مجله علوم و فنون شیلات
دوره ۱۲شماره ۱، زمستان ۱۴۰۱، صفحات ۸۱ تا ۹۹

بررسی فعالیت زیستی کیس‌پپتین ماهی قرمز بعد از افزودن گروه استیل به باقیمانده تیروزین انتهای آمینی

نوید امیدیان[۱]، سید محسن اصغری[۲*]، بهروز حیدری[۱،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

نوع مقـاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۱۰

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۱/۱۲/۱۲

***نویسنده مسول:**
sm.asghari@ut.ac.ir

چکـــیده

در مطالعه حاضر، کیس‌پپتین-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 انتهای 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، کیس‌پپتین 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 هورمون های 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 تزریق بافت تخمدان و مغز برای مطالعات بافت‌شناسی و بیان ژن‌های (cyp19b، gpr54a و kiss1) جدا گردید. نتایج نشان داد که تغییرات قابل‌توجهی در پارامترهای بیوشیمیایی رخ داده است. همچنین، بیان ژن‌های kiss1، cyp19b و gpr54a در نمونه های 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 کیس‌پپتین و GnRH تعداد اووسیت‌های رسیده به‌صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرده است.

کـــلید واژه‌ها: طراحی پپتید، کیس‌پپتین، 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 می‌شد، ابتدا متاستین[۱] و سپس کیس‌پپتین[۲] (KISS1) نام گرفت که حروف SS در آن به معنی توالی سرکوبگر[۳] است [۱۶]. کیس‌پپتین‌ها 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. کیس‌پپتین‌ها را می‌توان یکی از این پیام‌رسان‌ها دانست که در بالادست نورون‌های تولیدکننده GnRH حضور دارند. کیس‌پپتین‌ها در این جایگاه نسبت به بازخورد ترشح هورمون‌های جنسی حساس هستند. پس می‌توان گفت که کیس‌پپتین‌ها به‌عنوان تنظیم‌کننده فرآیند تولیدمثل

[1] metastin
[2] kisspeptin
[3] suppressor sequence

و بلوغ، ترشح GnRH و گنادوتروپین‌ها را کنترل می‌کند [۱۲، ۲۷] نورون‌هایی که کیس‌پپتین را می‌سازند تقریباً در نزدیکی نورون‌های GnRH در هیپوتالاموس قرار دارند. ترشح این پپتیدها منجر به تحریک نورون‌های GnRH می‌شود. میزان ترشح کیس‌پپتین‌ها به محرک‌های داخلی ازجمله 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 نورون‌های سازنده‌ی کیس‌پپتین 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 کیس‌پپتین‌ها در هیپوتالاموس نقش اصلی را در کنترل ترشح هورمون‌هایی که باعث تحریک ترشح استروژن می‌شوند، دارند [۱۴].

مطالعات حاکی از آن هستند که ژن کیس۱ و ژن مربوط به گیرنده‌ی کیس‌پپتین (Gpr54) در غدد جنسی ماهیان نر بیان‌شده و هرسال نقش مهمی در رسیدگی جنسی و تولیدمثل آن‌ها دارد [۲۲]. مطالعات گزارش کردند که بیان ژن کیس۱ در تخمدان‌ها نشان داده شده و وجود گیرنده‌های کیس‌پپتین 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 کیس‌پپتین مربوط به ژن کیس۱ ماهی قرمز (Kiss1)، کیس‌پپتین ژن کیس۱ 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 کیس‌پپتین ۱۰ آمینواسیدی در ژن کیس۱ 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 ۰/۵ ± ۷۴/۵ گرم و میانگین طول ۰/۵ ± ۱۵/۵ سانتیمتر که ازنظر 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 ۰/۸ ± ۲۱/۵ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۱ ± ۸/۴ میلی گرم بر لیتر و pH = ۷/۴ بود و هیچ‌گونه دست‌کاری‌ای در شرایط فیزیکوشیمیایی 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. هرکدام از این گروه‌ها ۳ تکرار داشت که در هر تکرار ۱۰ قطعه ماهی بود. به‌طورکلی 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 میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شده و در سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ 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.

تخمک کشی از مولدین

مدت‌زمان لازم بین تزریق پپتیدها و تخمک کشی ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت بعد از تزریق برای مقایسه‌ی اثر انواع پپتیدها 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 به‌طوری‌که جهت فشار از سمت سر به سمت مخرج باشد تخمک‌ها در داخل سطل شسته‌ی خشک و تمیز ریخته شد. برای به دست آوردن میزان هماوری هر مولد، مقدار تخم‌های آن با ترازوهای دقیق اندازه‌گیری و شمارش شد.

اسپرم گیری و لقاح

بعدازاینکه 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 تشت‌ها به مدت ۵ دقیقه به‌صورت خشک تکان داده شد سپس به‌آرامی مقداری آب تمیز از دیواره‌ی تشت به تخم‌ها اضافه شد و تکان دادن کماکان ادامه داشت. چند ساعت بعد که تخم‌ها به‌صورت کامل آبگیری کردند در ویس گذاشته شدند.

محاسبه‌ی درصد لقاح

حدود ۲۴ ساعت بعد از لقاح تخم‌هایی که در داخل ویس‌ها بودند ازنظر اینکه لقاح کرده‌اند یا خیر قابل‌تشخیص 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.

۱۰۰× (تعداد کل تخم‌های لقاح یافته / تعداد تخم‌های لقاح یافته شمارش‌شده) = درصد لقاح

محاسبه‌ی درصد تفریخ

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 شمرده‌شده بود با استفاده از فرمول زیر درصد تفریخ به دست آمد.

۱۰۰× (تعداد کل تخم‌های داخل ویس / تعداد لارو داخل ویس) = درصد تفریخ

بافت شناسی

۲۴ ساعت پس از تزریق، بافت مغز و تخمدان نمونه‌ها جهت مطالعات بافت‌شناسی تخمدان و اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های مرتبط با تولیدمثل (*kiss1*، *gpr54a* و *cyp19b*) 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 ائوزین انجام شدند [۲۵].

بیان ژن

به‌منظور استخراج RNA از روش (TRIzol) استفاده شد که پروتکل آن شامل ۱۰۰mg–۵۰ از نمونه بافت کبد توسط نیتروژن مایع کوبیده شد و به نمونه ۱ میلی‌لیتر ترایزول 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)۱۲۰۰۰قرار داده شد. بعد از ایجاد سه فاز، فاز رویی حاویRNA به‌آرامی جدا شد. از هر نمونه حدود ۳۰۰–۴۰۰ میکرو لیتر عصاره به میکروتیوب جدید منتقل شد.سپس ۵۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانول اضافه و به‌آرامی 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

سانتی‌گراد با دور (RCF)۱۲۰۰۰ در سانتریفیوژ قرار گرفت و سپس ایزوپروپانول از رسوب تشکیل‌شده جدا شد.سپس ۱۰۰۰ میکرو لیتر اتانول ۷۵٪ به رسوب اضافه و در سانترفیوز به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد 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 باقی‌مانده بپرد. سپس ۶۰ میکرولیتر آب DEPC اضافه شد و در بن ماری به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (تمام مراحل در زیر هود استریل انجام شد). در نهایت نمونه‌ها تا انجام آنالیز در فریزر۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

DNase

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

بر این اساس به ۱۶ میکرولیتر از RNA استخراج‌شده، ۲ میکرولیترDNase و ۲ میکرولیتر بافر DNase، اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۱ میکرولیتر،EDTA اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. درنهایت ۴ میکرولیتر از نمونه جداشده و به همراه مابقیRNA 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 به‌عنوان 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 موردنظر با استفاده از بانک‌های توالی ژن (www.NCBI.NIH.gov/GeneBank)، جستجو شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner، قطعه موردنظر انتخاب‌شده و ۲۲-۱۸ باز اولیه به‌عنوان پیشرو و معکوس اختصاصی برای ژن HSP70 طراحی شد. سپس به‌منظور ایجاد اطمینان از طراحی اختصاصی پرایمر، توالی به‌دست‌آمده در سایتNCBI، بلاست شد. پرایمرها توسط شرکت Sinaclon سنتز شد (جدول ۱).

جدول ۱- توالی پرایمر ژن‌های تولیدمثلی

Gene	Forward	Reverse
kiss1	TGAGTGCAAATCCTCACCGAA	CAAGATTTAGCCCGACCCAG
gpr54a	TTCCATCAAAGACCCACGAGA	TTCCACAGAGGCTTGTCCCA
cyp19b	GCCAGCAACTACTACAACAGC	CCCTGTTCATGCATTCCGAT
β-actin	GACTTCGAGCAGGAGATGGG	CCGCAAGATTCCATACCCAGG

آنالیز آماری

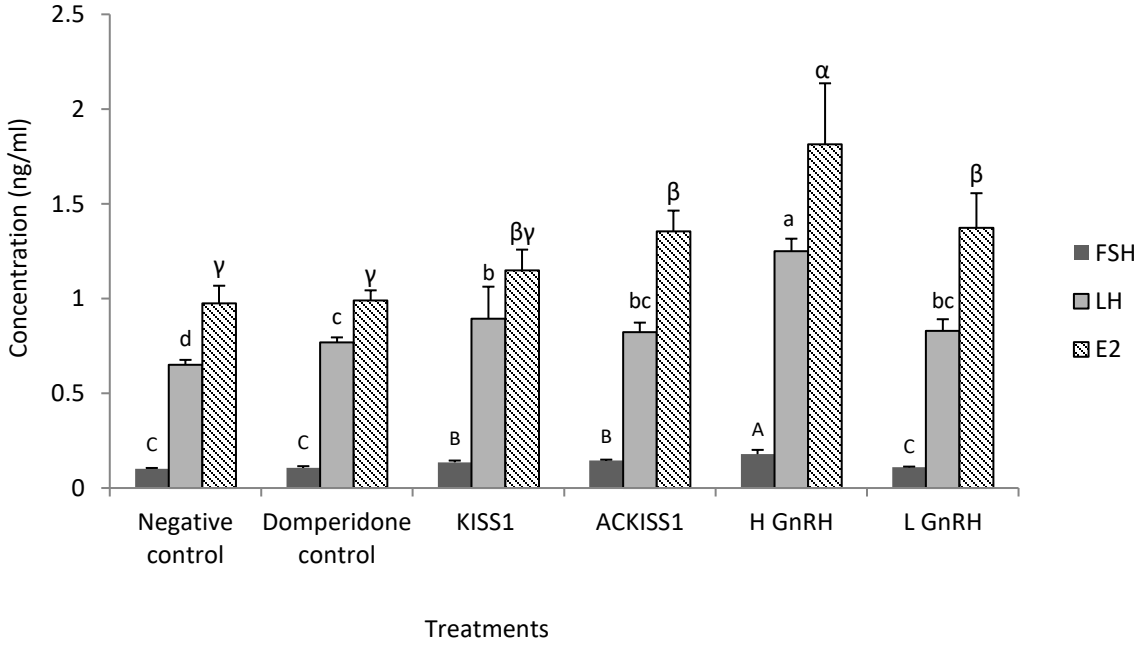
از نرم‌افزار SPSS برای تجزیه‌وتحلیل آماری استفاده شد. همچنین از آزمون کولموگروف–اسمیرنوف برای سنجش نرمال بودن داده‌ها استفاده شد. تعیین سطح معنی‌داری با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون Duncan در سطح معناداری ۵ درصد ($p < ۰/۰۵$) استفاده شد.

نتایج

هورمون FSH، LH و E2

غلظت هورمون FSH و LH در گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدها بودند افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل نشان دادند ($p<۰/۰۵$) (شکل ۱). همچنین غلظت این هورمون‌ها در گروه H GnRH افزایش معنی‌داری نسبت سایر گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدها بودند داشت. گروه L GnRH افزایش معنی‌داری 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 معنی‌داری در غلظت هورمون E2 (۱۷ بتا استرادیول) مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) (شکل ۱). در گروه KISS1 تغییر معنی‌داری در غلظت این هورمون نسبت به نمونه‌های کنترل مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). 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 معنی‌دار در گروه‌های مختلف می‌باشد.

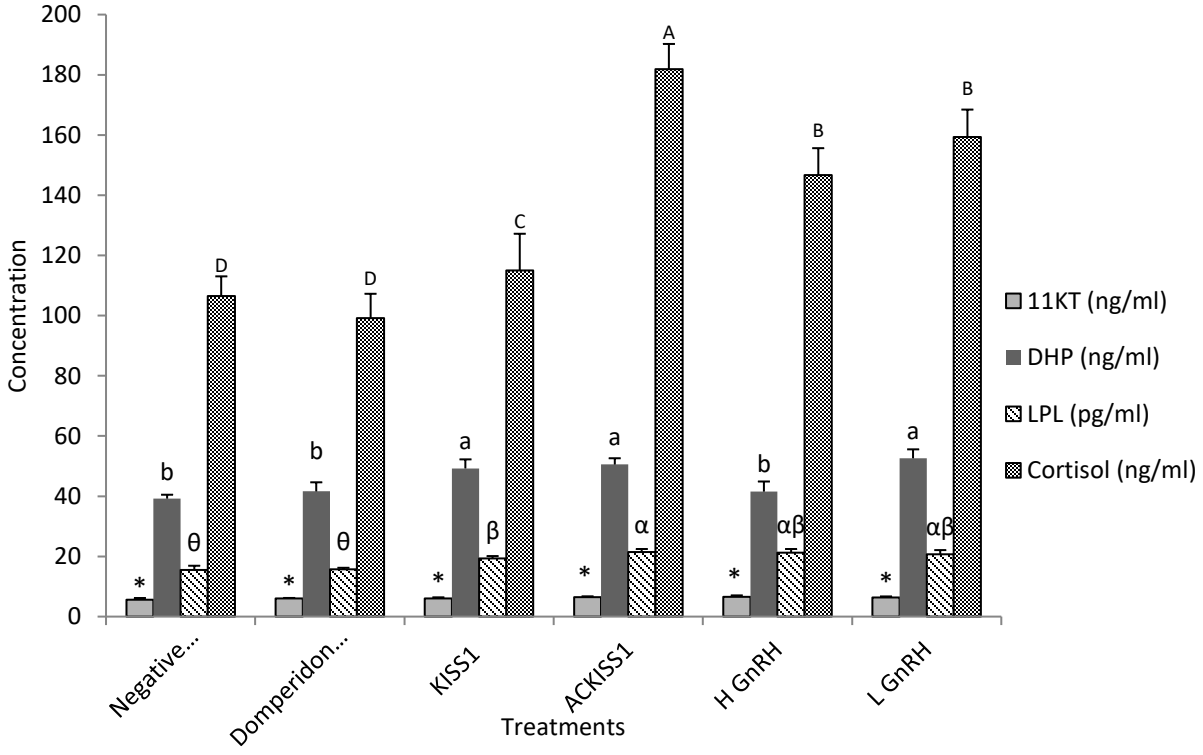
هورمون DHP، 11KT، کورتیزول و آنزیم LPL

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<۰/۰۵) (شکل ۲). نمونه‌هایی که تحت تأثیر غلظت بالای هورمون GnRH قرار داشتند تغییر معنی‌داری در غلظت هورمون DHP نشان ندادند (p>۰/۰۵).

در هیچ‌یک از گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بودند تغییر معنی‌داری در غلظت هورمون 11KT (۱۱ کتوتستسترون) نسبت به گروه‌های کنترل یا نسبت به یکدیگر مشاهده نشد (p<۰/۰۵).

غلظت هورمون کورتیزول در نمونه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بودند افزایش معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵) (شکل ۲). غلظت این هورمون در گروه ACKISS1 از گروه‌هایی که تحت تأثیر غلظت‌های بالا و پایین هورمون GnRH قرار داشتند بالاتر بود (p<۰/۰۵). غلظت این هورمون در گروه KISS1 از گروه‌های کنترل بالاتر ولی از سایر گروه‌ها پایین‌تر بود (p<۰/۰۵).

غلظت آنزیم LPL (لیپوپروتئین لیپاز) در گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بودند افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل داشت (p<۰/۰۵) (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<۰/۰۵).



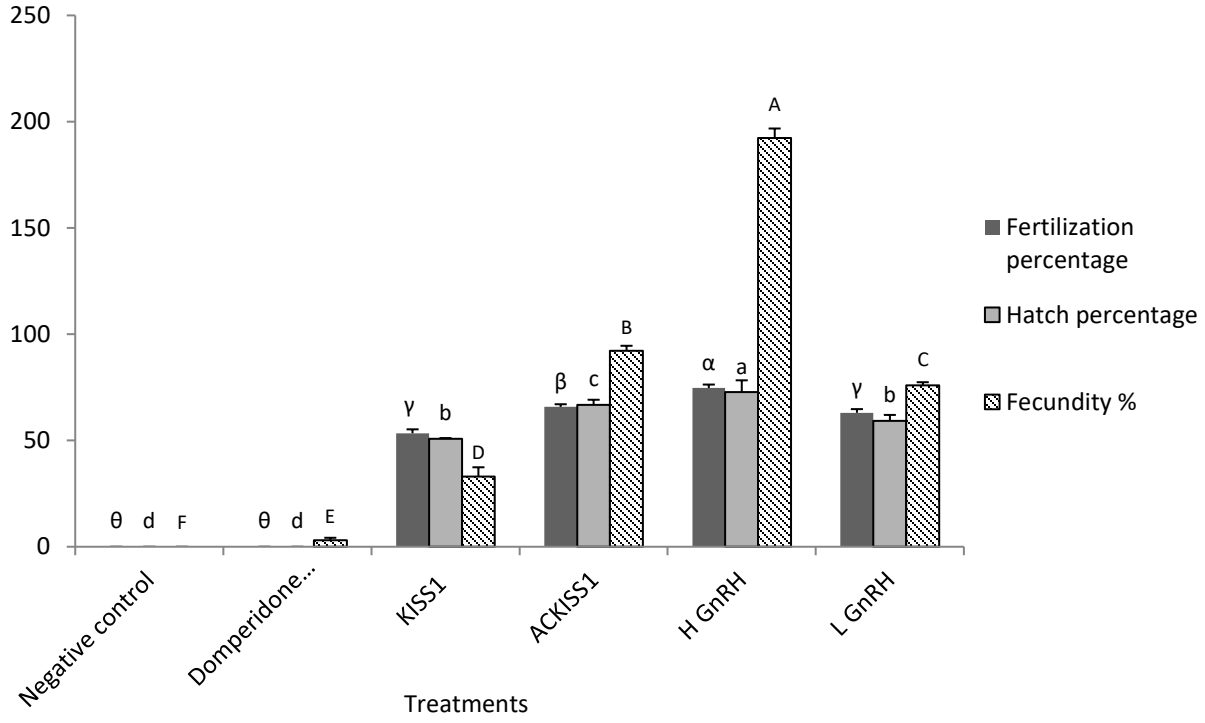
شکل ۲- تغییرات غلظت هورمون DHP، 11KT، کورتیزول و آنزیم LPL در پلاسمای مولدین ماهی قرمز که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف قرار داشتند. حروف متفاوت بالای نمودار نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در گروه‌های مختلف می‌باشد.

شاخص‌های تولیدمثلی

میزان هماوری نسبی در گروه‌های مختلف نسبت به گروه‌های کنترل اختلاف معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵) (شکل ۳). بیشترین میزان هماوری 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. درواقع گروه کنترل منفی ۲۴ ساعت بعد از تزریق تخم‌ریزی نکرد و چند روز بعد تخم‌ریزی طبیعی خود با مقدار کم را انجام داد. میزان هماوری در گروه ACKISS1 به‌صورت چشمگیری از گروه L GnRH و گروه KISS1 بالاتر بود (p<۰/۰۵).

بیشترین میزان لقاح نیز مانند هماوری در گروهی که تحت تأثیر غلظت بالای هورمون GnRH قرار داشتند مشاهده شد و در گروه‌های کنترل هیچ‌گونه لقاحی مشاهده نشد (p<۰/۰۵) (شکل ۳). گروه ACKISS1 نیز نسبت به گروه L GnRH و KISS1 افزایش معنی‌داری در میزان لقاح نشان داد (p<۰/۰۵).

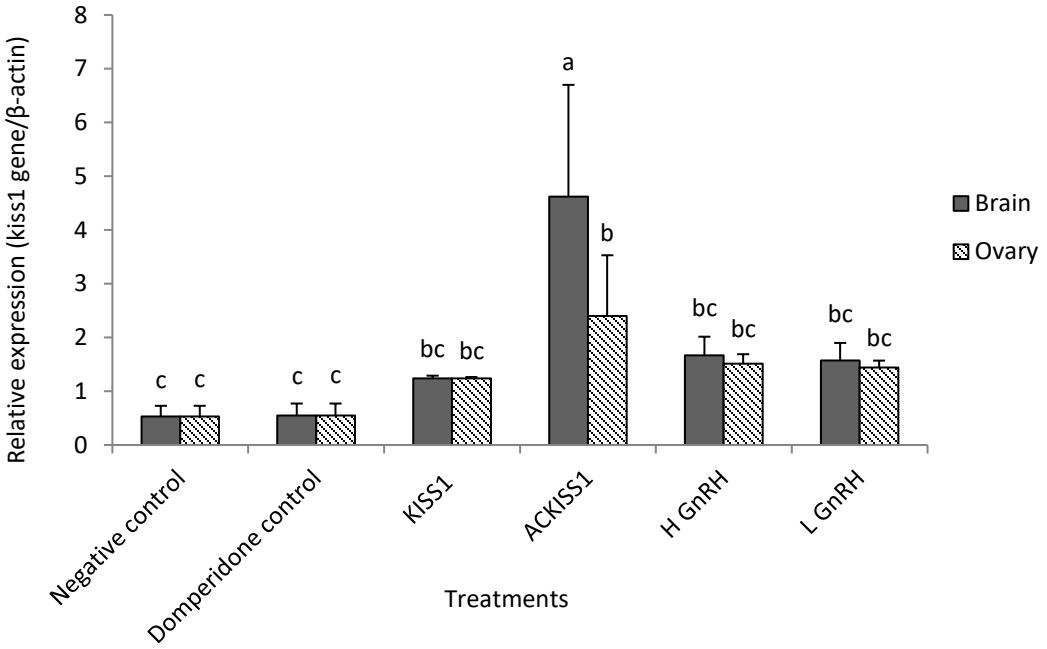
در گروه کنترل منفی چون هیچ تخم‌ریزی وجود نداشت به دنبال آن درصد لقاح و تفریخ در آن صفر شد اما در گروه کنترل دامپریدون چون تخمک‌ها نتوانستند با موفقیت لقاح کنند به دنبال آن درصد تفریخ صفر شد. میزان تفریخ در گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بودند اختلاف معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵) (شکل ۳). بیشترین میزان تفریخ به ترتیب در گروه H GnRH و ACKISS1 مشاهده شد. میزان تفریخ در گروه ACKISS1 از گروه‌های L GnRH و KISS1 بالاتر بود (p<۰/۰۵).



شکل ۳- اختلاف میزان هماوری نسبی، درصد لقاح و تفریخ 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

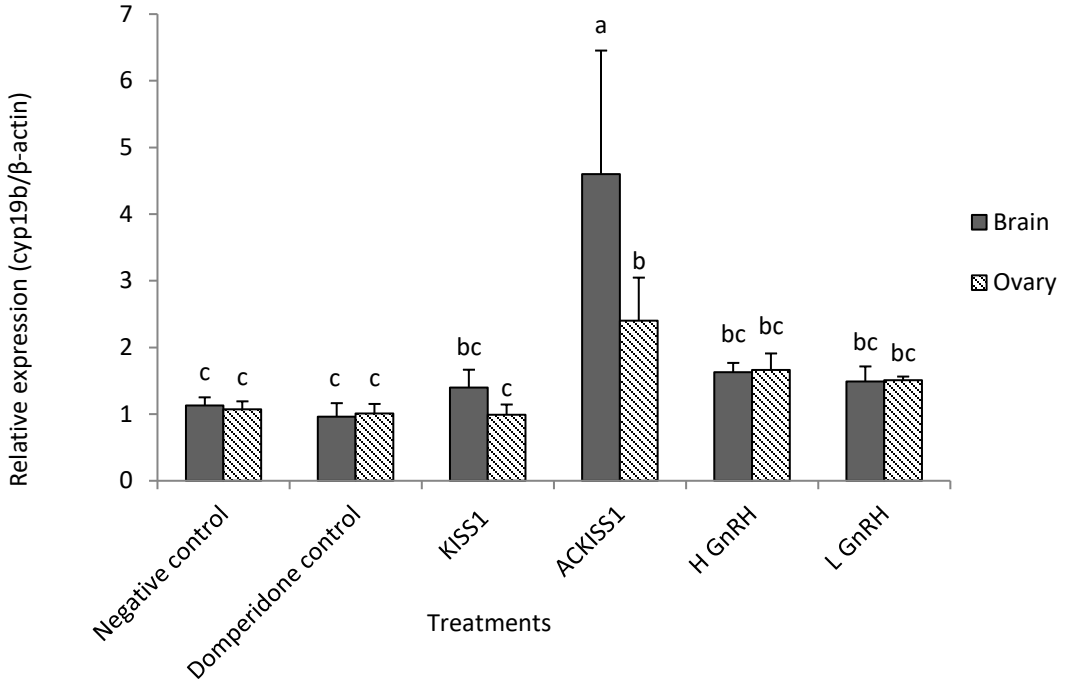
بیان نسبی ژن *kiss1* در گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدها بودند نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش معنی‌داری نشان ندادند به‌جز در گروهی که تحت تأثیر ACKiss1 بودند (p<۰/۰۵) (شکل ۴). بیان نسبی این ژن در گروه‌هایی که با GnRH تیمار شده بودند تغییر معنی‌داری با گروهی که تحت تأثیر پپتید Kiss1 بود نشان نداد. بیشترین 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

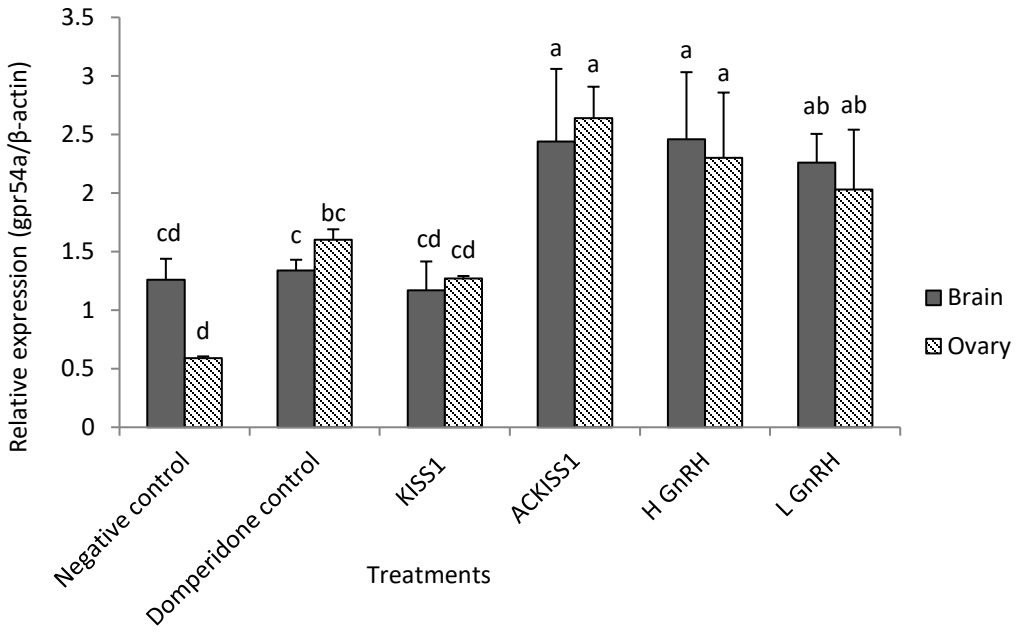
بیان نسبی ژن *cyp19b* در بافت تخمدان و مغز گروه‌هایی که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بودند افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل نشان نداد به‌جز در گروه ACKISS1 (p<۰/۰۵) (شکل ۵)؛ مانند ژن *kiss1* بیشترین میزان بیان این ژن نیز هم در بافت تخمدان و هم در بافت مغز در گروه ACKISS1 ثبت شد.



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 نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد.

بیان نسبی ژن *gpr54a* در بافت تخمدان و مغز

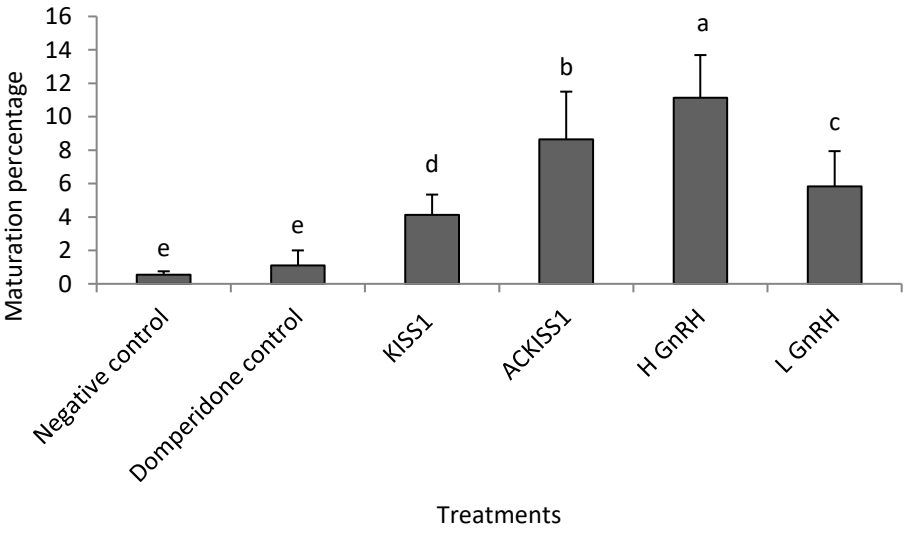
بیان نسبی ژن *gpr54a* در گروه‌هایی که تحت تأثیر GnRH و ACKiss1 بوده‌اند افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل و گروه KISS1 نشان داد (p<۰/۰۵) (شکل ۶). بیشترین میزان بیان این ژن به ترتیب در گروه H GnRH و ACKISS1 ثبت شد و کمترین میزان بیان آن در گروه KISS1 ثبت شد. گروه KISS1 نتوانستند افزایش معنی‌داری 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<۰/۰۵).



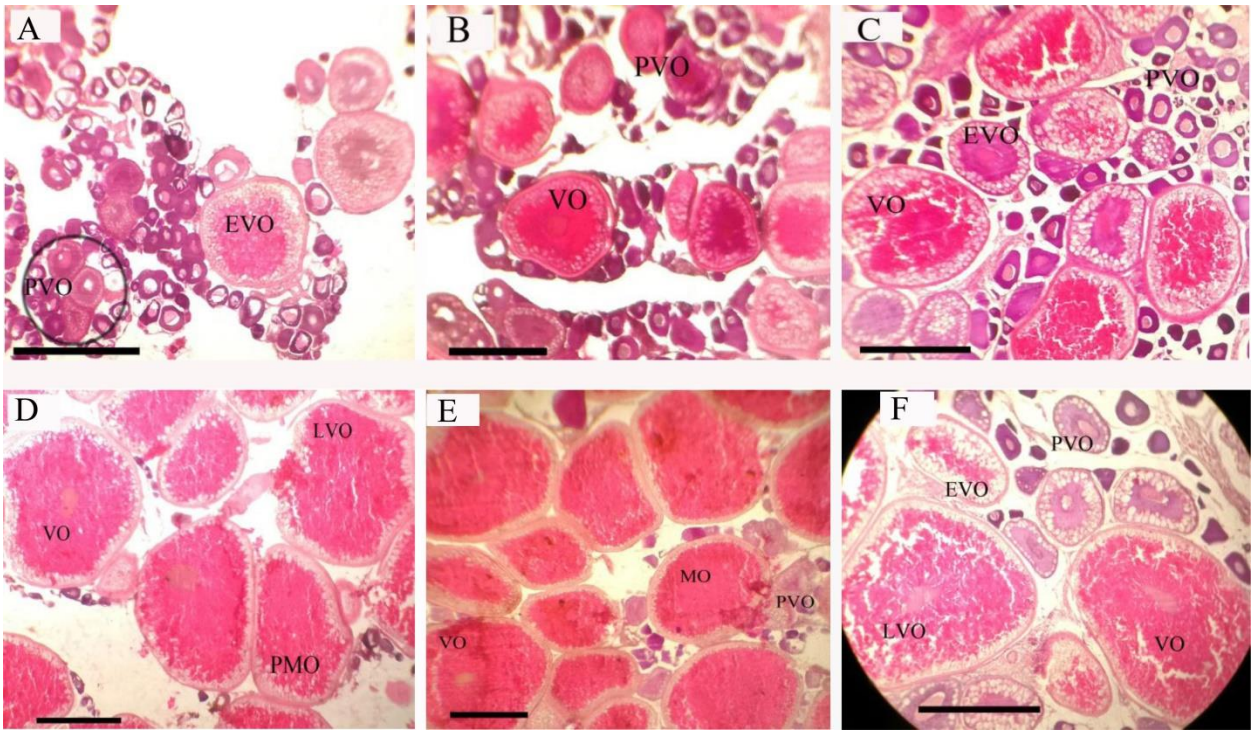
شکل ۶- تغییرات بیان نسبی ژن *gpr54a* در بافت تخمدان و مغز مولدین ماده ماهی قرمز که تحت تأثیر پپتیدهای مختلف بودند. حروف متفاوت بالای نمودار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد.

رسیدگی اووسیت‌ها

درصد رسیدگی اووسیت‌ها در گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$) (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 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 آمینواسیدی به نام Kiss1 مطابق با توالی آمینواسیدی کیس‌پپتین۱ ماهی قرمز طراحی و سنتز شود. این کار با توجه به قسمتی از توالی نوکلئوتیدی ژن *kiss1* ماهی قرمز که کد کننده کیس‌پپتین ۱۰ است انجام گرفت. در مرحله‌ی بعد یک مدیفیکیشن روی این پپتید Kiss1 صورت گرفت که در آن یک گروه استیل به گروه آمینی آمینواسید تیروزین شماره یک این پپتید متصل شد. در مرحله‌ی بعد اثری که این مدیفیکیشن روی فعالیت زیستی این پپتید می‌گذارد با تزریق این پپتیدها به عضله‌ی یک مدل آزمایشگاهی موردمطالعه قرار گرفت.

در مطالعات مختلف نشان داده شده است که ترشح گنادوتروپین‌ها در گونه‌های مختلف بسته به نوع کیس‌پپتین و نوع گونه متفاوت است و کیس‌پپتین‌های مختلف تأثیر متفاوتی در گونه‌های مختلف دارند و حتی تأثیر یک کیس‌پپتین روی انواع گنادوتروپین نیز متفاوت است [۸ ، ۱۵، ۲۶]. در مطالعه‌ی حاضر Kiss1 منجر به افزایش ترشح هورمون FSH و LH نسبت به نمونه‌های کنترل و گروه GnRH هم غلظت خود (۱۰۰ میکروگرم) شده است ولی به نظر می‌رسد 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 به‌طورکلی نسبت به نمونه‌های کنترل منجر به افزایش غلظت این هورمون‌ها شده است. این افزایش غلظت گنادوتروپین‌ها در تیمارهای کیس‌پپتین نسبت به نمونه‌های کنترل می‌تواند به دلیل اثر غیرمستقیم کیس‌پپتین‌ها روی هیپوفیز پیشین از طریق هورمون GnRH باشد گرچه بعضی از مطالعات معتقد هستند که کیس‌پپتین می‌تواند به صورت مستقیم روی هیپوفیز پیشین اثر گذاشته و منجر به افزایش ترشح گنادوتروپین‌ها شود [۲۳].

مطالعات نشان دادند که تزریق کیس‌پپتین منجر به بالا رفتن غلظت هورمون 11KT در ماهیان استخوانی می‌گردد. در یک آزمایش ۲ نوع کیس‌پپتین متفاوت به جنس ماده مولدین scombroid fish تزریق شد و افزایش معنی‌داری در غلظت هورمون‌های 11KT و E2 نشان داده است [۲۴]. در این مطالعه نیز انتظار می‌رفت که همه گروه‌ها در مقایسه با نمونه‌های کنترل مثبت و کنترل دامپریدون منجر به افزایش سطوح هورمون‌های استروئیدی جنسی در خون شوند. با توجه به شکل ۲ هیچ‌کدام از پپتیدها منجر به افزایش معنی‌داری 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 نبودن این هورمون در این گروه‌ها نشان‌دهنده عبور مولدین از مرحله‌ی پیش از زرده سازی است [۳۱].

پپتید ACKiss1 هم نسبت به نمونه‌های کنترل و هم نسبت به پپتید Kiss1 افزایش بیشتری در غلظت هورمون E2 را سبب شده است. می‌توان این‌گونه برداشت کرد که استلیه کردن انتهای کیس‌پپتین منجر به افزایش اثر این پپتید روی هورمون E2 شده است. در مقایسه‌ی اثر کیس‌پپتین‌ها با گروه‌های GnRH روی این هورمون، پپتید Kiss1 نسبت به GnRH ضعیف‌تر عمل کرده است ولی پپتید ACKiss1 در غلظت‌های برابر اثری مشابه با GnRH روی ترشح این هورمون دارد. در غلظت‌های بالاتر GnRH این پپتید توانسته است اثر تحریکی بیشتر از کیس‌پپتین روی ترشح هورمون E2 داشته باشد.

در این مطالعه همچنین انتظار می‌رفت که پپتیدهای مختلف اثر تحریکی مشابهی روی هورمون DHP داشته باشند. شکل ۲ در نتایج نشان می‌دهد که پپتیدهای مختلف، هم کیس‌پپتین‌ها و هم GnRH باعث افزایش غلظت این هورمون در پلاسما شده‌اند. در مقایسه‌ی کیس‌پپتین‌ها با GnRH این‌گونه می‌توان گفت که در غلظت برابر این ۲ نوع پپتید اثر تقریباً مشابهی روی ترشح هورمون DHP دارند. در مورد انواع کیس‌پپتین، استیله کردن انتهای پپتید Kiss1 نتوانست اثر این پپتید روی هورمون DHP را افزایش دهد. همان‌طور که در شکل ۲ آورده شده است هر دو نوع کیس‌پپتین تقریباً اثر مشابهی روی ترشح هورمون DHP داشته‌اند.

یک مطالعه نشان داده است که کورتیزول برای آب‌گیری اووسیت‌ها (اووسیت‌های ماهی‌ها قبل از تخم‌ریزی نیاز به آبگیری و حجیم شدن دارند) در ماهی‌ها ضروری است و افزایش کورتیزول به بهبود این فرایند کمک می‌کند [۲۰]. داده‌های این مطالعه نشان داده‌اند که با استیله کردن پپتید

Kiss1 باعث افزایش قابل‌توجه 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 کیس‌پپتین 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 کیس‌پپتین‌ها 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 کیس‌پپتین 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 کیس‌پپتین برای رشد و بلوغ تخمدان و اووسیت‌ها ضروری است و نشان داده شده که تیمار مولدین با کیس‌پپتین 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 درنهایت تأثیر خود را روی گامت‌ها اعمال کرده است. با استیله کردن کیس‌پپتین و تولید ACKiss1 تأثیر این پپتید روی رسیدگی اووسیت‌ها بیش‌ازپیش شده است.

به دنبال تأثیراتی که کیس‌پپتین‌ها 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 هماوری داشته است. پپتید ACKiss1 نیز با موفقیت توانسته است میزان هماوری و تخم‌ریزی را در این مولدین به صورت معنی‌داری بالا ببرد.

در مورد بیان ژن‌های دخیل در تولیدمثل، بیان این ژن‌ها در نورون‌های 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 موردمطالعه 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 درنهایت 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 ناحیه‌ی 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 نورون‌های kiss1 در ناحیه‌ی 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 کیس‌پپتین۱ شده است.

نتیجه گیری

نتایج تجزیه و تحلیل هورمون، بافت شناسی، 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 می شود. این پپتید را می توان پس از تحقیقات بیشتر به عنوان یکی از کاندیدهای جایگزین برای هورمون های 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 اخالقی 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. Dhillo, 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, 20β-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.

Journal of Fisheries Science and Technology
Volume12, Issue 1, Winter 2022
Pages: 81-99

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

Navid Omidian[1]; Seyed Mohsen Asghari[2*]; Behrooz Heidari[1,3]; Abdolmajid Valipour[1]; Hanieh Rabuti[1]

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

A B S T R A C T

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