISS1 و کمترین غلظت آن در گروه کنترل منفی بود. گروه KISS1 کاهش معنی‌داری در غلظت این آنزیم نسبت به گروه ACKISS1 نشان داده است ($p < 0.05$).

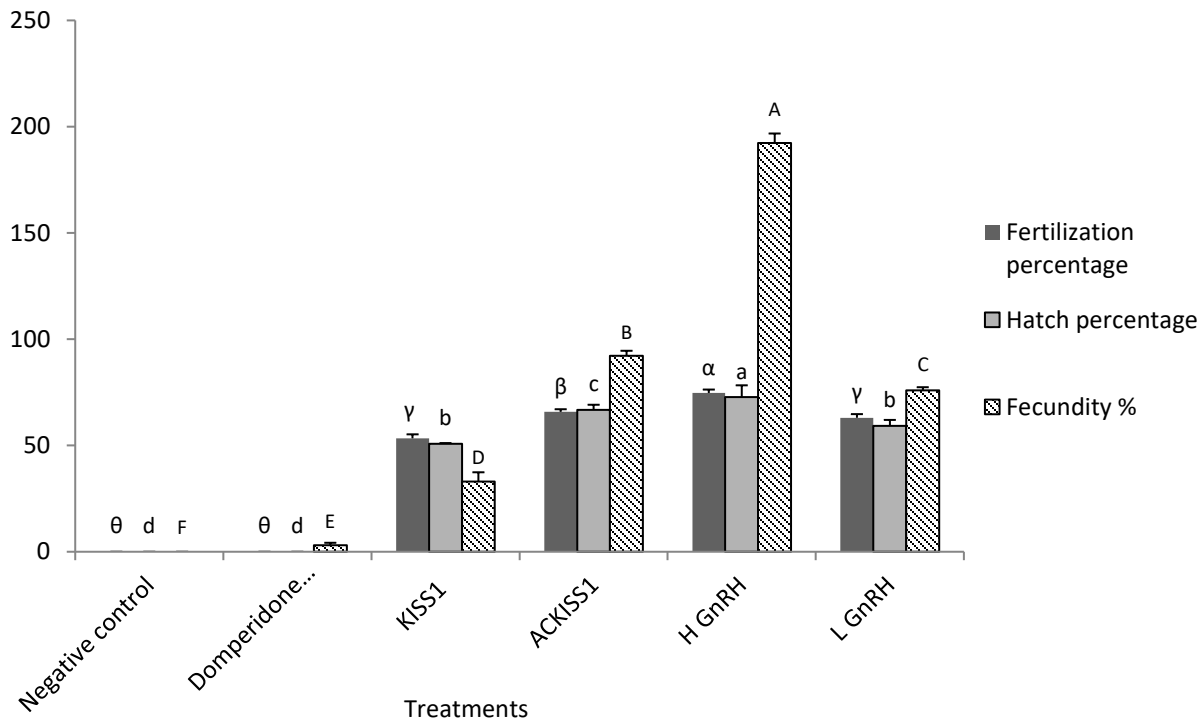


شکل ۲- تغییرات غلظت هورمون DHP، 11KT، کورتیزول و آنزیم LPL در پلاسماهای مولدین ماهی قرمز که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف قرار داشتند. حروف متفاوت بالای نمودار نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در گروه‌های مختلف می‌باشد.

شاخص‌های تولیدمثلی

میزان همآوری نسبی در گروه‌های مختلف نسبت به گروه‌های کنترل اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0.05$) (شکل ۳). بیشترین میزان همآوری یا به عبارتی بیشترین میزان تولیدمثل در گروهی مشاهده شد که تحت تأثیر غلظت بالای هورمون GnRH قرار داشت و کمترین میزان آن در گروه کنترل منفی مشاهده شد. در واقع گروه کنترل منفی ۲۴ ساعت بعد از تزریق تخم‌ریزی نکرد و چند روز بعد تخم‌ریزی طبیعی خود با مقدار کم را انجام داد. میزان همآوری در گروه ACKISS1 به صورت چشمگیری از گروه L GnRH و گروه KISS1 بالاتر بود ($p < 0.05$). بیشترین میزان لقاح نیز مانند همآوری در گروهی که تحت تأثیر غلظت بالای هورمون GnRH قرار داشتند مشاهده شد و در گروه‌های کنترل هیچ‌گونه لقاحی مشاهده نشد ($p < 0.05$) (شکل ۳). گروه ACKISS1 نیز نسبت به گروه L GnRH و KISS1 افزایش معنی‌داری در میزان لقاح نشان داد ($p < 0.05$).

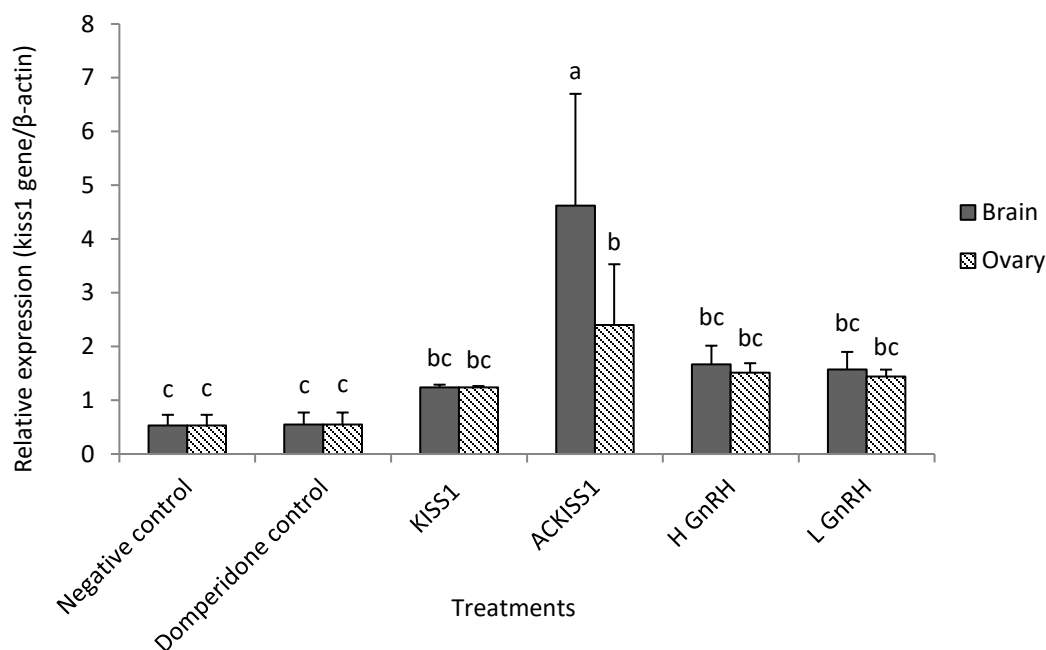
در گروه کنترل منفی چون هیچ تخم‌ریزی وجود نداشت به دنبال آن درصد لقاح و تفریح در آن صفر شد اما در گروه کنترل دامپریدون چون تخمک‌ها نتوانستند با موفقیت لقاح کنند به دنبال آن درصد تفریح صفر شد. میزان تفریح در گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بودند اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0.05$) (شکل ۳). بیشترین میزان تفریح به ترتیب در گروه H GnRH و ACKISS1 مشاهده شد. میزان تفریح در گروه ACKISS1 از گروه‌های L GnRH و KISS1 بالاتر بود ($p < 0.05$).



شکل ۳- اختلاف میزان همآوری نسبی، درصد لقاح و تفریح در گروه‌های مختلف مولدین ماده ماهی قرمز که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف قرار داشتند. حروف متفاوت بالای نمودار نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در گروه‌های مختلف می‌باشد.

بیان نسبی ژن *kiss1* در بافت تخمدان و مغز

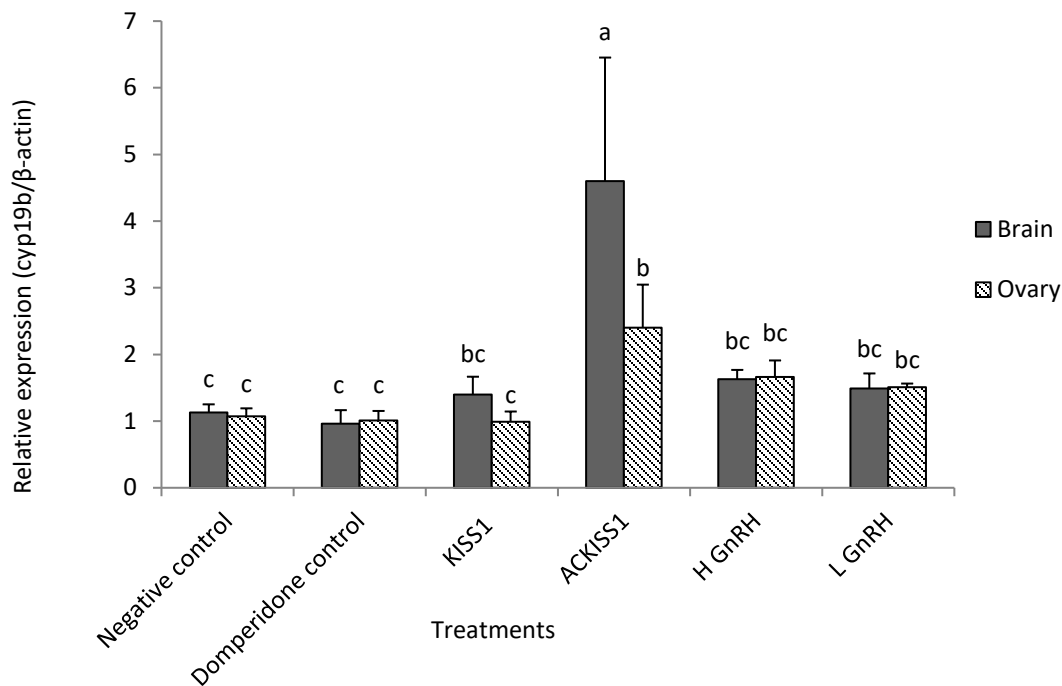
بیان نسبی ژن *kiss1* در گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدها بودند نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش معنی‌داری نشان ندادند به‌جز در گروهی که تحت تأثیر ACKISS1 بودند ($p < 0.05$) (شکل ۴). بیان نسبی این ژن در گروه‌هایی که با GnRH تیمار شده بودند تغییر معنی‌داری با گروهی که تحت تأثیر پپتید Kiss1 بود نشان نداد. بیشترین میزان بیان این ژن در گروه ACKISS1 و کمترین میزان بیان آن در گروه کنترل منفی مشاهده شد.



شکل ۴- تغییرات بیان نسبی ژن *kiss1* در بافت تخمدان و مغز مولدین ماده ماهی قرمز که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بودند. حروف متفاوت بالای نمودار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد.

بیان نسبی ژن *cyp19b* در بافت تخمدان و مغز

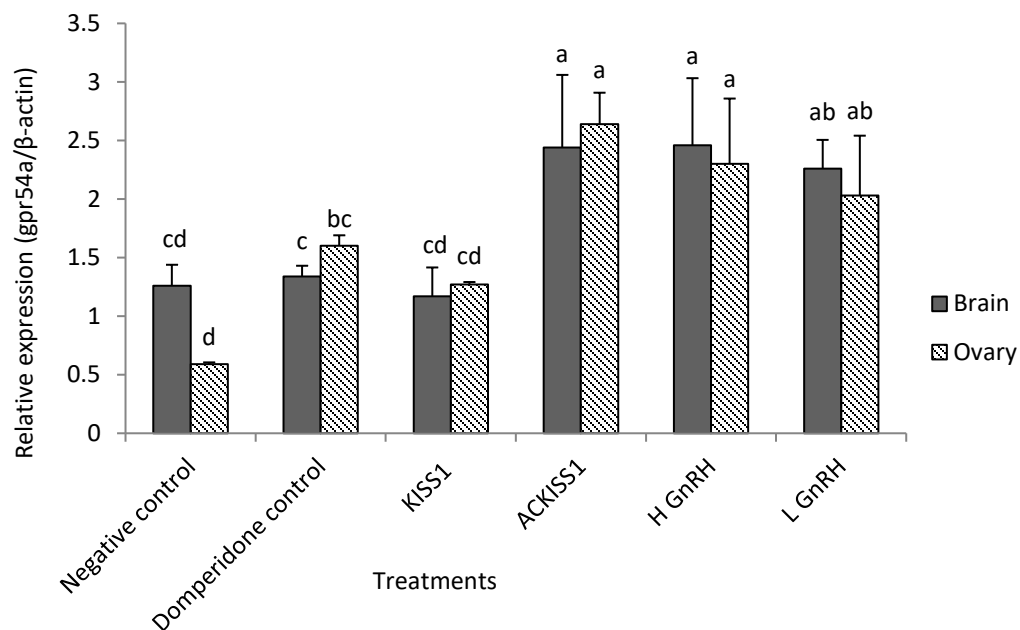
بیان نسبی ژن *cyp19b* در بافت تخمدان و مغز گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بودند افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل نشان نداد به‌جز در گروه ACKISS1 ($p < 0.05$) (شکل ۵)؛ مانند ژن *kiss1* بیشترین میزان بیان این ژن هم در بافت تخمدان و هم در بافت مغز در گروه ACKISS1 ثبت شد.



شکل ۵- تغییرات بیان نسبی ژن *cyp19b* در بافت تخمدان و مغز مولدین ماده ماهی قرمز که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بودند. حروف متفاوت بالای نمودار نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه‌ها می‌باشد.

بیان نسبی ژن *gpr54a* در بافت تخمدان و مغز

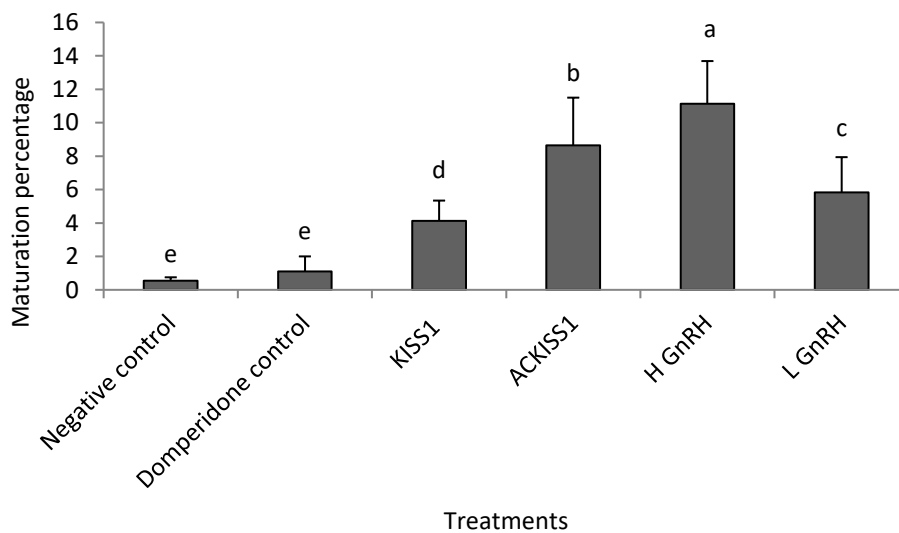
بیان نسبی ژن *gpr54a* در گروه‌هایی که تحت تأثیر GnRH و ACKiss1 بوده‌اند افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل و گروه KISS1 نشان داد ($p < 0.05$) (شکل ۶). بیشترین میزان بیان این ژن به ترتیب در گروه H GnRH و ACKISS1 ثبت شد و کمترین میزان بیان آن در گروه KISS1 ثبت شد. گروه KISS1 نتوانستند افزایش معنی‌داری در بیان ژن *gpr54a* ایجاد کند و بیان این ژن در گروه‌هایی که تحت تأثیر GnRH بودند بیشتر از نمونه‌هایی بود که در اثر Kiss1 قرار داشتند ($p < 0.05$).



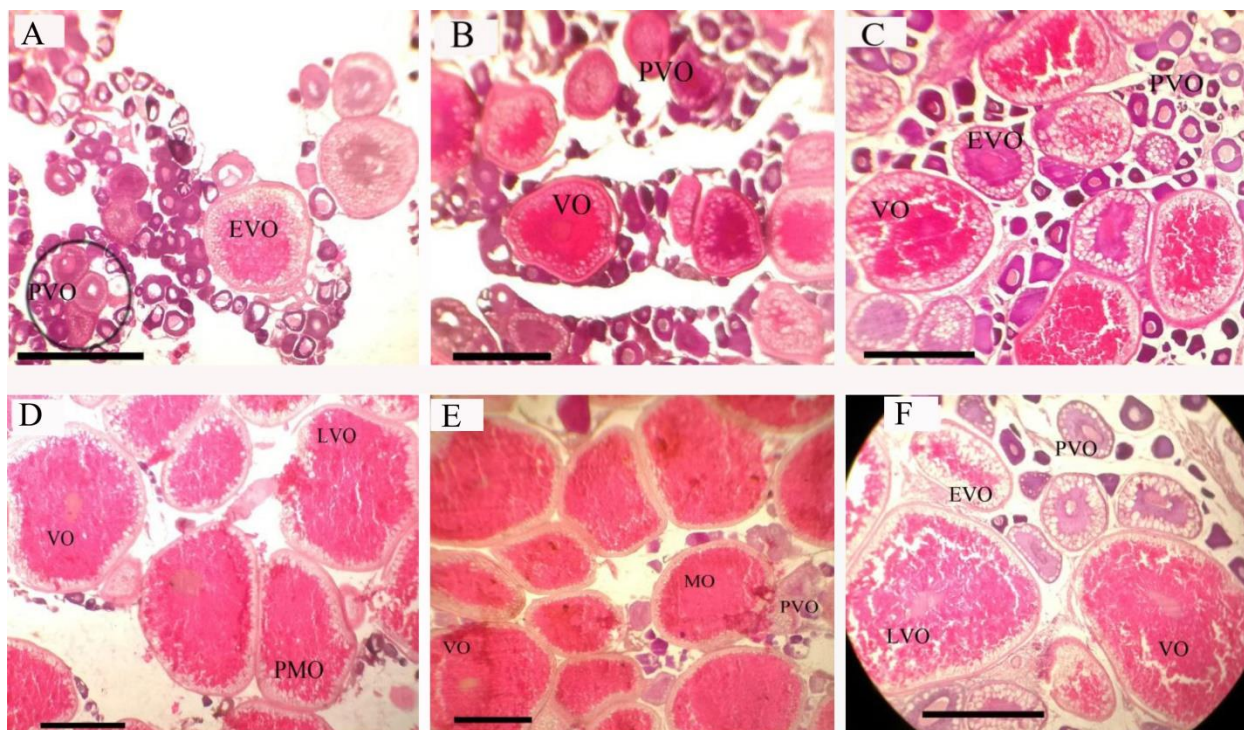
شکل ۶- تغییرات بیان نسبی ژن *gpr54a* در بافت تخمدان و مغز مولدین ماده ماهی قرمز که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بودند. حروف متفاوت بالای نمودار نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه‌ها می‌باشد.

رسیدگی اووسیت‌ها

درصد رسیدگی اووسیت‌ها در گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0.05$) (شکل ۷). بیشترین میزان رسیدگی اووسیت‌ها در گروه H GnRH و کمترین میزان آن در گروه کنترل منفی مشاهده شد. در گروه‌هایی که مولدین تحت تأثیر پپتیدها بودند به‌ویژه در گروه ACKISS1 و GnRH ها اووسیت‌های بیشتری در مراحل انتهایی رسیدگی خود بودند.



شکل ۷- تغییرات رسیدگی اووسیت‌ها تحت تأثیر پپتیدهای مختلف در مولدین ماده ماهی قرمز. حروف متفاوت بالای نمودار نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در گروه‌های مختلف می‌باشد.



شکل ۸- تغییرات رشد تخمدان و اووسیت‌های مولدین ماده ماهی قرمز که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بوده‌اند. شکل (A) تخمدان نمونه‌های کنترل منفی را نشان می‌دهد که هیچ‌گونه تزریقی در آن‌ها انجام نگرفت. در این گروه اووسیت‌ها غالباً در مرحله‌ی پیش از زرده سازی هستند. شکل (B) تخمدان نمونه‌های کنترل دامپریدون را نشان می‌دهد که ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی دامپریدون حل شده در پروپیلن گلیکول را دریافت کردند. در این گروه اووسیت‌ها غالباً در مرحله‌ی پیش از زرده سازی هستند. شکل (C) تخمدان نمونه‌های تیمار KISS1 را نشان می‌دهد که نمونه‌های آن ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی پپتید KISS1 و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن ماهی دامپریدون حل شده در پروپیلن گلیکول را دریافت کردند. در این گروه اووسیت‌ها در مرحله‌ی پیش از زرده سازی و زرده سازی قرار دارند. شکل (D) تخمدان نمونه‌های تیمار ACKISS1 را نشان می‌دهد که نمونه‌های آن ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی پپتید ACKISS1 و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن ماهی دامپریدون حل شده در پروپیلن گلیکول را دریافت کردند. در این گروه اووسیت‌ها در مرحله‌ی پیش از زرده سازی و اوایل رسیدگی قرار دارند. شکل (E) تخمدان نمونه‌های تیمار H GnRH را نشان می‌دهد که نمونه‌های آن ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی GnRH و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن ماهی دامپریدون حل شده در پروپیلن گلیکول را دریافت کردند. در این گروه اووسیت‌ها در مراحل زرده سازی و به صورت غالب در مرحله‌ی رسیدگی مشاهده می‌شوند. شکل (F) تخمدان نمونه‌های تیمار L GnRH را نشان می‌دهد که نمونه‌های آن ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی GnRH و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن ماهی دامپریدون حل شده در پروپیلن گلیکول را دریافت کردند. در این گروه اووسیت‌ها در مراحل پیش از زرده سازی و زرده سازی مشاهده می‌شوند.

بحث

در این مطالعه سعی شده است که ابتدا پپتیدی ۱۰ آمینو اسیدی به نام Kiss1 مطابق با توالی آمینو اسیدی کیس پپتین ۱ ماهی قرمز طراحی و سنتز شود. این کار با توجه به قسمتی از توالی نوکلئوتیدی ژن *kiss1* ماهی قرمز که کد کننده کیس پپتین ۱۰ است انجام گرفت. در مرحله ی بعد یک مدیفیکیشن روی این پپتید Kiss1 صورت گرفت که در آن یک گروه استیل به گروه آمینی آمینو اسید تیروزین شماره یک این پپتید متصل شد. در مرحله ی بعد اثری که این مدیفیکیشن روی فعالیت زیستی این پپتید می گذارد با تزریق این پپتیدها به عضله ی یک مدل آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت.

در مطالعات مختلف نشان داده شده است که ترشح گنادوتروپین ها در گونه های مختلف بسته به نوع کیس پپتین و نوع گونه متفاوت است و کیس پپتین های مختلف تأثیر متفاوتی در گونه های مختلف دارند و حتی تأثیر یک کیس پپتین روی انواع گنادوتروپین نیز متفاوت است [۸، ۱۵، ۲۶]. در مطالعه ی حاضر Kiss1 منجر به افزایش ترشح هورمون FSH و LH نسبت به نمونه های کنترل و گروه GnRH هم غلظت خود (۱۰۰ میکروگرم) شده است ولی به نظر می رسد که تأثیر آن روی هورمون FSH بیشتر باشد. استیله کردن پپتید Kiss1 نیز باعث شده است که اثر این پپتید روی ترشح هورمون FSH به مقدار کمی بیشتر از حالت طبیعی آن باشد ولی تأثیر این پپتید را روی هورمون LH به مقدار کمی کاهش داده است ولی به طور کلی نسبت به نمونه های کنترل منجر به افزایش غلظت این هورمون ها شده است. این افزایش غلظت گنادوتروپین ها در تیمارهای کیس پپتین نسبت به نمونه های کنترل می تواند به دلیل اثر غیرمستقیم کیس پپتین ها روی هیپوفیز پیشین از طریق هورمون GnRH باشد گرچه بعضی از مطالعات معتقد هستند که کیس پپتین می تواند به صورت مستقیم روی هیپوفیز پیشین اثر گذاشته و منجر به افزایش ترشح گنادوتروپین ها شود [۲۳].

مطالعات نشان دادند که تزریق کیس پپتین منجر به بالا رفتن غلظت هورمون 11KT در ماهیان استخوانی می گردد. در یک آزمایش ۲ نوع کیس پپتین متفاوت به جنس ماده مولدین *scombroid fish* تزریق شد و افزایش معنی داری در غلظت هورمون های 11KT و E2 نشان داده است [۲۴]. در این مطالعه نیز انتظار می رفت که همه گروه ها در مقایسه با نمونه های کنترل مثبت و کنترل دامپریدون منجر به افزایش سطوح هورمون های استروئیدی جنسی در خون شوند. با توجه به شکل ۲ هیچ کدام از پپتیدها منجر به افزایش معنی داری در غلظت هورمون 11KT در پلاسمای مولدین ماده ماهی قرمز نشده است. این حالت معمولاً به این دلیل است که این هورمون آندروژن غالب در مراحل پیش از زرده سازی در جنس ماده است و بالا بودن این هورمون در این گروه ها نشان دهنده عبور مولدین از مرحله ی پیش از زرده سازی است [۳۱].

پپتید ACKiss1 هم نسبت به نمونه های کنترل و هم نسبت به پپتید Kiss1 افزایش بیشتری در غلظت هورمون E2 را سبب شده است. می توان این گونه برداشت کرد که استیله کردن انتهای کیس پپتین منجر به افزایش اثر این پپتید روی هورمون E2 شده است. در مقایسه ی اثر کیس پپتین ها با گروه های GnRH روی این هورمون، پپتید Kiss1 نسبت به GnRH ضعیف تر عمل کرده است ولی پپتید ACKiss1 در غلظت های برابر اثری مشابه با GnRH روی ترشح این هورمون دارد. در غلظت های بالاتر GnRH این پپتید توانسته است اثر تحریکی بیشتر از کیس پپتین روی ترشح هورمون E2 داشته باشد.

در این مطالعه همچنین انتظار می رفت که پپتیدهای مختلف اثر تحریکی مشابهی روی هورمون DHP داشته باشند. شکل ۲ در نتایج نشان می دهد که پپتیدهای مختلف، هم کیس پپتین ها و هم GnRH باعث افزایش غلظت این هورمون در پلازما شده اند. در مقایسه ی کیس پپتین ها با GnRH این گونه می توان گفت که در غلظت برابر این ۲ نوع پپتید اثر تقریباً مشابهی روی ترشح هورمون DHP دارند. در مورد انواع کیس پپتین، استیله کردن انتهای پپتید Kiss1 نتوانست اثر این پپتید روی هورمون DHP را افزایش دهد. همان طور که در شکل ۲ آورده شده است هر دو نوع کیس پپتین تقریباً اثر مشابهی روی ترشح هورمون DHP داشته اند.

یک مطالعه نشان داده است که کورتیزول برای آب گیری اووسیت ها (اووسیت های ماهی ها قبل از تخم ریزی نیاز به آبگیری و حجیم شدن دارند) در ماهی ها ضروری است و افزایش کورتیزول به بهبود این فرایند کمک می کند [۲۰]. داده های این مطالعه نشان داده اند که با استیله کردن پپتید

Kiss1 باعث افزایش قابل توجه اثر این پپتید روی ترشح هورمون کورتیزول شده است. پپتید Kiss1 منجر به افزایش غلظت هورمون کورتیزول نسبت به نمونه‌های کنترل منفی و کنترل دامپریدون شده است که دلیل آن به اثر غیرمستقیم کیس پپتین روی هورمون‌های استروئیدی از طریق گنادوتروپین‌ها روی غدد جنسی برمی‌گردد. استیله کردن این پپتید باعث ترشح بیشترین مقدار هورمون کورتیزول در این مطالعه شده است. در مقایسه اثر کیس پپتین‌ها با هورمون GnRH مشخص شد که غلظت‌های مختلف هورمون GnRH از نظر اثر بر روی ترشح کورتیزول مؤثرتر از پپتید Kiss1 عمل کرد ولی پپتید ACKiss1 از هر ۲ غلظت GnRH مؤثرتر بود.

آنزیم لیپوپروتئین لیپاز به‌عنوان بیومارکر عبور از مرحله زرده سازی شناخته می‌شود زیرا هر مقدار که اووسیت‌ها از مرحله زرده سازی پیش‌تر می‌روند و به مرحله رسیدگی خود نزدیک می‌شوند میزان فعالیت این آنزیم افزایش پیدا می‌کند [۱]. در مطالعه‌ی حاضر نیز تیمار مولدین با پپتیدهای مختلف باعث افزایش غلظت این آنزیم شده است. پپتید Kiss1 باعث افزایش معنی‌دار غلظت این آنزیم نسبت به نمونه‌های کنترل شده است که می‌تواند تأییدکننده اثر تحریکی کیس پپتین بر روند رسیدگی اووسیت‌ها باشد. میزان فعالیت این آنزیم در گروهی که با پپتید Kiss1 تیمار شده بودند تقریباً با گروهی که توسط هورمون GnRH تیمار شده بودند برابر است.

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که حضور کیس پپتین برای رشد و بلوغ تخمدان و اووسیت‌ها ضروری است و نشان داده شده که تیمار مولدین با کیس پپتین منجر به افزایش میزان رشد تخمدان و اووسیت می‌شود [۳-۴، ۶، ۱۳، ۲۸]. در این مطالعه نیز در گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدها بودند افزایش چشمگیری در رسیدگی اووسیت‌ها مشاهده شد. در گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدها قرار داشتند تعداد اووسیت‌هایی که به مراحل بالاتر بلوغ رسیده بودند افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های کنترل داشت. بیشترین سرعت رسیدگی اووسیت‌ها در گروه H GnRH مشاهده شد. گروه KISS1 نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش معنی‌داری در رسیدگی اووسیت‌ها نشان داد که بیان‌گر تأثیر این پپتید روی هورمون‌های غدد محور تولیدمثلی مانند هیپوتالاموس، هیپوفیز و غدد جنسی می‌باشد که در نهایت تأثیر خود را روی گامت‌ها اعمال کرده است. با استیله کردن کیس پپتین و تولید ACKiss1 تأثیر این پپتید روی رسیدگی اووسیت‌ها بیش‌ازپیش شده است.

به دنبال تأثیراتی که کیس پپتین‌ها و غلظت‌های مختلف هورمون GnRH روی رسیدگی اووسیت‌ها گذاشته بودند توانستند میزان تخم‌ریزی را در مولدین ماهی قرمز بالا ببرند. غلظت بالای هورمون GnRH همان‌طور که توانست بیشترین اثر را بر رسیدگی اووسیت‌ها داشته باشد به دنبال آن باعث افزایش چشم‌گیری در میزان تخم‌ریزی و همآوری داشته است. پپتید ACKiss1 نیز با موفقیت توانسته است میزان همآوری و تخم‌ریزی را در این مولدین به صورت معنی‌داری بالا ببرد.

در مورد بیان ژن‌های دخیل در تولیدمثل، بیان این ژن‌ها در نوره‌های مغز و در اندام‌هایی مانند پانکراس، هیپوفیز و غدد جنسی (بیضه و تخمدان) ثابت شده است [۱۰].

در این مطالعه نیز بیان ژن *gpr54* در گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتید بودند مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که در گروه‌های GnRH و گروه ACKISS1 افزایش معنی‌داری در بیان این ژن چه در بافت مغز و چه در بافت تخمدان وجود دارد. پپتید Kiss1 نتوانست منجر به افزایش بیان این ژن شود ولی با استیله کردن انتهای آن، تأثیر این پپتید روی بیان ژن *gpr54* در بافت مغز و تخمدان بالا رفته است.

یک مطالعه بیان ژن *cyp19b* را در بافت مغز و تخمدان ماهی‌ها گزارش کرده است [۱۷]. مطالعه‌ای دیگر نشان داد که افزایش غلظت هورمون‌های جنسی باعث افزایش بیان ژن *cyp19b* می‌شود [۱۹، ۳۰]. نتایج مطالعه‌ای دیگر روی جنس نر ماهی باس دریایی اروپایی ثابت کرد که در بافت مغز این ماهی با تیمار هورمون‌های جنسی بیان ژن *cyp19b* افزایش می‌یابد [۲]. در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد که تا مرحله‌ی زرده سازی میزان بیان ژن *cyp19b* پایین است ولی وقتی گامت‌ها به مراحل انتهایی رسیدگی نزدیک می‌شوند میزان بیان این ژن نیز بالا می‌رود [۷].

در این مطالعه نیز بیان ژن *cyp19b* در بافت مغز و تخمدان در گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدها نسبت به گروه‌های کنترل افزایش معنی‌داری نشان ندادند به‌جز گروهی که تحت تأثیر پپتید ACKiss1 بودند. از این داده‌ها می‌توان این‌گونه برداشت کرد که استیله کردن انتهای پپتید Kiss1 در نهایت منجر به افزایش اثر این پپتید روی بیان ژن *cyp19b* هم در بافت مغز و هم در بافت تخمدان گردیده است. ناحیه AVPV در مغز نسبت به هورمون‌های جنسی دی مورفیک است و بیشترین ترشح کیس‌پپتین را در جنس ماده دارد. هورمون‌های استروئیدی جنسی با فیدبک مثبت روی ناحیه AVPV باعث افزایش بیان ژن *kiss1* می‌گردد. افزایش بیان این ژن نیز با افزایش سنتز کیس‌پپتین به‌نوبه‌ی خود منجر به افزایش ترشح هورمون‌های استروئیدی جنسی می‌گردد [۵]. به‌طور خلاصه نوروهای *kiss1* در ناحیه AVPV با هورمون‌های جنسی در فیدبک مثبت هستند و افزایش یکی منجر به افزایش دیگری می‌شود. در این مطالعه هم در بافت تخمدان و هم در بافت مغز تنها پپتید ACKiss1 منجر به افزایش بیان ژن *kiss1* شده است. که این افزایش به نظر می‌رسد که به خاطر افزایش غلظت هورمون E2 در خون و فیدبک مثبت آن روی ناحیه AVPV باشد که منجر به تحریک بیان ژن *kiss1* و سنتز کیس‌پپتین ۱ شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج تجزیه و تحلیل هورمون، بافت‌شناسی، و بیان ژن در هر دو بافت مغز و تخمدان نشان داد که پپتید Kiss1 به موازات استیلاسیون N ترمینال منجر به افزایش قابل توجهی در توانایی تولید مثل kp-10 می‌شود. این پپتید را می‌توان پس از تحقیقات بیشتر به عنوان یکی از کاندیدهای جایگزین برای هورمون‌های مصنوعی در آینده در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مایلند از کارکنان مرکز تحقیقات حوضه دریای خزر، گروه علوم دریایی و مرکز تحقیقات شیمی سنتز برای همکاری و پشتیبانی فنی تشکر کنند.

تاییدیه اخلاقی

تاییدیه اخلاقی این پژوهش توسط کمیته اخلاقی دانشکده علوم دانشگاه گیلان (شماره مرجع ۲۹۴۹۵۱۸) انجام شد.

منابع

1. Akhavan, S. R., et al. (2016). "Changes of vitellogenin and Lipase in captive Sterlet sturgeon *Acipenser ruthenus* females during previtellogenesis to early atresia." *Fish Physiology and Biochemistry* 42(3): 967-978.
2. Alvarado, M., et al. (2016). "Actions of sex steroids on kisspeptin expression and other reproduction-related genes in the brain of the teleost fish European sea bass." *Journal of Experimental Biology* 219(21): 3353-3365.
3. Beck, B. H., et al. (2012). "Chronic exogenous kisspeptin administration accelerates gonadal development in basses of the genus *Morone*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 162(3): 265-273.
4. Calder, M., et al. (2014). "Implantation failure in female Kiss1^{-/-} mice is independent of their hypogonadic state and can be partially rescued by leukemia inhibitory factor." *Endocrinology* 155(8): 3065-3078.
5. Colledge, W. (2008). *GPR54 and kisspeptins. Orphan G Protein-Coupled Receptors and Novel Neuropeptides*, Springer: 117-143.
6. Dhillon, W. S., et al. (2005). "Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(12): 6609-6615.

7. Ezagouri, M., et al. (2008). "Expression of the two cytochrome P450 aromatase genes in the male and female blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) during the reproductive cycle." *General and Comparative Endocrinology* 159(2-3): 208-213.
8. Felip, A., et al. (2009). "Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals." *Molecular and Cellular Endocrinology* 312(1-2): 61-71.
9. Gaytan, F., et al. (2009). "KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 296(3): E520-E531.
10. Gottsch, M. L., et al. (2004). "A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse." *Endocrinology* 145(9): 4073-4077.
11. Kah, O. (2009). "Endocrine targets of the hypothalamus and pituitary." *Fish Physiology* 28: 75-112.
12. Kanasaki, H., et al. (2017). "How is GnRH regulated in GnRH-producing neurons? Studies using GT1-7 cells as a GnRH-producing cell model." *General and Comparative Endocrinology* 247: 138-142.
13. Kim, N. N., et al. (2014). "Kisspeptin regulates the hypothalamus-pituitary-gonad axis gene expression during sexual maturation in the cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 168: 19-32.
14. Kinoshita, M., et al. (2005). "Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats." *Endocrinology* 146(10): 4431-4436.
15. Kitahashi, T., et al. (2009). "Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka." *Endocrinology* 150(2): 821-831.
16. Lee, J.-H., et al. (1996). "KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 88(23): 1731-1737.
17. Lephart, E. D. (1996). "A review of brain aromatase cytochrome P450." *Brain Research Reviews* 22(1): 1-26.
18. Mechaly, A. S., et al. (2013). "The kisspeptin system genes in teleost fish, their structure and regulation, with particular attention to the situation in Pleuronectiformes." *General and Comparative Endocrinology* 188: 258-268.
19. Menuet, A., et al. (2005). "Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene." *Journal of Comparative Neurology* 485(4): 304-320.
20. Milla, S., et al. (2006). "Hydration of rainbow trout oocyte during meiotic maturation and in vitro regulation by 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and cortisol." *Journal of Experimental Biology* 209(6): 1147-1156.
21. Nocillado, J. N., et al. (2007). "Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*." *General and Comparative Endocrinology* 150(2): 278-287.
22. Ohga, H., et al. (2013). "Identification, characterization, and expression profiles of two subtypes of kisspeptin receptors in a scombroid fish (*chub mackerel*)." *General and Comparative Endocrinology* 193: 130-140.
23. Richard, N., et al. (2009). "KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights." *Peptides* 30(1): 123-129.
24. Selvaraj, S., et al. (2013). "Peripheral administration of Kiss1 pentadecapeptide induces gonadal development in sexually immature adult scombroid fish." *Zoological Science* 30(6): 446-454.
25. Shabanipour, N. and B. Heidari (2017). "A histological study of the zona radiata during late oocyte developmental stages in the Caspian Sea mugilid, *Liza aurata* (Risso 1810)." *Journal of Morphological Sciences* 21(4): 0-0.

26. Shi, Y., et al. (2010). "Molecular identification of the Kiss2/Kiss1ra system and its potential function during 17alpha-methyltestosterone-induced sex reversal in the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*." *Biology of Reproduction* 83(1): 63-74.
27. Skorupskaite, K., et al. (2014). "The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease." *Human Reproduction Update* 20(4): 485-500.
28. Valipour, A., et al. (2020). "The effect of different exogenous kisspeptins on sex hormones and reproductive indices of the goldfish (*Carassius auratus*) broodstock." *Journal of Fish Biology*.
29. Valipour, A., et al. (2021). "Expression of reproductive-related genes and changes in oocyte maturation of goldfish broodstock (*Carassius auratus*) following injection of different exogenous kisspeptins." *Reproduction in Domestic Animals* 56(10): 1349-1357.
30. Wang, J., et al. (2011). "Effects of xenoestrogens on the expression of vitellogenin (vtg) and cytochrome P450 aromatase (cyp19a and b) genes in zebrafish (*Danio rerio*) larvae." *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 46(9): 960-967.
31. Wang, W., et al. (2020). "Effects of 11-Ketotestosterone on Development of the Previtellogenic Ovary in the Sterlet, *Acipenser ruthenus*." *Frontiers in Endocrinology* 11.

Investigation of the biological activity of goldfish kisspeptin after adding an acetyl group to Tyr1

Navid Omidian¹; Seyed Mohsen Asghari^{2*}; Behrooz Heidari^{1,3}; Abdolmajid Valipour¹; Hanieh Rabuti¹

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

2- Biochemistry and Biophysics Research Center, University of Tehran, Iran

3- Department of Marine Science, Caspian Sea Basin Research Center, University of Guilan, Rasht, Iran

ABSTRACT

In the present study, the goldfish kisspeptin peptide was synthesized using the solid phase synthesis method according to the nucleotide sequence of the goldfish (*Carassius auratus*) *kiss1* gene. Next, an acetyl group was added to the amino group of Tyr1 to increase the biological activity. The synthesized peptide (referred to as ACKiss1) was purified by RP-HPLC and its structure was confirmed using electrospray ionization (ESI) mass spectrometry. To determine the biological activity, ACKiss1, native Kiss1 and commercial GnRH hormone were injected to goldfish, some important parameters of the reproductive physiology were studied. Kiss1 and ACKiss1 were injected with a dosage of 100 µg/kg fish body weight and GnRH was injected with dosages of 100 and 200 µg/kg body weight. 6 hours after injection, blood was taken from the caudal vein and sex hormones were measured in plasma. 24 hours after injection, reproductive indices were measured in a series of fish. In another series of fish, 24 hours after injection, ovarian and brain tissues were separated for histological studies and expression of the reproductive-related genes (*cyp19b*, *gpr54a*, and *kiss1*). The results revealed that significant changes in biochemical parameters and gene expression were recorded in both brain tissue samples and ovarian tissue in ACKISS1 treatment. It was also found in ovarian histology that under the influence of kisspeptin and GnRH, the number of mature oocytes increased significantly.

KEYWORDS: Peptide design, Kisspeptin, Reproduction, Hormone

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 3 Oct. 2022

Accepted: 22 Nov. 2022

ePublished: 3 Mar. 2023

* Corresponding Author:

Email address: sm.asghari@ut.ac.ir

Tel: +98-21 66969257

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513