

## موقعیت یابی ایمنوهیستوشیمیایی گرلین در بافت بیضه خروس

وریا غفوری<sup>۱</sup>، برهان شکراللهی<sup>۲\*</sup>، علی اکبر امیری<sup>۳</sup>

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

پذیرش: ۴ خردادماه ۹۸

دریافت: ۱۷ مهرماه ۹۷

### چکیده

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

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

### مقدمه

هورمون‌های مختلف و تنظیم تکثیر سلولی می‌گردد (۸)،  
۱۱ و ۲۲).

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

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



نمونه برداری بافت بیضه از خروس‌های کشتار شده نژاد رأس ۳۰۸ در کشتارگاه طیور سنندج انجام گرفت. نمونه‌های تهیه شده شامل قسمت‌های مرکزی و حاشیه‌ای بافت بیضه به ابعاد  $1 \times 5 \times 5$  سانتی‌متر بود (از هر قسمت ۳ نمونه) و نمونه‌ها بعد از قرار گرفتن در یونیکاست‌های پلاستیکی به مدت ۲۴ ساعت در محلول فیکساتیو فرمالین ۱۰٪ قرار گرفتند. پس از مراحل آبگیری (قرار دادن اسلایدها در الکل‌های با درجات مختلف، الکل مطلق، ۹۵، ۸۰، ۷۰ و ۵۰ درجه و در هر کدام به مدت سه دقیقه قرار گرفت)، شفاف‌سازی، آغشته‌سازی با پارافین، قالب‌گیری بلوک‌های پارافینی تهیه شد و مقاطع بافتی به ضخامت ۴-۵ میکرون با دستگاه میکروتوم تهیه و روی لام‌های آغشته شده به چسب سیتولوژی تثبیت شدند.

در انجام ایمنوهیستوشیمیایی ابتدا مقاطع بافتی پارافینی در گرم‌خانه ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شدند. لام‌ها با زایلین پارافین‌زدایی و با آب جاری شست و شو داده شدند و سپس با الکل اتیلیک با درجات مختلف آبدهی شده و دوباره با آب جاری به مدت ۲ دقیقه و سپس با محلول PBS به مدت ۵ دقیقه شست و شو داده شدند. برای بازیابی آنتی‌ژن ظرف حاوی بافر سیترات (pH=6, 10 nM) به مدت ۵ دقیقه در بن ماری در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس برای خنک شدن، لام‌ها در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه نگاه‌داری شدند. سرانجام در PBS به مدت ۵ دقیقه شست‌وشو داده شدند. برای غیر فعال شدن فعالیت پروکسیداز اندوژنوسی، لام‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با Peroxidase Block در محیط تاریک مواجهه شده و به مدت ۵ دقیقه در PBS شست‌وشو داده شدند؛ سپس برای کاهش پیوندهای غیر ویژه به مدت ۱۰ دقیقه اسلایدها در Protein Block خوابانده شدند. در مرحله بعد لام‌ها با آنتی‌بادی اولیه (Cat No: ab57222, Abcam) (رقیق شده به نسبت ۱ به ۵۰۰ در بافر PBS) در اتاق مرطوب در دمای ۴ درجه سانتی-گراد به مدت یک شبانه روز خوابانده شدند و سپس در بافر PBS برای ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شست‌وشو داده شدند؛ سپس اسلایدها با Post Primary Block جهت افزایش نفوذ معرف‌های بعدی به مدت ۳۰ دقیقه

اوبدات حضور دارد (۷). ترشح پایه گرلین در بافت اندومتریال در اوایل آبستنی در مقایسه با فاز فولیکولی و دیگر مراحل آبستنی بیشتر است (۲۰)، همچنین گرلین ترشح LH را مهار می‌کند و پاسخ به GnRH را در شرایط آزمایشگاهی کاهش می‌دهد، اما بر ترشح FSH تأثیری ندارد. یکی از نقش‌های تولیدمثلی گرلین، اثر آن بر گنادهای جنس نر است (۲۵). گرلین به‌طور قابل توجهی قادر به مهار ترشح تستوسترون است (۴). اثر مهاری گرلین روی ترشح تستوسترون با کاهش قابل توجه چندین فاکتور کلیدی در مسیر سنتز استروئید از قبیل پروتئین حاد تنظیم‌کننده استروئید (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) و آنزیم‌های شکننده زنجیره جانبی P450، ۱۷β-هیدروکسیل استروئید هیدروژناز و نوع سوم ۱۷β HSD مربوط است (۴). علاوه بر اثرات استروژنیک، گرلین ممکن است به‌طور مستقیم اعمال لوله‌های اسپرم‌ساز را تنظیم کند (۴).

گرلین در سلول‌های لایدیگ، لوله‌های اسپرم‌ساز و سلول‌های سرتولی بیضه انسان، گاو، گوسفند و بز نیز شناسایی شده است (۵، ۱۶، ۱۸ و ۱۹). در مطالعه‌ای نشان داده شد که تعداد سلول‌های لایدیگی که واکنش ایمنی گرلین را نشان داده بودند نسبت به تعداد کل سلول‌های لایدیگ در افرادی که غلظت تستوسترون کمتری داشتند، بیشتر بود (۱۸). در بیضه موش واکنش ایمنی گرلین در سلول‌های لایدیگ موقعیت‌یابی شده بود، اما گیرنده گرلین (GHS-RA1) در سلول‌های لایدیگ و سرتولی شناسایی شده بود (۱۲). بیان گیرنده گرلین در مجاری اسپرم‌ساز نشان می‌دهد که اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز ممکن است بافت هدف گرلین باشد و این هورمون به‌طور مستقیم می‌تواند عمل کرد لوله‌های اسپرم‌ساز را تنظیم کند (۱۳).

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

## مواد و روش کار



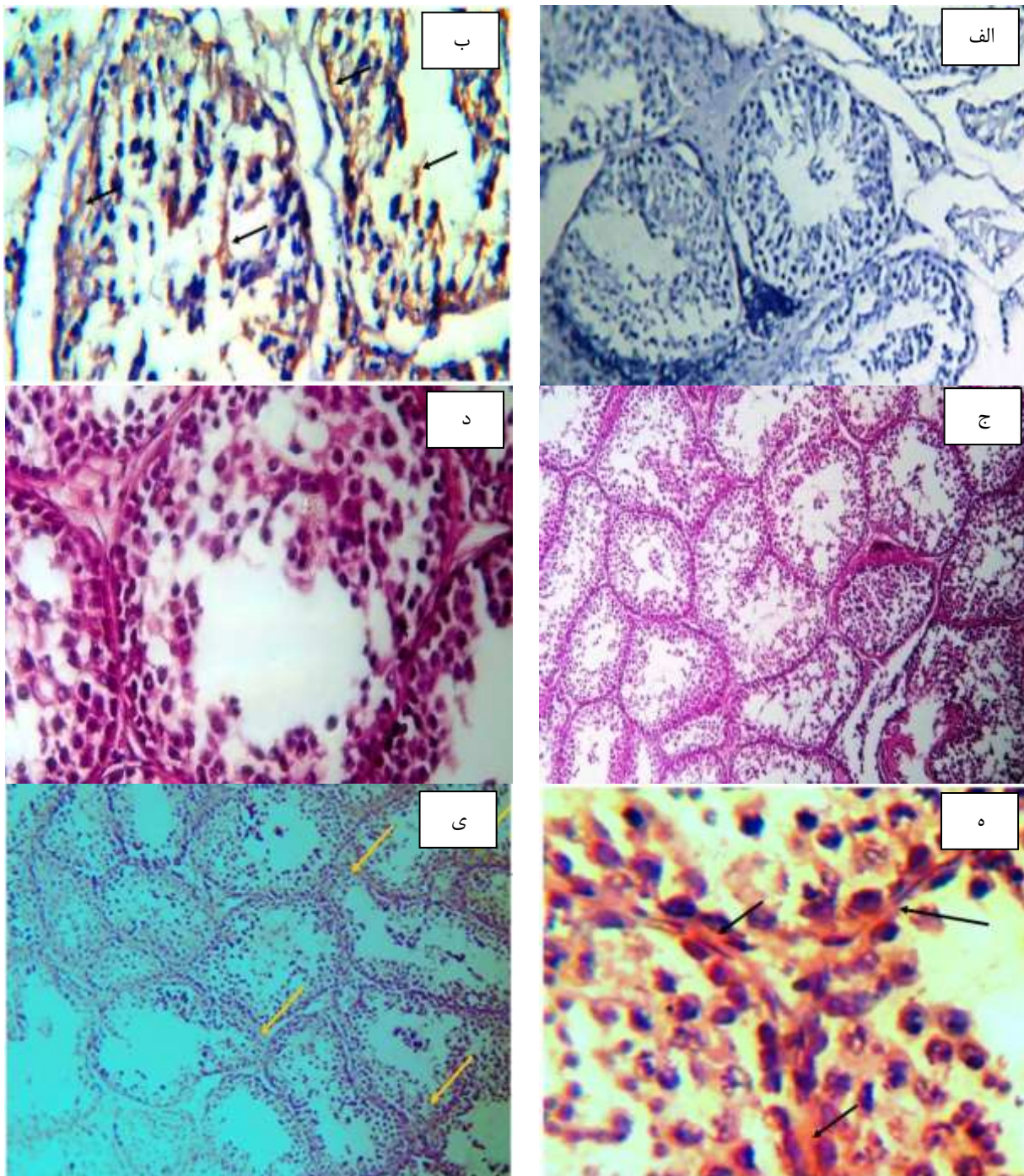
واقعی و امکان اتصال آنتی بادی اولیه به جایگاه‌های غیر اختصاصی وجود داشت، قرار دادن یک نمونه کنترل منفی الزامی بود. با توجه به آن که در اکثر مقالات برای کنترل منفی از سرم حیوانات مختلف استفاده شده بود در این مطالعه از سرم خرگوشی به جای آنتی بادی اولیه برای کنترل منفی استفاده شد. بدین منظور ابتدا از یک خرگوش خون‌گیری به عمل آمد، سپس نمونه‌ی خون برای جداسازی سرم سانتریفیوژ گردید. از سرم خرگوشی به عنوان آنتی بادی اولیه استفاده شد. سرم تهیه شده غنی از آنتی بادی‌های مختلف است. این آنتی بادی‌ها با آنتی بادی علیه گرلین که آن هم در موش تهیه شده بود، به لحاظ بازوی Fc، مشترک و یکسان هستند؛ لذا آنتی بادی ثانویه توانایی اتصال به هر دو آنتی بادی مذکور را دارد. در صورت ظهور رنگ قهوه‌ای یا واکنش مثبت در هر دو مقطع فوق، نشان از بروز واکنش‌های آنتی بادی اولیه و آنتی بادی‌های موجود در سرم با جایگاه‌های غیراختصاصی در مقاطع بافتی است. لازمه اتصال آنتی بادی ثانویه به آنتی بادی اولیه و آنتی بادی‌های موجود در سرم، تثبیت این آنتی بادی‌ها در مقاطع بافتی است. آنتی بادی‌های اولیه بسیار اختصاصی عمل می‌کنند و فقط آن‌هایی که بافت می‌چسبند که Fab آنتی ژن اختصاصی آن در بافت حضور داشته باشد. در مقطع بافتی مورد آزمایش که گرلین وجود دارد، آنتی بادی اختصاصی آن متصل می‌شود. در حالی که به دلیل عدم حضور آنتی ژن‌های اختصاصی آنتی بادی‌های سرم در مقاطع بافتی توانایی تثبیت شدن را نداشته و در زمان شست و شوی لام‌ها تمامی آن‌ها از روی لام شسته شده و دیگر آنتی بادی وجود ندارد تا با آنتی بادی ثانویه واکنش دهد و رنگ قهوه‌ای ظاهر شود؛ در حالی که مقاطع بافتی خوابانده شده با آنتی بادی اولیه به دلیل وجود آنتی ژن اختصاصی (گرلین) در بافت، پس از شست و شو همچنان به بافت متصل باقی مانده و با اضافه کردن آنتی بادی ثانویه واکنش مثبت مشاهده می‌شود. نتایج کنترل منفی در این آزمایش نشان داد که واکنش ایمونوپروکسیداز انجام نگرفته است (شکل ۱، الف).

خوابانده شدند. در گام بعدی لام‌ها با آنتی بادی ثانویه (آنتی بادی پلی کلونال ضد IgG Cat No: ab7083, Abcam) کونژوگه شده با HRP رقیق شده در بافر PBS به نسبت ۱ به ۳۰۰، به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه خوابانده شدند و به مدت ۱۰ دقیقه شست و شو داده شده و سپس اسلایدها با NovoLink™ Polymer که برای شناسایی ایمونوگلوبولین‌های موشی و خرگوشی استفاده می‌شود (این پلی مر هر نوع آنتی بادی اولیه باند شده با بافت را تشخیص می‌دهد)، خوابانده شدند (مدت ۳۰ دقیقه)؛ سپس اسلایدها در PBS دو بار و هر بار ۵ دقیقه شست و شو داده شدند، سرانجام برای نمایان کردن واکنش آنتی ژن و آنتی بادی از محلول سوبسترای دی‌آمینوبنزیدین (DAB) در H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> به مدت ۶-۴ دقیقه استفاده شد. لام‌ها در آب جاری شست و شو داده شدند. از محلول رنگ‌آمیزی زمینه هماتوکسیلین استفاده شد، سپس با قرار دادن یک قطره چسپ سیتولوژی روی لام و گذاشتن لامل، عمل مونته کردن انجام گردید و برای بررسی اسلایدها از میکروسکوپ نوری استفاده شد. با بررسی نمونه‌های تهیه شده ظهور رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره در مقاطع بافتی نشان از واکنش ایمونوپروکسیداز در نمونه‌های بافتی تهیه شده، بود (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸ و ۱۹).

## نتایج

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که آنتی ژن گرلین در سلول‌های لایدیگ و سلول‌های سرتولی خروس قابل ردیابی و شناسایی است. واکنش ایمونوپروکسیداز در سیتوپلاسم سلول‌های لایدیگ و سرتولی مشاهده شد (شکل ۱، ه و ی). در شکل‌های ج و د مقطع عرضی بافت بیضه خروس رنگ‌آمیزی شده ائوزین-هماتوکسیلین مشاهده می‌گردد. براساس گزارش قبلی Miller و همکاران که وجود گرلین را در بافت بیضه گوسفند تأیید کرده بودند (۱۷)، مقطع بافتی بیضه گوسفند نیز به عنوان کنترل مثبت به منظور تأیید صحت آزمایش استفاده شد. در این آزمایش، مثبت بودن واکنش ایمونوپروکسیداز در بیضه گوسفند به عنوان کنترل مثبت تأیید شد (شکل ۱، ب). با توجه به آن که احتمال بروز واکنش کاذب و غیر





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

## بحث

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

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

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

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که گرلین در سلول‌های لایدیگ و سرتولی بیضه خروس بیان می‌شود و به نظر می‌رسد که هر کدام از سلول‌ها می‌توانند به‌طور متفاوت در سنتز گرلین شرکت کنند. احتمالاً گرلین موجود در این سلول‌ها به‌طور موضعی یا به روش اتوکراین/پاراکراین عمل کرد این سلول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اگرچه وجود گرلین در بیضه گونه‌های مختلف (انسان، گوسفند و موش صحرایی) گزارش شده است (۳، ۵، ۱۷ و ۱۸)، اما حضور گرلین در دستگاه تناسلی خروس برای اولین بار گزارش می‌گردد. بیان گیرنده گرلین در مجاری اسپرم‌ساز نشان می‌دهد که اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز ممکن است بافت هدف گرلین باشد و به‌طور مستقیم عمل کرد لوله‌های اسپرم‌ساز را تنظیم می‌کند؛ بنابراین پذیرفتنی است که گرلین، اعمال مهم گنادی، تکثیر و آپوپتوز را در بیضه موش کنترل کند (۱۳). لوکازیک و همکاران (۱۵) بیان گیرنده در گلژی و آکروزوم‌های اسپرماتیدها و نواحی آکروزوم یا غشای سلولی سر اسپرم اپیدیدیمی را تأیید کردند. بیان گیرنده گرلین در اسپرم و نیز اثر گرلین روی جنبایی اسپرم و غلظت یون کلسیم داخل سلولی نشان می‌دهد که این اثرات بیولوژیکی گرلین ممکن است در شرایط داخل بدنی ایجاد شود. بریکان یاکان (۲۵) پیشنهاد کرد که گرلین به‌وسیله اعمال موضعی و یا سیستمیک به‌عنوان تنظیم‌کننده عمل کرد گنادی ممکن است در کنترل دقیق تعادل انرژی و تولیدمثل نقش داشته باشد. مشاهدات نشان می‌دهد که گرلین می‌تواند به روش اتوکراین و یا پاراکراین اسپرماتوژنز را تنظیم کند، همچنین شواهد نشان می‌دهند که گرلین قادر به تنظیم اعمال کلیدی بیضه‌ای، از جمله بیان ژن لوله اسپرم‌ساز، ترشح تستوسترون و تکثیر سلول لایدیگ است.

علاوه بر این، در موش صحرایی ثابت شده است که گرلینی که در سلول‌های لایدیگ و سرتولی موقعیت‌یابی شده است، خواص آنتی‌اکسیدانتی قابل‌توجهی دارد (۱۸). Ahmed و همکاران نشان دادند که در صورت تعادل منفی انرژی، گرلین می‌تواند یکی از هورمون‌های مهم مسئول برای سرکوب محور تولیدمثلی جنس نر در هر دو سطوح هورمونی و مولکولی باشد (۱)؛ بنابراین، گرلین





- 6- Caminos, J.E.; Tena-Sempere, M.; Gaytan, F.; Sanchez-Criado, J.E.; Barreiro, M.L.; Nogueiras, R.; Casanueva, F.F.; Aguilar, E.; Dieguez, C.; Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology*; 2003; 144:1594–602.
- 7- Deaver, S.E.; Hoyer, P.B.; Dial, S.M.; Field, M.E.; Collier, R.J.; Rhoads, M.L.; Localization of ghrelin and its receptor in the reproductive tract of Holstein heifers. *J Dairy Sci*; 2013; 96:150–7.
- 8- Fernandez-Fernandez, R.; Tena-Sempere, M.; Navarro, V.M.; Barreiro, M.L.; Castellano, J.M.; Aguilar, E. and Pinilla, L.; Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology* 2006; 82: 245–255.
- 9- Garcia, M.C. Lopez, M. Alvarez, C.V. Casanueva, F. Tena-Sempere, M. Dieguez, C.; Role of ghrelin in reproduction. *Reproduction* 2007; 133: 531–40.
- 10- Gaytan, F.; Barreiro, M.L.; Chopin, L.K.; Herington, A.C.; Morales, C.; Pinilla, L.; Casanueva, F.F.; Aguilar, E.; Dieguez, C.; Tena-Sempere, M.; Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*; 2003; 88:879–87.

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

#### منابع

- 1- Ahmed, H.H.; Wagdy, K.B.; Wafaa, G.S.; El-Sayed, M.E.; Emad, F.E. and Rehab, E.S.; Molecular Genetic and Biochemical Evaluation of Ghrelin Hormone as a Novel Signal of Gonadal Function in Adult Male Rats. *J Arab Societ Med Res*; 2010; 5(2): 89-100.
- 2- Angelidis, G.; Dafopoulos, K.; Messini, C.I.; Valotassiou, V.; Georgoulas, P. and Messinis, I.E.; Ghrelin: new insights into female reproductive system-associated disorders and pregnancy. *Reprod Sci*; 2012; 19(9): 903-10.
- 3- Barreiro, M.L.; Gaytan, F.; Caminos, J.E.; Pinilla, L.; Casanueva, F.F.; Aguilar, E.; Dieguez, C. and Tena-Sempere, M.; Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod*; 2002; 67(6): 1768-76.
- 4- Barreiro, M.L. and Tena-Sempere, M.; Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol Cell Endocrinol*; 2004; 226: 1–9.
- 5- Bayezidi-Azar, A. and Shokrollahi, B.; Immunohistochemical Localization of Ghrelin in Testicular Tissues of Holstein Bulls. *Iran J Applied Anim Sci*; 2016; 6(3): 551-555.

- 16- Mansori, K. and Shokrollahi, B.; Immunohistochemical localization of ghrelin in goat testicular tissue. *Vet J (pajouhesh-va-sazandegi)*; 2017; 30(2115): 185-193.
- 17- Miller, D.W.; Harrison, J.L.; Brown, Y.A.; Doyle, U.; Lindsay, A.; Adam, C.L. and Lea, R.G.; Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep. *Reprod Biol Endocrinol*; 2005; 3: 60.
- 18- Moretti, E.; Vindigni, C.; Tripodi, S.A.; Mazzi, L.; Nuti, R.; Figura, N. and Collodel, G.; Immunolocalisation of ghrelin and obestatin in human testis, seminal vesicles, prostate and spermatozoa. *Andrologia*; 2014; 46(9): 979-85.
- 19- Sadegh, V.S.; Shokrollahi, B. and Mohammadi, S.; Ghrelin localization in testicular and epididymis tissues of ram. *Vet J (pajouhesh-va-sazandegi)*; 2017; 30(1114): 75-81.
- 20- Tanaka, K.; Minoura, H.; Isobe, T.; Yonaha, H.; Kawato, H.; Wang, D.F.; Yoshida, T.; Kojima, M.; Kangawa, K.; Toyoda, N.; Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2335-40.
- 21- Tawadros, N.; Salamonsen, L.A.; Dimitriadis, E.; Chen, C.; Facilitation of decidualization by locally produced ghrelin in the human endometrium. *Mol Human Reprod*; 2007;13:483-9.
- 11- Iglesias, M.J.; Pineiro, R.; Blanco, M.; Gallego, R.; Dieguez, C.; Gualillo, O.; Gonzalez-Juanatey, J.R. and Lago, F.; Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*; 2004; 62(3): 481-8.
- 12- Ishikawa, T.; Fujioka, H.; Ishimura, T.; Takenaka, A. and Fujisawa, M.; Ghrelin expression in human testis and serum testosterone level. *J Androl*; 2007; 28(2): 320-4.
- 13- Kheradmand, A.; Dezfoulian, O.; Alirezaei, M. and Rasoulia, B.; Ghrelin modulates testicular germ cells apoptosis and proliferation in adult normal rats. *Biochem Biophys Res Commun*; 2012; 419(2): 299-304.
- 14- Lebrethon, M.C.; Aganina, A.; Fournier, M.; Gerard, A.; Parent, A.S.; Bourguignon, J.P.; Effects of in vivo and in vitro administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophinreleasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty. *J Neuroendocrinol*; 2007;19:181-8.
- 15- Łukaszyk, A.; Rafińska, L.; Sawiński, P.; Kasprzak, A.; Olejniczak, K.; Ruciński, M.; Ruchała, M. and Sowiński, J.; Immunohistochemical and hybridocytochemical study on ghrelin signalling in the rat seminiferous epithelium. *Folia Histochem Cytobiol*; 2009; 47(3): 415-23.



- 24- Vulliemoz, N.R.; Xiao, E.; Xia-Zhang, L.; Germond, M.; Rivier, J.; Ferin, M.; Decrease in luteinizing hormone pulse frequency during a five-hour peripheral ghrelin infusion in the ovariectomized rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab*; 2004; 89:5718-23.
- 25- Yakan, B.; A Concise Review: Ghrelin and Reproductive System. *Erciyes Med J*; 2011; 33(4): 317-320.
- 22- Tena-Sempere, M.; Exploring the role of ghrelin as novel regulator of gonadal function. *Growth Horm IGF Res*; 2005; 15(2): 83-8.
- 23- Viani, I.; Vottero, A.; Tassi, F.; Cremonini, G.; Sartori, C.; Bernasconi, S.; Ferrari, B.; Ghizzoni, L.; Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab*; 2008; 93:1476-81.







## **Immunohistochemical localization of Ghrelin in Testicular Tissues of rooster**

**Ghafouri, V.<sup>1</sup>; Shokrollahi, B.<sup>2\*</sup>; Amiri, A.A.<sup>3</sup>**

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

### **Summary**

*Received:* 10 October 2019

*Accepted:* 24 May 2019

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

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

\* Corresponding Author E-mail: [Borhansh@gmail.com](mailto:Borhansh@gmail.com)

