

Intermediary role of kisspeptin in the stimulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estrogen in the preoptic area of sheep brain

Mohammad Reza Jafarzadeh Shirazi¹, Amin Tamadon^{2,3*}

1. Dept. Animal Sciences, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

2. Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

3. Dept. Animal Health Management, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received: 5 Jan 2010

Accepted: 6 Mar 2010

Abstract

Introduction: The role of estrogen in the stimulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons is clear. These neurons do not express estrogen alpha receptors, so other mediator neurons should be present to transmit the positive feedback effect of estrogen to the GnRH neurons. Kisspeptin neurons have an important role in the stimulation of GnRH neurons, so they can be the mediator of the effect of estrogen on GnRH neurons in preoptic area of sheep brain. One of the known effects of estrogen is the stimulation of Fos gene in the brain. The aim of the present study was to determine the intermediary role of kisspeptin in the transmission of estrogen effects to the gonadotropin-releasing hormone neurons in the preoptic area of sheep brain.

Methods: Six mature ewes in breeding season were selected and ovariectomised. Three ewes in treatment group were injected with 50 mg estradiol benzoate in 1 ml of sunflower oil and three ewes in control group were injected with saline solution intramuscularly. Immediately after estradiol injections, the hypothalamus of the ewes was removed. The count of kisspeptin neurons, Fos genes, and kisspeptin neurons which colocalized with Fos genes were determined by immunohistochemistry.

Results: Estradiol injection increased the colocalization of kisspeptin with Fos gene in the preoptic area of the sheep brain ($P=0.01$). Results of the present study showed that 86.9 percent of kisspeptin neurons colocalized with Fos gene in the preoptic area ($P=0.01$).

Conclusion: Kisspeptin neurons are important mediators in transmission of positive feedback effect of estrogen into GnRH neurons in the preoptic area of sheep brain.

Key words: Kisspeptin; Fos gene; Estrogen; Gonadotropin-releasing hormone.

* Corresponding author e-mail: tamadon@shirazu.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

بررسی اثر میانجی کیسپتین بر تحریک نورون‌های هورمون آزاد کننده گوناوتروپین توسط استروژن در ناحیه پیش‌بینایی مغز گوسفند

محمد رضا جعفرزاده شیرازی^۱، امین تمدن^{۲،*}

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز

۲. مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

۳. گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز

پذیرش: ۱۵ اسفند ۸۸

دریافت: ۱۵ دی ۸۸

چکیده

مقدمه: نقش استروژن در تحریک نورون‌های هورمون آزاد کننده گوناوتروپین روشن است. چون این نورون‌ها گیرنده آلفای استروژن را بیان نمی‌کنند، بنابراین بایستی نورون‌های میانجی وجود داشته باشند که اثر بازگشتی مثبت استروژن را به نورون‌های هورمون آزاد کننده گوناوتروپین انتقال دهند. نورون‌های کیسپتین نقش مهمی در تحریک نورون‌های هورمون آزاد کننده گوناوتروپین دارند و بنابراین می‌توانند میانجی اثر استروژن بر نورون‌های هورمون آزاد کننده گوناوتروپین در ناحیه پیش‌بینایی هیپوتالاموس مغز در میش باشند. یکی از شناخته شده‌ترین کنش‌های استروژن تحریک ژن فاس در مغز است. هدف مطالعه حاضر مشخص نمودن نقش میانجی کیسپتین در انتقال اثرات استروژن بر نورون‌های هورمون آزاد کننده گوناوتروپین در ناحیه پیش‌بینایی مغز گوسفند است.

روش‌ها: شش راس میش بالغ در فصل جفت‌گیری انتخاب و تخمدان‌برداری شدند. به ۳ میش گروه تیمار ۵۰ میلی گرم استرادیول بنزوات در ۱ میلی لیتر روغن گل آفتاب-گردان و به ۳ میش گروه شاهد ۱ میلی لیتر محلول نمکی به صورت عضلانی تزریق شد. بعد از تزریق استرادیول و خارج کردن هیپوتالاموس مغز، در ناحیه پیش‌بینایی، شمار نورون‌های کیسپتین، شمار ژن‌های فاس و شمار نورون‌های کیسپتین که با ژن فاس همپوشانی داشتند با روش ایمونوهیستوشیمی تعیین شدند.

یافته‌ها: تزریق استرادیول میزان همپوشانی بیان کیسپتین و ژن فاس را در ناحیه پیش‌بینایی مغز میش در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد ($P=0/01$). نتایج نشان می‌دهد که ۸۶/۹ درصد نورون‌های کیسپتین با ژن فاس در ناحیه پیش‌بینایی همپوشانی می‌کنند ($P=0/01$).

نتیجه‌گیری: نورون‌های کیسپتین میانجی مهمی در انتقال اثرات بازگشتی مثبت استروژن به نورون‌های هورمون آزاد کننده گوناوتروپین در ناحیه پیش‌بینایی مغز گوسفند هستند.

واژه‌های کلیدی: کیسپتین، ژن فاس، استروژن، هورمون آزاد کننده گوناوتروپین

مقدمه

پیش‌بینایی^۲ هیپوتالاموس قرار دارند. استروژن نقش مهمی در تحریک نورون‌های هورمون آزاد کننده گوناوتروپین دارد. روشن است که استرادیول مستقیم با نورون‌های هورمون آزاد

نورون‌های هورمون آزاد کننده گوناوتروپین^۱ در ناحیه

1. Gonadotropin-releasing hormone
2. Preoptic area

tamadon@shirazu.ac.ir
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

استرادیول و تستوسترون، بیان کیس-۱ را در هسته کمانی مهار می‌کند [۸، ۱۳]، می‌توان پنداشت که نورون‌های کیس‌پتین اثر بازگشتی منفی استروئیدها را نیز به نورون‌های هورمون آزاد کننده گونادوتروپین منتقل می‌کنند. بیان نورون‌های کیس‌پتین در گوسفند [۳۰]، میمون [۲۲] و انسان [۲۴] گزارش شده است؛ هر چند در این گونه‌ها بیشتر این نورون‌ها در هسته کمانی قرار دارند ولی شمار کمی از آنها در ناحیه پیش‌بینایی گوسفند و انسان نیز مشاهده شده‌اند [۱۰]. این تفاوت ممکن است مربوط به جایگاه اثر بازگشتی مثبت استرادیول باشد که در ناحیه پایه‌ای - میانی هیپوتالاموس گوسفند [۶] و پرمات‌ها [۷] وجود دارند. در میش درست پیش از افزایش ناگهانی هورمون لوتئینه کننده، میزان بیان کیس-۱ افزایش می‌یابد [۱۸] که نشان دهنده نقش احتمالی نورون‌های کیس‌پتین در اثر بازگشتی مثبت استرادیول است. همانند جوندگان، تخمدان‌برداری گوسفند [۱] و پرمات‌ها یا مهار چرخه تخمدانی در زنان [۲۴]، بیان ژن کیس-۱ در هسته کمانی را زیاد می‌کند. بنابراین، نورون‌های کیس‌پتین ممکن است اثر بازگشتی منفی استروئیدها را نیز میانجی‌گری کنند [۱۵].

در مورد نقش احتمالی کیس‌پتین به عنوان رابط احتمالی استروژن و هورمون آزاد کننده گونادوتروپین مطالعه‌های کمی انجام شده است. یکی از شناخته شده‌ترین کنش‌های استروژن تحریک ژن فاس^{۱۰} در مغز است [۵]. مطالعه حاضر بر این فرض استوار شده است که نورون‌های کیس‌پتین در ناحیه پیش‌بینایی با ژن فاس همپوشانی دارند. هدف مطالعه حاضر مشخص نمودن نقش میانجی کیس‌پتین در انتقال اثرات استروژن بر نورون‌های هورمون آزاد کننده گونادوتروپین در ناحیه پیش‌بینایی مغز گوسفند است.

مواد و روش‌ها

شش راس میش با وزن تقریبی ۵۵ کیلوگرم و سن ۲/۵ سال، در فصل جفت‌گیری، در ایستگاه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز انتخاب شدند. برای حذف اثرات

کننده گونادوتروپین ارتباط ندارد [۱۴]. محققین تلاش‌های زیادی برای یافتن نورون‌های رابط بین استروژن و هورمون آزاد کننده گونادوتروپین انجام داده‌اند [۱۰، ۱۴].

کیس‌پتین^۱ پپتید تنظیم کننده کلیدی تراوش هورمون آزاد کننده گونادوتروپین و هورمون لوتئینه کننده^۲ است [۲۸]. کیس - پتین موجب آزادسازی هورمون آزاد کننده گونادوتروپین [۱۲، ۲۶] و هورمون لوتئینه کننده [۷، ۱۷] در بیشتر گونه‌ها می‌شود. کیس‌پتین از پیش‌سازی به نام پری پروکیس‌پتین ساخته می‌شود که فرآورده ژن کیس-۱^۳ است [۱۹]. این پیش‌ساز، ۱۴۵ اسید آمینه دارد که بعد از شکسته شدن، به فرآورده‌های پپتیدی شامل کیس‌پتین-۱۰، کیس‌پتین-۱۳، کیس‌پتین-۱۴ و کیس-پتین-۵۴ تبدیل می‌شود [۲۱]. فرآورده پپتیدی اصلی ژن کیس-۱، پپتیدی دارای ۵۴ آمینواسید است که بیشتر از جفت ترشح می‌شود و متاستین نیز نامیده می‌شود [۲۵]. پس از پیوستن کیس‌پتین با گیرنده‌هایش، موجب فعال شدن فسفولیپاز C، هیدرولیز PIP₂^۴، آزاد شدن Ca²⁺ و فسفریلاسیون ERK^۵ و MAP کیناز^۶ می‌شود [۳]. بیان ژن گیرنده کیس‌پتین به نام گیرنده متصل به پروتئین جی - ۵۴ (GPR54)^۷ بیشتر در جفت، پانکراس، طناب نخاعی و نواحی گوناگون مغز مانند هیپوتالاموس، گانگلیون پایه‌ای، آمیگدال و هیپوکامپ گزارش شده است [۹]. جهش در GPR54، از آغاز بلوغ در گوسفند [۳۱] و موش [۲۳] جلوگیری می‌کند.

کیس‌پتین در کنش‌های بازگشتی مثبت استروئیدهای تخمدان نقش دارد [۲۷]. بیان کیس‌پتین با باروری و بلوغ [۴، ۲۱]، تغذیه [۲۰] و فصل جفت‌گیری مرتبط است [۱۶]. نورون‌های در برگیرنده کیس‌پتین در موش و موش صحرائی، در هسته‌های پیش بطنی جلویی - شکمی^۸ و هسته کمانی^۹ قرار دارند [۸، ۲۸]. کیس‌پتین در هسته کمانی و ناحیه پیش‌بینایی هیپوتالاموس مغز گوسفند یافت شده است [۱۰، ۱۱]. از آنجا که

1. Kisspeptin
2. Luteinizing hormone
3. Kiss-1
4. Phosphatidylinositol biphosphate
5. Extracellular signal-related kinase
6. Mitogen-activated protein kinase
7. G-protein-coupled receptor-54
8. Anteroventral periventricular nucleus
9. Arcuate nucleus

10. Fos gene

جدول ۱- تاثیر تزریق عضلانی استرادیول بنزوات بر تعداد نورون‌های (میانگین $\pm$ انحراف معیار) نشان دهنده بیان کیس پیتین، ژن فاس و همپوشانی کیس پیتین و ژن فاس در ناحیه پیش‌بینایی مغز می‌ش

تعداد نورون‌های			گروه
همپوشانی کیس پیتین و ژن فاس	ژن فاس	کیس پیتین	
$16/0 \pm 3/61^*$	$12/0 \pm 7/0$	$18/33 \pm 3/51^*$	استرادیول بنزوات ($n=3$)
$0/33 \pm 0/58^*$	$1/0 \pm 1/0$	$1/67 \pm 1/52^*$	شاهد ($n=3$)

* وجود تفاوت معنی‌دار ($P \leq 0/05$) در هر ستون را نشان می‌دهد.

تخمندان همه می‌ش‌ها از ۳ هفته پیش از شروع مطالعه تخمدان- برداری شدند. به ۳ می‌ش گروه تیمار که به طور تصادفی انتخاب شده بودند ۵۰ میلی گرم استرادیول بنزوات (شرکت سیگما، سنت لوئیس، میسوری، ایالات متحده) در ۱ میلی لیتر روغن گل آفتاب گردان به ازای هر می‌ش به صورت عضلانی تزریق شد. به ۳ می‌ش گروه شاهد ۱ میلی لیتر محلول نمکی اتانولیک به صورت عضلانی تزریق شد.

بلافاصله بعد از تزریق استرادیول می‌ش‌ها با تزریق سدیم پنتوباریتال در سرخرگ کاروتید کشته شدند و سرهای آنها در پارافرمالدهاید ۴٪ در بافر فسفات ۰/۱ مولار ($pH=7/4$) دارای هپارین (۱۰ واحد بر میلی لیتر) پرفیوژ شدند. بافت ناحیه پیش-بینایی با روشی که توسط اسمیت و همکاران [۲۹] شرح داده شده است، جمع‌آوری و آماده‌سازی شدند. پس از بیرون آوردن مغز، ناحیه پیش‌بینایی جدا شده و در محلول سوکروز ۳۰٪ قرار داده شدند. قطعه‌های کورونال یخ زده، با ضخامت ۴۰ میکرومتر برش داده شدند و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد، در محلول دارای ماده حفاظت کننده از یخ‌زدگی نگهداری شدند. برای بررسی ایمونوهیستوشیمی، قطعه‌های بافت با محلول ۰/۰۵ مولار فسفات بافر سالین دو بار و به مدت ۱۰ دقیقه شسته شدند. سپس قطعه‌ها در سدیم برویدرات ۱٪ به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند و در محلول فسفات بافر سالین شسته شدند. پس از آن، قطعه‌ها در محلول پراکسید هیدروژن و متانول ۵۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند و سپس در محلول فسفات بافر سالین شسته شدند. پس از انکوباسیون به وسیله سرم بلوک کننده، آنتی‌بادی اولیه فاس (بر علیه خرگوش) (شرکت سانتاکروز، کالیفرنیا، ایالات متحده) ($1:250$) اضافه و به مدت ۳ روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس در محلول فسفات بافر سالین شسته شدند و با آنتی‌بادی ثانویه بیوتین دار بز بر علیه خرگوش (شرکت وکتور لابوریتوریز، تمکولا، کالیفرنیا،

ایالات متحده) ($1:250$) به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شدند و با محلول فسفات بافر سالین شسته شدند. برای پدیدار شدن ژن فاس از نیکل دی‌آمینوبنزیدين^۱ استفاده شد. پس از انکوباسیون به وسیله سرم بلوک کننده آنتی‌بادی کیس پیتین (شرکت فونیکس فارماکوتیکالز، بلمونت، کالیفرنیا، ایالات متحده) ($1:1500$) در اتاق نگهداری و سپس با محلول فسفات بافر سالین شسته شدند. قطعات با آنتی‌بادی ثانویه بیوتین دار بز بر علیه خرگوش وکتور ($1:250$) به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شدند و با محلول فسفات بافر سالین شسته شدند. برای پدیدار شدن کیس پیتین از دی‌آمینوبنزیدين استفاده شد و نمونه‌ها با محلول فسفات بافر سالین شستشو شدند. در ناحیه پیش‌بینایی هیپوتالاموس شمار نورون‌های کیس پیتین، شمار ژن‌های فاس و شمار نورون‌های کیس پیتین که با ژن فاس همپوشانی داشتند تعیین شدند. کیس پیتین به صورت نورون‌های دو قطبی قهوه‌ای رنگ بدون هسته تاریک، ژن فاس با هسته‌های مشکی و هم پوشانی کیس پیتین و ژن فاس به صورت نورون‌های دو قطبی قهوه‌ای رنگ همراه با هسته‌های مشکی و با استفاده از میکروسکوپ نوری مشخص و شمارش شدند (شکل ۱). تفاوت تعداد و درصد نورون‌های دارای کیس پیتین و ژن فاس، هر کدام به تنهایی و نیز به صورت همپوشانی، در دو گروه شاهد و درمان با استفاده از آزمون تی دو نمونه‌ای آنالیز شد (نرم افزار SPSS ۱۱/۵ تحت ویندوز، شیکاگو، ایلینویز، ایالات متحده). $P \leq 0/05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تزریق استرادیول میزان بیان کیس پیتین را در ناحیه پیش-

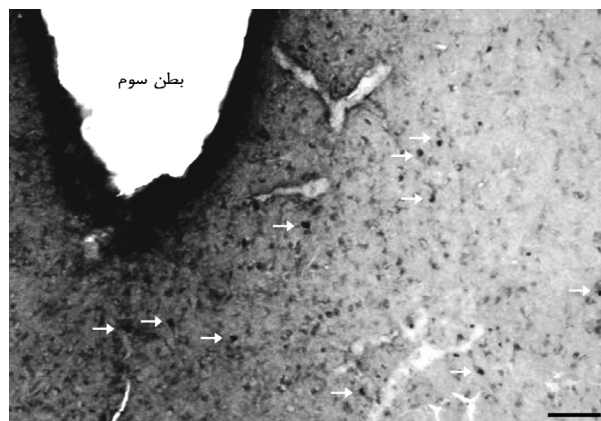
1. Ni-Diaminobenzidine

زمان آزادسازی ناگهانی پیش از تخمک‌ریزی، نقش آن را به عنوان محرک اصلی نوروهای هورمون آزاد کننده گونادوتروپین نشان می‌دهد.

اخیراً آزمایش‌های مشابهی انجام شده و نشان داده‌اند که استرادیول در انتهای فاز فولیکولی تأثیری بر میزان همپوشانی کیس‌پتین و فاس در ناحیه پیش‌بینایی ندارد [۲۹] که با نتایج تحقیق کنونی مطابقت ندارد که ممکن است به سبب تفاوت در غلظت آنتی‌بادی و سایر تغییرات در روش آزمایش باشد. از آنجا که نشان داده شده که تزریق آنتاگونیست کیس‌پتین در ناحیه پیش‌بینایی مانع از آزادسازی ناگهانی هورمون لوتئینه کننده شده است [۲] و در مطالعه کنونی ثابت شده است که استرادیول سبب افزایش میزان بیان کیس‌پتین در ناحیه پیش‌بینایی در مقایسه با گروه شاهد شده است، می‌توان نتیجه گرفت که کیس‌پتینی که از ناحیه پیش‌بینایی تولید می‌شود اثرات بازگشتی مثبت استرادیول بر آزادسازی ناگهانی هورمون لوتئینه کننده را میانجی‌گری می‌کند.

نتایج مطالعه حاضر با مطالعه محققین پیشین هماهنگی دارد چون آنان نشان دادند که در موش، استرادیول سبب افزایش میزان همپوشانی کیس‌پتین و فاس در ناحیه هسته‌های پیش-بطنی جلویی - شکمی می‌شود [۲]. روشن است که در ناحیه هسته‌های پیش‌بطنی جلویی - شکمی موش صحرایی، استرادیول سبب آزادسازی ناگهانی هورمون لوتئینه کننده از راه نوروهای میانجی می‌شود. در گوسفند، جمعیت فراوانی از کیس‌پتین در هسته کمانی واقع شده است و شمار کمی کیس-پتین در ناحیه پیش‌بینایی مشاهده شده است [۲۹].

در مورد نقش کیس‌پتین در ناحیه پیش‌بینایی یافته‌های کمی در دسترس است. ثابت شده است که استرادیول اثر تحریکی بر نوروهای هورمون آزاد کننده گونادوتروپین دارد [۲۵]. از سویی وجود گیرنده‌های آلفا استرادیول که در آزادسازی ناگهانی هورمون لوتئینه کننده موثرند ثابت نشده است. بنابراین نوروهای بایستی وجود داشته باشند که با بیان رسپتور آلفا استرادیول سبب انتقال اثرات بازگشتی مثبت استرادیول بر نوروهای هورمون آزاد کننده گونادوتروپین بشوند. نوروپتیدهایی چون نوروپتید Y (Neuropeptide Y) که در حاضر ثابت می‌کند که کیس‌پتین محرک و رابط مهم اثرات بازگشتی مثبت استرادیول بر نوروهای هورمون آزاد کننده



شکل ۱- نمونه‌های از همپوشانی نوروهای کیس‌پتین (رنگ خاکستری) با ژن فاس (رنگ سیاه) بعد از تزریق استرادیول در ناحیه پیش‌بینایی مغز میش (پیکان‌های سفید رنگ)، شاخص ۱۰۰ میکرومتر است.

بینایی مغز میش در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد (جدول ۱؛ $P=0/005$). تزریق استرادیول تأثیری بر میزان بیان فاس در ناحیه پیش‌بینایی مغز میش در مقایسه با گروه شاهد نداشت (جدول ۱؛ $P=0/09$). تزریق استرادیول میزان همپوشانی بیان کیس‌پتین و فاس را در ناحیه پیش‌بینایی مغز میش در مقایسه با گروه شاهد را افزایش داد (جدول ۱ و شکل ۱؛ $P=0/01$). نتایج نشان می‌دهد که بلافاصله بعد از تزریق استروژن ۸۶/۹ درصد نوروهای کیس‌پتین با ژن فاس در ناحیه پیش‌بینایی همپوشانی می‌کنند که اختلاف معنی‌داری با مقدار ۱۱/۱ درصد در گروه کنترل داشت ($P=0/01$).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استرادیول در ناحیه پیش‌بینایی اثرات بازگشتی مثبت خود را از راه کیس‌پتین به نوروهای هورمون آزاد کننده گونادوتروپین منقل می‌کند چون میزان همپوشانی کیس‌پتین و ژن فاس در گروه تیمار بیشتر از گروه شاهد بود. در این مطالعه نشان داده شد که میزان همپوشانی کیس‌پتین و فاس در هسته کمانی بیشتر از گروه شاهد است. هر چند هسته کمانی مرکز آزادسازی ناگهانی هورمون آزاد کننده گونادوتروپین نیست ولی شمار فراوان نوروهای کیس‌پتین در زمان بلوغ و در فصل جفت‌گیری و در افزایش ترشح هورمون لوتئینه کننده موثرند، تنها در صد کمی از گیرنده‌های آلفا استرادیول را بیان می‌کنند. نتایج مطالعه

نورون‌های کیس‌پپتین میانجی مهمی در انتقال اثرات بازگشتی مثبت استروژن به نورون‌های هورمون آزاد کننده گونادوتروپین در ناحیه پیش‌بینایی مغز گوسفند می‌باشند.

گونادوتروپین است؛ چون وجود نورون‌های هورمون آزاد کننده گونادوتروپین در ناحیه پیش‌بینایی روشن است و صد درصد گیرنده‌های آلفا استرادیول با کیس‌پپتین بیان می‌شوند [۱۰]. نتیجه گیری نهایی از مطالعه حاضر به روشنی نشان می‌دهد که

References

- [1] Abel TW, Voytko ML, Rance NE, The effects of hormone replacement therapy on hypothalamic neuropeptide gene expression in a primate model of menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (1999) 2111-2118.
- [2] Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K-I, Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev* 53 (2007) 367-378.
- [3] Alexander MJ, Colocalization of neurotensin messenger ribonucleic acid (mRNA) and progesterone receptor mRNA in rat arcuate neurons under estrogen-stimulated conditions. *Endocrinology* 140 (1999) 4995-5003.
- [4] Bethea CL, Widmann AA, Immunohistochemical detection of progestin receptors in hypothalamic β -endorphin and substance P neurons of steroid-t monkeys. *Neuroendocrinology* 63 (1996) 132-141.
- [5] Boris JC, Regulation of cell signalling cascades by steroid hormones. *J Cell Biochem* 93 (2004) 20-27.
- [6] Dellovade TL, Merchenthaler I, Estrogen regulation of neurokinin B gene expression in the mouse arcuate nucleus is mediated by estrogen receptor {alpha}. *Endocrinology* 145 (2004) 736-742.
- [7] Dhillon W, Murphy K, Bloom S, The neuroendocrine physiology of kisspeptin in the human. *Rev Endocr Metab Disord* 8 (2007) 41-46.
- [8] Dorling AA, Todman MG, Korach KS, Herbison AE, Critical role for estrogen receptor alpha in negative feedback regulation of gonadotropin-releasing hormone mRNA expression in the female mouse. *Neuroendocrinology* 78 (2003) 204-209.
- [9] Fox SR, Harlan RE, Shivers BD, Pfaff DW, Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology* 51 (1990) 276-283.
- [10] Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A, Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett* 401 (2006) 225-230.
- [11] Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CVR, Jafarzadeh Shirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ, Kisspeptin Neurons in the Arcuate Nucleus of the Ewe Express Both Dynorphin A and Neurokinin B. *Endocrinology* 148 (2007) 5752-5760.
- [12] Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA, A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145 (2004) 4073-4077.
- [13] Goubillon ML, Delaleu B, Tillet Y, Caraty A, Herbison AE, Localization of estrogen-receptive neurons projecting to the GnRH neuron-containing rostral preoptic area of the ewe. *Neuroendocrinology* 70 (1999) 228-236.
- [14] Herbison AE, Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19 (1998) 302-330.
- [15] Jafarzadeh Shirazi MR, Sepehri H, Gheisari HR, Effect of different phases of estrous cycle on kisspeptin expression in the arcuate nucleus of the ewe. *J Anim Vet Adv* 7 (2008) 1101-1104.
- [16] Karsch FJ, Bowen JM, Caraty A, Evans NP, Moenter SM, Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol Reprod* 56 (1997) 303-309.
- [17] Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T, Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 320 (2004) 383-388.

- [18] Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP, Kisspeptins are novel potent vasoconstrictors in humans, with a discrete localization of their receptor, G protein-coupled receptor 54, to atherosclerosis-prone vessels. *Endocrinology* 148 (2007) 140-147.
- [19] Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, Harrison DC, AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 276 (2001) 28969-28975.
- [20] Pillon D, Caraty A, Fabre-Nys C, Bruneau G, Short-term effect of oestradiol on neurokinin B mRNA expression in the infundibular nucleus of ewes. *J Neuroendocrinol* 15 (2003) 749-753.
- [21] Rance NE, McMullen NT, Smialek JE, Price DL, Young WS, III, Postmenopausal hypertrophy of neurons expressing the estrogen receptor gene in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 71 (1990) 79-85.
- [22] Rometo AM, Krajewski SJ, Lou Voytko M, Rance NE, Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 92 (2007) 2744-2750.
- [23] Sandoval-Guzmán T, Rance NE, Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. *Brain Res* 1026 (2004) 307-312.
- [24] Seminara SB, Metastin and its G protein-coupled receptor, GPR54: Critical pathway modulating GnRH secretion. *Front Neuroendocrinol* 26 (2005) 131-138.
- [25] Simerly RB, Young BJ, Carr AM, Co-expression of steroid hormone receptors in opioid peptide-containing neurons correlates with patterns of gene expression during the estrous cycle. *Brain Res Mol Brain Res* 40 (1996) 275-284.
- [26] Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadeh Shirazi MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T, Bentley GE, Clarke IJ, Lehman MN, Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: A novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* 149 (2008) 5770-5782.
- [27] Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA, Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146 (2005) 3686-3692.
- [28] Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA, Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146 (2005) 2976-2984.
- [29] Smith JT, Li Q, Pereira A, Clarke IJ, Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 150 (2009) 5530-5538.
- [30] Tena-Sempere M, GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Hum Reprod Update* 12 (2006) 631-639.
- [31] Wood RI, Mehta V, Herbosa CG, Foster D, Prenatal testosterone differentially masculinizes tonic and surge modes of luteinizing hormone secretion in the developing sheep. *Neuroendocrinology* 62 (1995) 238-247.