



Effect of lactation on the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in dorsomedial and paraventricular nuclei of the rat hypothalamus

Hamed Adavi¹, Mohammad Reza Jafarzadeh Shirazi², Mohammad Javad Zamiri², Mohammad Reza Namavar³, Nader Tanideh⁴, Amin Tamadon^{5*}

1. Graduate Student, Dept. Animal Sciences, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

2. Dept. Animal Sciences, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

3. Dept. Anatomical Science, School of Medicine, Histomorphometry & stereology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

4. Stem Cell and Transgenic Technology Research Center & Dept. Pharmacology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

5. Division of Animal Health Management, School of Veterinary Medicine, Shiraz University & Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 24 Nov 2010

Accepted: 9 March 2011

Abstract

Introduction: Gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) is believed to be an inhibitor of gonadotropin releasing hormone (GnRH) secretion. The role of GnIH in lactational inhibition of gonadotropin secretion is not well known; therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of lactation on expression of GnIH in these nuclei of lactating and non-lactating rats.

Methods: Ten postpartum rats of the Sprague-Dawley strain were randomly allotted into two groups. The number of pups was adjusted to five pups per suckling female, while the control non-lactating rats were separated from their pups immediately upon parturition. The lactating rats were allowed to suckle their pups for eight days. The number of GnIH neurons in the dorsomedial (DMH) and paraventricular (PVN) nuclei was estimated using an immunohistochemical method.

Results: The number of GnIH neurons in DMH ($P=0.005$) and PVN ($P=0.001$) of lactating rats were significantly higher than those of the non-lactating rats. Moreover, fibers of GnIH neurons were observed in anteroventral periventricular nucleus (AVPV) in lactating rats.

Conclusion: Lactation increased GnIH expression in DMH and PVN of the lactating rats, and thus may have a role in inhibiting GnRH and subsequently LH secretion during the lactation period.

Key words: Gonadotropin inhibitory hormone, Lactation, Dorsomedial nucleus, Paraventricular nucleus, Rat

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

تأثیر شیردهی بر میزان بیان هورمون مهارکننده گونادوتروپین در هسته‌های پشتی - میانی و پیرابطنی هیپوتالاموس موش صحرایی

حامد اداوی^۱، محمد رضا جعفرزاده شیرازی^۱، محمد جواد ضمیری^۱، محمد رضا نام‌آور^۲، نادر تنیده^۳، امین تمدن^۴

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

۲. گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات هیستومورفومتری و استریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

۳. دانشگاه شیراز و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانس ژنیک، شیراز

۴. گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانس ژنیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

پذیرش: ۱۸ اسفند ۸۹

دریافت: ۳ آذر ۸۹

چکیده

مقدمه: هورمون مهارکننده گونادوتروپین (GnIH) به عنوان عامل مهارکننده ترشح هورمون آزادکننده گونادوتروپین (GnRH) شناخته شده است. هدف پژوهش کنونی مقایسه اثر شیردهی بر بیان نورون‌های GnIH در هسته‌های پشتی - میانی (DMH) و پیرابطنی (PVN) هیپوتالاموس موش‌های صحرایی شیرده و غیر شیرده بود.

روش‌ها: ده موش صحرایی سویه اسپراگ - داوولی بلافاصله پس از زایش انتخاب و به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. ماده‌های گروه غیرشیرده بلافاصله پس از زایش از نوزدان خود جدا شدند. ماده‌های گروه شیرده، هشت روز به پنج نوزاد خود شیر دادند. نورون‌های دارای GnIH در روز هشتم پس از زایش در DMH و PVN با روش ایمونوهیستوشیمی رنگ‌آمیزی و شمارش شد.

یافته‌ها: شمار نورون‌های بیان‌کننده GnIH در DMH ($P=0/005$) و PVN ($P=0/001$) موش‌های صحرایی شیرده بیشتر از غیرشیرده بود. در برش‌های هسته پیش بطنی جلویی - شکمی (AVPV) رشته‌های نورون‌های GnIH در موش‌های صحرایی شیرده مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: شیردهی بیان نورون‌های GnIH در DMH و PVN هیپوتالاموس را افزایش داد که ممکن است سازه مهار ترشح GnRH و کاهش ترشح هورمون لوتئینیزه‌کننده (LH) در دوره شیردهی باشد.

واژه‌های کلیدی: هورمون مهارکننده گونادوتروپین، شیردهی، هسته پشتی - میانی، هسته پیرابطنی، موش صحرایی

مقدمه

کوتاهی از آن مانند گاو [۳] متوقف می‌شود. در موش صحرایی شیرده، مهار چرخه فحلی بیشتر ناشی از مهار ترشح ضربانی هورمون لوتئینیزه‌کننده (LH) و هورمون آزادکننده

رشد و تکامل فولیکول و تخم‌کریزی در پستانداران مختلف در کل دوران شیردهی مانند انسان [۱۸] و یا بخش

1. Gonadotropin inhibitory hormone
2. Gonadotropin releasing hormone
3. Dorsomedial nucleus
4. Paraventricular nucleus
5. Anteroventral periventricular nucleus
6. Luteinizing hormone

tamadon@shirazu.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

گونادوتروپین (GnRH) است [۲۳].

عمل مکیدن سرپستانک محرک مهمی در مهار ترشح ضربانی LH در موش‌های صحرایی شیرده است؛ زیرا در موش‌های صحرایی شیرده در روز ۸ شیردهی ترشح ضربانی LH به شدت مهار می‌شود ولی با جدا کردن نوزادان از مادر برای ۲۴ ساعت این ضربان‌ها دوباره برقرار می‌شوند [۱۶].

فزون بر این، تزریق بروموکریپتین (آگونیست دوپامین) نتوانست کاهش ایجاد شده در بسامد ضربان‌های LH در نیمه اول دوره شیردهی را به حالت اولیه باز گرداند [۱۷، ۲۱، ۲۴]، که نشان می‌دهد پرولاکتین در مهار ترشح LH در اوایل و اواسط دوره شیردهی اهمیت کمتری دارد؛ به هر روی، سازوکار نورواندوکرینی مهار ترشح LH است به خوبی شناخته نشده است و نیاز به پژوهش بیشتری دارد [۲۲، ۲۵، ۲۶].

تاکنون بر این باور بوده‌اند که تنظیم کننده اصلی ترشح LH و هورمون تحریک کننده فولیکول^۱ (FSH)، GnRH است. پیتیدی دیگر به نام هورمون مهار کننده گونادوتروپین (GnIH) که یک پتید دوازده اسید آمینه‌ای از خانواده پتیدهای آر - اف آمید^۲ (آرژنین - فنیل‌آلانین) است، نخستین بار در سیستم هیپوتالاموس - هیپوفیزی بلدرچین شناسایی شد [۲۷]. این پتید به دلیل اثر مهاری بر سنتز و آزادسازی گونادوتروپین‌ها به نام GnIH خوانده شد [۳۱]. GnIH پرندگان، آزاد شدن LH را در همستر [۱۵] و هومولوگ آن یعنی پتید وابسته به آرژنین - فنیل‌آلانین - آمید^۳ (RFRP) آزاد شدن LH را در انسان [۳۰] و گوسفند [۷] مهار کرد.

بنابراین GnIH و RFRP هم از لحاظ ساختاری و هم عملکردی مشابه هستند [۲، ۵، ۲۹]. نورون‌های GnIH در هسته پیرا بطنی^۴ (PVN) هیپوتالاموس پرندگان [۲۸] و هسته پشتی - میانی^۵ (DMH) هیپوتالاموس همستر، موش صحرایی و موش مشاهده شده‌اند [۱۵]. بیان نورون‌های GnIH در DMH، PVN [۶] و ناحیه پیش‌بینایی^۶ (POA) [۱۱] هیپوتالاموس گوسفند نیز مشاهده شده است. نشان داده شده

است که در مغز همستر ماده بیش از ۴۰٪ جسم نورون‌های GnRH پیوندهایی با رشته‌های نورون‌های GnIH برقرار کرده‌اند؛ این سیناپس‌ها در موش صحرایی نیز به صورت کیفی مشخص شده‌اند [۱۵].

در پژوهشی دیگر بر روی هومولوگ GnIH، حضور RFRP-3 در جسم نورون‌های موجود در هسته‌های DMH و سرپستانکی^۷ و هم چنین، پیرامون هسته شکمی - میانی^۸ (VMN) شناسایی شدند. پژوهش ایمونوهیستوشیمی نشان داد که در نزدیکی ۷۵٪ از سلول‌های GnRH، فیبرهای RFRP-3 وجود دارند [۱۳].

در باره تاثیر شیردهی بر بیان GnIH در DMH موش صحرایی، اطلاعاتی در دسترس نیست. از آنجا که در زمان شیردهی، افزایش بیان GnIH می‌تواند با تاثیر بر نورون‌های GnRH موجب مهار تراوش GnRH و در نهایت کاهش تراوش LH شود؛ هدف پژوهش کنونی، بررسی ایمونوهیستوشیمی میزان بیان GnIH در نورون‌های DMH هیپوتالاموس موش‌های صحرایی شیرده و غیرشیرده بود.

مواد و روش‌ها

ده موش صحرایی آبستن سویه اسپراگ - داولی (۲۸۰-۳۲۰ گرم) در قفس‌های انفرادی در اتاقی با دمای 21 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت 50 ± 5 درصد و در ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی (روشنایی از ساعت ۷:۰۰ تا ۲۱:۰۰) نگهداری شدند.

خوراک استاندارد موش صحرایی و آب به طور آزاد در دسترس آنها قرار داده شد. تلاش شد تا تعداد حیوانات مورد استفاده به حداقل برسد. پژوهش بر اساس دستورالعمل تایید شده توسط دانشگاه علوم پزشکی شیراز برای کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

پژوهش از زمان زایمان تا روز هشتم پس از زایش به طول انجامید. موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به دو گروه پنج‌تایی تقسیم شدند. پنج موش صحرایی به عنوان گروه غیرشیرده بی درنگ پس از زایش از نوزادان خود جدا شدند. به موش‌های صحرایی گروه شیرده اجازه داده شد تا برای هشت روز به نوزادان خود شیر دهند. تنظیم تعداد نوزادان (پنج نوزاد

1. Follicle stimulating hormone
2. RFamide peptide
3. Arginine-phenylalanine-amide-related peptide
4. Paraventricular nucleus
5. Dorsomedial nucleus
6. Preoptic area

برای هر ماده) از روز زایش تا هشتمین روز پس از زایش انجام شد. روز هشتم پس از زایش، موش‌های صحرایی شیرده و غیرشیرده بین ساعت ۱۴:۰۰ و ۱۵:۰۰ به روش استنشاقی با کلروفرم بیهوش شدند.

سپس، پرفیوژن از راه بطن چپ با نرمال سالین و در ادامه با بافر فرمالین ۱۰٪ انجام شد. پس از خارج کردن مغزها از مجسمه، نمونه‌ها در بافر فرمالین ۱۰٪ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای ۲۴ ساعت نگهداری شدند. آنگاه، قسمت داین‌سفالون مغزها جدا شدند و در محلول مشابه جدیدی قرار گرفتند.

پس از ۲۴ ساعت، نمونه‌ها در سوکروز ۳۰٪ (Merck، آلمان) محلول در بافر فسفات ۰/۱ مولار در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، مغزها از محلول سوکروز خارج و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. قطعه‌های یخ زده به شیوه کورونال و به ضخامت ۳۰ میکرومتر با میکروتوم (Cryocut، American Optical Co، آمریکا) برش داده شدند و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد، در محلول دارای ماده حفاظت کننده از یخ‌زدگی^۱ نگهداری شدند. برای بررسی ایمونوهیستوشیمی، حداقل سه برش از هسته‌های DMH، PVN و پیش بطنی جلویی - شکمی^۲ (AVPV) برای هر حیوان انتخاب و روی اسلاید میکروسکوپی تثبیت شدند. برش‌های بافت به منظور بازیابی آنتی‌ژنی با محلول بافر سیترات دو بار و برای ۵ دقیقه در اجاق میکروویو قرار گرفتند و سپس در مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق خنک شدند. سپس برش‌ها با محلول فسفات بافر سالین ۰/۰۵ مولار شسته شدند و آنگاه برای ۱ ساعت در سرم بلوک کننده داری تریتون ایکس -۱۰۰^۳ و سرم نرمال بز ۱۰٪ محلول در فسفات بافر سالین ۰/۱ مولار به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

در مرحله بعد، آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه RFRP (۱:۱۰۰۰) که علیه RFRP در الاغ تولید شده است (Santa Cruz Biotechnology، آمریکا) اضافه و برای ۴۸ ساعت در ۴ درجه

سانتی‌گراد انکوبه شد.

سپس، برش‌ها با محلول فسفات بافر سالین ۰/۰۵ مولار شسته شدند. آنگاه، برش‌ها با آنتی‌بادی ثانویه IgG-FITC که علیه بز در سرم الاغ تولید شده بود (۱:۳۰۰؛ Santa Cruz Biotechnology، آمریکا) برای یک ساعت انکوبه شدند. پس از شستن نمونه‌ها با محلول فسفات بافر ۰/۱ مولار، اسلایدها در زیر میکروسکوپ کنترل و سپس با محلول تثبیت کننده ضد کم رنگ شدگی^۴ ماده فلورسنت (DAKO، آمریکا) پوشیده شدند.

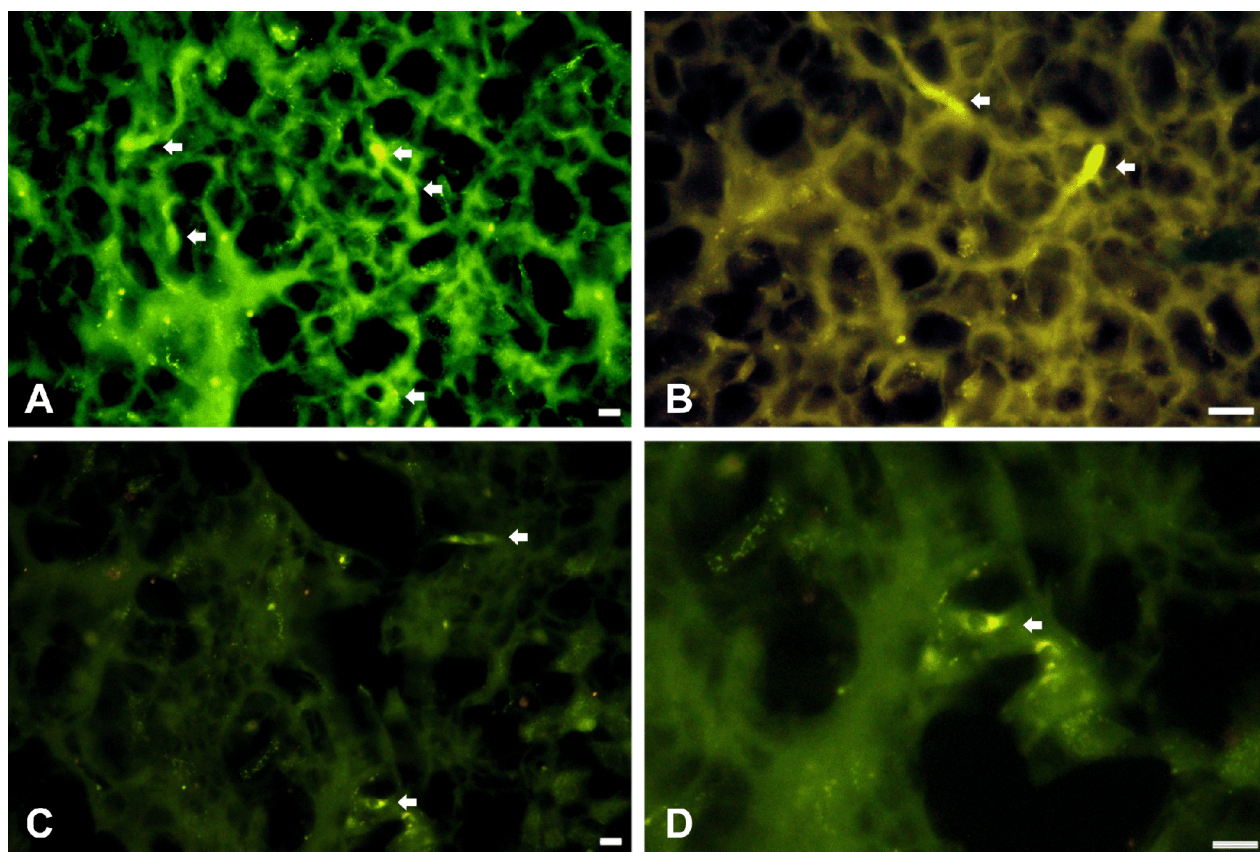
برای کنترل منفی آزمایش، آنتی‌بادی اولیه حذف و دیگر مراحل ایمونوهیستوشیمی تکرار شدند. در هر برش PVN یا DMH، نورون‌های واکنش دهنده ایمنی GnIH با میکروسکوپ فلورسنت (Nikon، آمریکا) شمارش شدند. تصاویر توسط دوربین (Canon، ژاپن) و نرم‌افزار DSLR Remote Pro گرفته و با نرم‌افزار فتوشاپ تنظیم گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون ناپارامتری دو نمونه‌ای مستقل من - ویتنی (Mann-Whitney) انجام شد و $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد (نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱/۵).

یافته‌ها

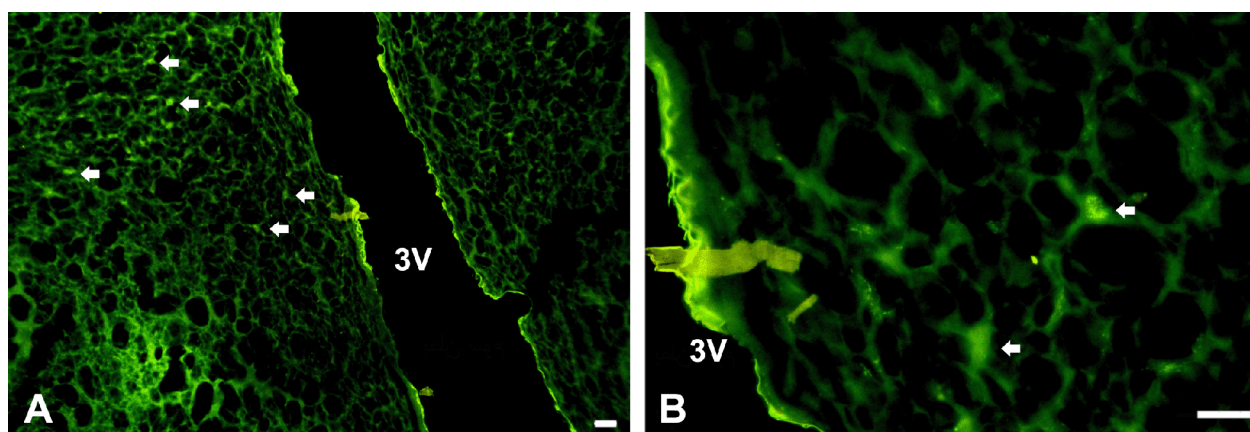
در شکل ۱، نمونه‌ای از بیان GnIH در نورون‌های هسته DMH موش‌های صحرایی شیرده و غیرشیرده، نشان داده شده است. بیان GnIH در نورون‌های PVN موش‌های صحرایی شیرده در شکل ۲، نشان داده شده است. شمار نورون‌های بیان کننده GnIH در قسمت راست DMH ($P = 0.003$) و کل DMH ($P = 0.005$) موش‌های صحرایی شیرده بیشتر از غیرشیرده بود (شکل ۴-الف).

همچنین شمار نورون‌های بیان کننده GnIH در قسمت راست PVN ($P = 0.003$) و چپ PVN ($P = 0.019$) و کل PVN ($P = 0.001$) موش‌های صحرایی شیرده بیشتر از غیرشیرده بود (شکل ۴-ب). در بررسی برش‌های ناحیه AVPV حضور رشته‌های نورون‌های GnIH در این ناحیه در موش‌های صحرایی شیرده مشاهده شد (شکل ۳). در برش‌های کنترل منفی هیچ نورون واکنش دهنده ایمنی GnIH مشاهده نگردید.

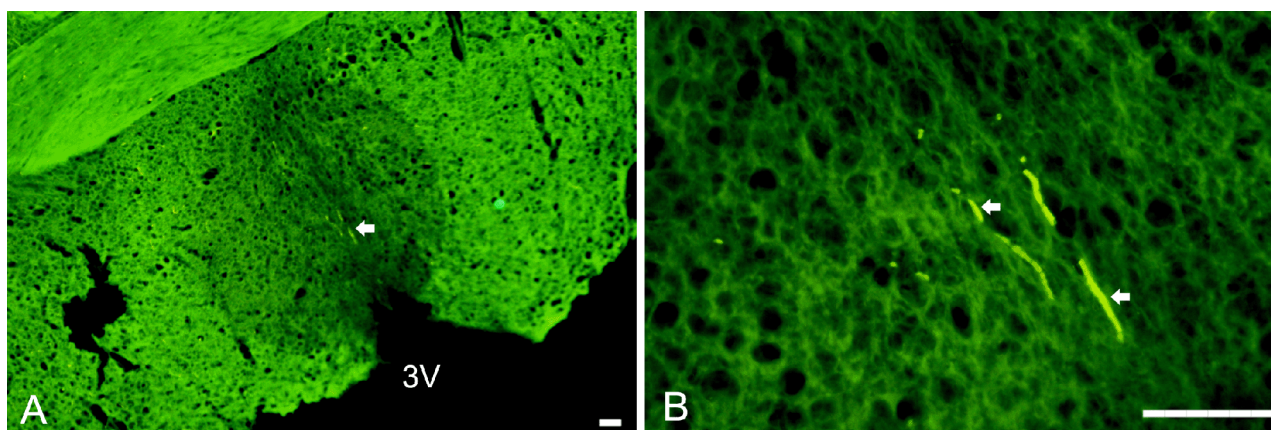
1. Cryoprotectant
2. Anteroventral periventricular nucleus
3. Triton X-100
4. Antifade



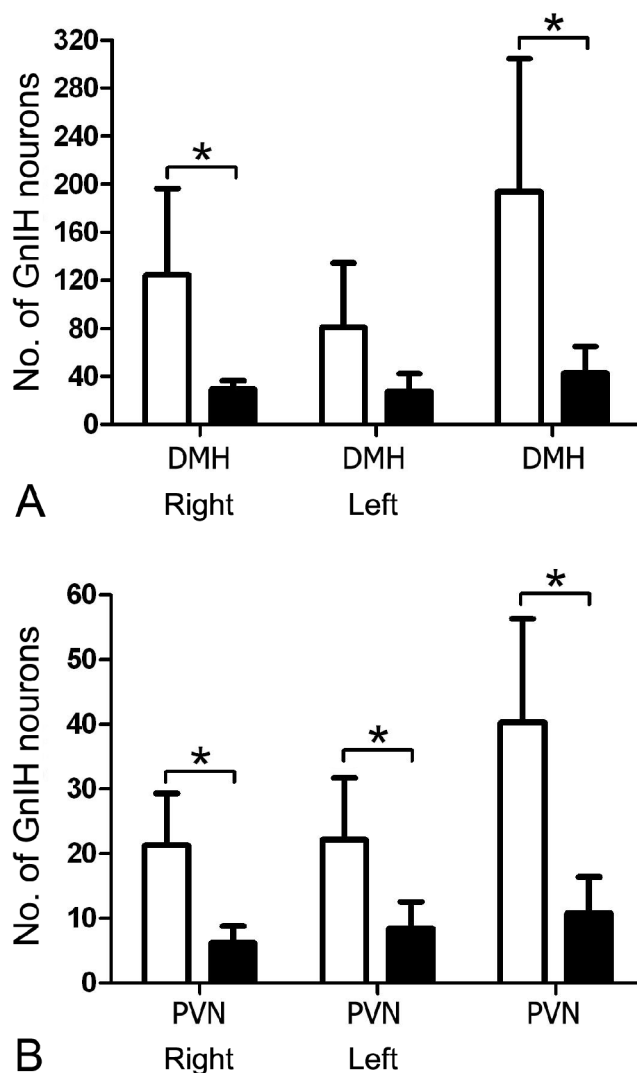
شکل ۱- نورون‌های بیان کننده هورمون مهار کننده گونادوتروپین (GnIH) (پیکان) در هسته پستی - میانی (DMH) هیپوتالاموس رنگ‌آمیزی شده به روش ایمونوهیستوشیمی موش صحرایی شیرده (A، B) و موش صحرایی غیرشیرده (C، D). شاخص ۲۰ میکرومتر است.



شکل ۲- A: برش هسته پیرا بطنی (PVN) هیپوتالاموس رنگ‌آمیزی شده با روش ایمونوهیستوشیمی موش صحرایی شیرده؛ B: نورون‌های بیان کننده هورمون مهار کننده گونادوتروپین (GnIH) (پیکان) در PVN موش صحرایی شیرده. شاخص ۴۰ میکرومتر است.



شکل ۳- A: برش هسته پیش بطنی جلویی - شکمی (AVPV) هیپوتالاموس رنگ آمیزی شده با روش ایمونوهیستوشیمی موش صحرایی شیرده؛ B: نورون های بیان کننده هورمون مهار کننده گونادوتروپین (GnIH) (پیکان) در AVPV موش صحرایی شیرده. شاخص ۴۰ میکرومتر است.



شکل ۴- میانگین و خطای استاندارد تعداد نورون های بیان کننده GnIH در هسته های هیپوتالاموسی: A: پشتی - میانی (DMH) راست و چپ، و B: پیرا بطنی (PVN) راست و چپ در موش های صحرایی (n=5) شیرده (■) و غیر شیرده (□). ستاره، نشانگر وجود تفاوت آماری معنی دار است ($P < 0.05$).

بحث

می‌تواند به طور غیرمستقیم با مهار ترشح کیس پپتین، مانع از آزادسازی ناگهانی LH در موش‌های صحرایی شیرده پس از زایش شوند.

افزایش بیان GnIH در هسته DMH می‌تواند دلایل دیگری نیز داشته باشد. افزایش سطح پرولاکتین ممکن است به طور مستقیم در مهار تراوش GnRH نقش داشته باشد [۱۹]. نشان داده شده است که هومولوگ GnIH، یعنی RFRP موش صحرایی، محرک ترشح پرولاکتین است [۱۰]. در پژوهشی دیگر اثر مهاری GnIH بر ترشح LH در موش‌های صحرایی نر به خوبی نشان داده شده است [۱۵]. استرس در موش‌های صحرایی نر سبب افزایش بیان نورون‌های GnIH شد [۱۴]، ممکن است شیردهی در موش صحرایی ماده به عنوان عاملی استرس‌زا مطرح باشد.

پژوهش کنونی نشان داد که شیردهی، بیان نورون‌های GnIH را در DMH و PVN هیپوتالاموس افزایش داد که ممکن است سازه مهار ترشح GnRH و کاهش ترشح LH در دوره شیردهی باشد؛ بنابراین، می‌توان پنداشت که یکی از مسیرهای موثر در انستروس شیردهی پستانداران، تحریک بیان GnIH در هیپوتالاموس باشد هرچند که تایید این نظریه به پژوهش‌های بیشتر در دیگر گونه‌ها نیاز دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از همکاری آقایان دکتر علی نیازی (رئیس مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز)، مهندس فرزاد محمدرضا زاده (کارشناس بخش علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز)، مهندس امین رضائی و مهندس فرزانه آرام (کارشناسان مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز)، آقای لطفعلی شیروانی (کارشناس بخش پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز) و کارشناسان مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز در اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌کند. هزینه‌های این پژوهش از محل بودجه پایان‌نامه‌های کارشناسی ارشد بخش علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تامین شد.

یافته‌های پژوهش کنونی بیان GnIH در نورون‌های هسته DMH موش صحرایی را نشان داد که با یافته‌های پژوهش‌های پیشین در گنجشک، هامستر، موش و موش صحرایی سازگار است [۴، ۱۵]. همچنین یافته‌های این پژوهش نشان داد که تعداد نورون‌های بیان‌کننده GnIH در هسته DMH و PVN موش‌های صحرایی شیرده بیشتر از غیرشیرده بود. پیش از این نشان داده شده بود که در موش‌های صحرایی، تارهای نورون‌های GnIH واقع در DMH به هسته کمائی^۱ (ARC) و POA می‌روند [۱۵]. تعداد نورون‌های بیان‌کننده GnIH در PVN به تعداد فراوان در مقایسه با DMH نبود و تا کنون مطالعه دیگری وجود نورون‌های GnIH در PVN موش صحرایی را گزارش نکرده است ولی رشته‌های نورون‌های GnIH در PVN موش صحرایی مشاهده شده است [۱۵]. در پژوهش کنونی، حضور رشته‌های نورون‌های GnIH در هسته AVPV نیز نشان داده شد. از سوی دیگر، نورون‌های دارای کیس پپتین در هسته‌های ARC و AVPV موش و موش صحرایی قرار دارند [۸، ۲۰].

کیس پپتین، محرک و رابط مهم اثر بازگشتی مثبت استرادیول بر نورون‌های هورمون آزادکننده گونادوتروپین است [۱۲]؛ وجود نورون‌های هورمون آزادکننده گونادوتروپین در ناحیه POA روشن است و صد درصد گیرنده‌های آلفا استرادیول با کیس پپتین بیان می‌شوند [۹]. در ناحیه AVPV موش صحرایی، استرادیول سبب آزادسازی ناگهانی LH از راه نورون‌های میانجی می‌شود [۱]. فزون بر این، تزریق آتاگونست کیس پپتین به ناحیه POA مانع آزادسازی ناگهانی LH شد [۱]. بیان کیس پپتین در ناحیه ARC موش‌های شیرده نیز مهار می‌شود [۳۲]. بنابراین، بیان بیشتر GnIH در نورون‌های DMH ممکن است به طور مستقیم سبب مهار محور تولیدمثلی شود. از سوی دیگر حضور رشته‌های نورون‌های بیان‌کننده GnIH در هسته‌های AVPV، ARC و POA در موش‌های شیرده نشانه آن است که نورون‌های GnIH احتمالاً

1. Arcuate nucleus

References

- [1] Acosta-Martinez M, Horton T, Levine JE, Estrogen receptors in neuropeptide Y neurons: at the crossroads of feeding and reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 18 (2007) 48-50.
- [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] Bentley GE, Ubuka T, McGuire NL, Calisi R, Perfito N, Kriegsfeld LJ, Wingfield JC, Tsutsui K, Gonadotrophin-inhibitory hormone: A multifunctional neuropeptide. *J Neuroendocrinol* 21 (2009) 276-281.
- [4] Butler WR, Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 60-61 (2000) 449-457.
- [5] Calisi RM, Rizzo NO, Bentley GE, Seasonal differences in hypothalamic EGR-1 and GnIH expression following capture-handling stress in house sparrows (*Passer domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* 157 (2008) 283-287.
- [6] Clarke IJ, Qi Y, Puspita Sari I, Smith JT, Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Front Neuroendocrinol* 30 (2009) 371-378.
- [7] Clarke IJ, Sari IP, Qi Y, Smith JT, Parkinson HC, Ubuka T, Iqbal J, Li Q, Tilbrook A, Morgan K, Pawson AJ, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE, Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* 149 (2008) 5811-5821.
- [8] Dardente H, Birnie M, Lincoln GA, Hazlerigg DG, RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod. *J Endocrinol* 20 (2008) 1252-1259.
- [9] 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.
- [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] Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, Iijima N, Matsumoto Y, Hosoya M, Fujii R, Watanabe T, Kikuchi K, Terao Y, Yano T, Yamamoto T, Kawamata Y, Habata Y, Asada M, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Tanaka M, Ibata Y, Fujino M, New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol* 2 (2000) 703-708.
- [12] Jafarzade Shirazi MR, Namavar MR, Tamadon A, Expression of gonadotropin inhibitory hormone in the preoptic area and its relation with phases of estrous cycle of ewe. *J Physiol Pharmacol* (2011) in press (In Farsi).
- [13] Jafarzade Shirazi MR, Tamadon A, Intermediary role of kisspeptin in the stimulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estrogen in the preoptic area of sheep brain. *J Physiol Pharmacol* 14 (2010) 41-47 (In Farsi).
- [14] Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS, Rat RFamide Related Peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* 51 (2007) 171-180.
- [15] Kirby ED, Geraghty AC, Ubuka T, Bentley GE, Kaufer D, Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 11324-11329.
- [16] Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R, Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 2410-2415.
- [17] Maeda KI, Tsukamura H, Uchida E, Ohkura N, Ohkura S, Yokoyama A, Changes in the pulsatile secretion of LH after the removal of and subsequent resuckling by pups in ovariectomized lactating rats. *J Endocrinol* 121 (1989) 277-283.
- [18] Maeda KI, Uchida E, Tsukamura H, Ohkura N, Ohkura S, Yokoyama A, Prolactin does not mediate the suppressive effect of the suckling stimulus on

- luteinizing hormone secretion in ovariectomized lactating rats. *Endocrinol Jpn* 37 (1990) 405-411.
- [19] McNeilly AS, Lactational control of reproduction. *Reprod Fertil Dev* 13 (2001) 583-590.
- [20] McNeilly AS: Suckling and the control of gonadotropin secretion; in Neill JD (ed) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. St. Louis, MO, USA, Academic Press, 2006, pp 2511-2551.
- [21] 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.
- [22] Smith MS, The relative contribution of suckling and prolactin to the inhibition of gonadotropin secretion during lactation in the rat. *Biol Reprod* 19 (1978) 77-83.
- [23] Smith MS, Grove KL, Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. *Front Neuroendocrinol* 23 (2002) 225-256.
- [24] Tsukamura H, Maeda KI, Nonmetabolic and metabolic factors causing lactational anestrus: rat models uncovering the neuroendocrine mechanism underlying the suckling-induced changes in the mother. *Prog Brain Res* 133 (2001) 187-205.
- [25] Tsukamura H, Maeda KI, Ohkura S, Uchida E, Yokoyama A, Suppressing effect of the suckling stimulus on the pulsatile luteinizing hormone release is not mediated by prolactin in the rats at mid-lactation. *Jpn J Anim Reprod* 37 (1991) 59-63.
- [26] Tsukamura H, Ohkura S, Coen CW, Maeda KI, The paraventricular nucleus and corticotrophin-releasing hormone are not critical in suppressing pulsatile LH secretion in ovariectomized lactating rats. *J Endocrinol* 137 (1993) 291-297.
- [27] Tsukamura H, Ohkura S, Maeda KI, The endogenous opioids do not mediate the suckling-induced suppression of LH secretion in lactating rats. *J Reprod Dev* 38 (1992) 159-164.
- [28] Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ, A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275 (2000) 661-667.
- [29] Tsutsui K, Saigoh E, Yin H, Ubuka T, Chowdhury VS, Osugi T, Ukena K, Sharp PJ, Wingfield JC, Bentley GE, A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotrophin-inhibitory hormone in birds: discovery, progress and prospects. *J Neuroendocrinol* 21 (2009) 271-275.
- [30] Tsutsui K, Ubuka T, Yin H, Osugi T, Ukena K, Bentley GE, Ciccone N, Inoue K, Chowdhury VS, Sharp PJ, Wingfield JC, Mode of action and functional significance of avian gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): a review. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 305A (2006) 801-806.
- [31] Ubuka T, Morgan K, Pawson AJ, Osugi T, Chowdhury VS, Minakata H, Tsutsui K, Millar RP, Bentley GE, Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *PLoS ONE* 4 (2009) e8400.
- [32] Ubuka T, Ukena K, Sharp PJ, Bentley GE, Tsutsui K, Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail. *Endocrinology* 147 (2006) 1187-1194.
- [33] Yamada S, Uenoyama Y, Kinoshita M, Iwata K, Takase K, Matsui H, Adachi S, Inoue K, Maeda KI, Tsukamura H, Inhibition of metastin (kisspeptin-54)-GPR54 signaling in the arcuate nucleus-median eminence region during lactation in rats. *Endocrinology* 148 (2007) 2226-2232.