

مقاله پژوهشی

تعیین کیسپیتین ماهی سفید دریای خزر و تاثیر آن بر هورمون‌های تولیدمثلی

هانیه ربوطی^۱، سید محسن اصغری^{۲،۳*}، ریحانه سریری^۴، بهروز حیدری^{۵،۶}، سعید بلالایی^۶

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۰

چکیده

ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*) از نظر تجاری و غذایی مهم‌ترین ماهی استخوانی حوضه جنوبی دریای خزر است که برای جلوگیری از انقراض این گونه با ارزش از تولیدمثل القایی برای هم‌زمان‌سازی و افزایش میزان هم‌آوری در شرایط پرورشی استفاده می‌شود. مطالعات پیشین نشان داد که کیسپیتین که یک پروتئین فوق‌محرك در محور غدد ترشح‌کننده هورمون‌های جنسی است، منجر به بلوغ جنسی و گامتوزن می‌شود، اما تاکنون توالی کیسپیتین ۱ و ۲ ماهی سفید مشخص نشده است و متناظرا قابلیت این پپتید از پروتئین (Kiss1) در تولیدمثل مورد بررسی قرار نگرفته است. در مطالعه حاضر توالی کیسپیتین ۱۰ در ماهی سفید به روش CLUSTALW و با طراحی آغازگر از توالی Kiss1 ماهی‌های هم‌خانواده ماهی سفید تعیین شد. برای دستیابی به بهترین غلظت پپتید Kiss1 از غلظت‌های ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم استفاده شد و غلظت α -۱۷ هیدروکسی پروژسترون و β -۱۷ استرادیول پلازما مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که کیسپیتین ۱۰ سنتزی با غلظت بهینه ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم می‌تواند به عنوان گزینه مناسب برای القا تخم‌ریزی در ماهی سفید معرفی شود.

واژگان کلیدی: کیسپیتین، هورمون سنتتیک، ماهی سفید، تولیدمثل.

- ۱- دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
- ۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
- ۳- دانشیار گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- ۴- استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
- ۵- دانشیار گروه علوم دریایی پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
- ۶- استاد گروه شیمی دارویی، مرکز تحقیقات شیمی سنتز، دانشگاه صنعتی خواجه نصیرالدین طوسی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: sm.asghari@ut.ac.ir

مقدمه

بیشترین اثر را با کمترین هزینه تولید کند. در این بین، در مطالعه حاضر، هورمون کیسپتین به دلیل هزینه پایین در سنتز آن و توانایی بالا در القای بلوغ جنسی و تولیدمثل انتخاب شد.

با توجه به این که هورمون‌های محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-غدد جنسی (HPG) نقش مهمی در عملکرد دستگاه تولیدمثل ایفا می‌کنند، بنابراین می‌توانند به عنوان هدف مطالعه در بررسی رسیدگی جنسی در نظر گرفته شوند (Corradi et al., 2016). هورمون‌های محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-غدد جنسی دارای اثرات متقابل هستند و می‌توانند باعث مهار یا افزایش تولید یکدیگر شوند. گنادوتروپین‌های LH و FSH هیپوفیز که در اثر هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) هیپوتالاموس ساخته می‌شوند، اثر تحریکی بر غدد جنسی و اثر مهاری بر هیپوتالاموس دارند. از طرف دیگر هورمون‌های جنسی تولید شده در غدد جنسی اثر مهاری بر هیپوتالاموس و هیپوفیز دارند (Asimakopoulos, 2012). هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) ساخته شده توسط نورون‌های هیپوتالاموس روی سلول‌های گنادوتروپ هیپوفیز اثر می‌گذارد و باعث تولید هورمون‌های گنادوتروپ شامل

ماهی سفید (*Rutilus kutum*) متعلق به خانواده کپورماهیان است که با نام‌هایی چون Kutum در روسیه، Zujag در آذربایجان و آکبالیک Akbalyk در ترکمنستان شناخته می‌شود. هشت گونه از جنس *Rutilus* در اروپا و غرب آسیا وجود دارد که دو گونه آن در ایران با نام‌های *Rutilus rutilus* و *Rutilus frisii* موجود است و گونه *Rutilus kutum* بومی دریای خزر است (Coad and Vilenkin, 2004). گونه ماهی سفید در سواحل شمالی دریای سیاه و دریای آزوف، در شمال غربی ترکیه، بلغارستان، قسمت‌هایی از اروپا و در تمام سواحل دریای خزر بویژه سواحل جنوبی و غربی وجود دارد (Abdurakhmanov, 1962; Kiabi et al., 1999).

به دلیل کاهش چشمگیر ذخایر این گونه با ارزش در دریای خزر دست‌کاری هورمونی در آبی‌پروری تجاری ماهی سفید اهمیت فراوانی پیدا کرده است و به دلیل سیر صعودی افزایش جمعیت نمی‌توان فقط به ماهیانی که کاملاً رسیده‌اند و در مرحله تخم‌ریزی هستند اکتفا کرد. بنابراین از تیمار هورمونی برای تولید تعداد مناسب بچه ماهی روی آورده شده است. در این بین پژوهشگران به دنبال هورمونی هستند که

برای فعال کردن و تراوشات نورون‌های GnRH شناسایی شده است (Shahab et al., 2005). کیسپتین‌ها گروهی از پپتیدها هستند که تولید و ترشح GnRH را در هیپوتالاموس مغز تحریک می‌کنند و برای بلوغ و نگه داشتن تولیدمثل در حد طبیعی مورد نیاز هستند. در سال ۱۹۹۶، Lee و همکاران زن جدیدی را کشف کردند که مسئول سرکوب سلول‌های سرطانی در سرطان سینه است. پپتید تولید شده از روی این زن برای بار اول متاستین نامیده شد که بعداً کیسپتین نام گرفت (Lee et al., 1996). سه سال بعد طبق مطالعاتی که روی موش‌ها صورت گرفت، یک گیرنده جفت شده با G پروتئین جدید شناسایی شد و GPR54 نام گرفت (Lee et al., 1999). سه سال بعد، سه مورد از مطالعات صورت گرفته به این نتیجه رسیدند که کیسپتین ۵۴ مسئول فعال‌سازی GPR54 است (Kotani et al., 2001; Muir et al., 2001; Ohtaki et al., 2001) و به دنبال آن GPR54 با عنوان گیرنده کیسپتین شناسایی شد. با این که کیسپتین و گیرنده آن به عنوان سرکوب کننده سرطان شناسایی شده بودند، یک سری از مطالعات روی انسان و موش نشان داد که جهش غیرفعال کننده در گیرنده کیسپتین باعث بروز سندرومی می‌شود که در Freeman, 1994; LH و FSH می‌شود (Freeman, 1994; Simerly, 1998). وجود این هورمون‌ها برای ورود به دوره بلوغ جنسی در نرها و ماده‌ها لازم و ضروری است (Clarke and Cummins, 1982). علاوه بر این، ترشح هورمون‌های استروئیدی جنسی (تستوسترون در نرها و استروژن و پروژسترون در ماده‌ها) تحت تاثیر همین هورمون‌های گنادوتروپین صورت می‌گیرد (Goodman and Inskeep, 2006).

تاکنون علاوه بر هورمون‌های جنسی، ترکیبات دیگری مانند نوروپپتیدها، سیگنال‌های متابولیکی و محیطی شناسایی شده‌اند که قادر به تغییر عملکرد محور HPG هستند (Apter et al., 1993; Ojeda et al., 2006; Walker et al., 2010). یکی از مهم‌ترین شبکه‌های نورونی که در اوایل قرن حاضر شناسایی شده است و نقش کلیدی در ترشح GnRH، عملکرد HPG و فعالیت‌های تولیدمثلی دارد، سیستم کیسپتین است. شبکه نورونی کیسپتین با یکی‌سازی سیگنال‌های محیطی و مرکزی مانند سیگنال‌های دوره نوری و هورمون لپتین ترشح شده از بافت چربی، سیگنال‌های هورمون‌های جنسی، به عنوان تنظیم کننده اصلی و کلیدی

2010). از این رو، اثرات کیسپیتین ۱ و ۲ خالص شده از خود ماهی سفید دریای خزر که موجب تحریک آزادسازی GnRH شود، می‌تواند بر روی شاخص‌های تولیدمثلی از جمله تخم‌گذاری و تولید تخم در ماهی سفید دریای خزر اثرات بهینه داشته باشد.

مطالعات پیشین نشان داد که پروتئین کیسپیتین منجر به بلوغ جنسی و گامتوزن می‌شود، اما تاکنون در مورد قابلیت قطعه متناظر با ۱۰ آمینو اسید انتهای کیسپیتین ۱ ماهی سفید مطالعه‌ای صورت نگرفته است. در این مطالعه، ابتدا ژن‌های Kiss1 و Kiss2 ماهی سفید دریای خزر تعیین توالی شدند و به دنبال آن پپتید ۱۰ آمینو اسیدی متناظر با انتهای پروتئین Kiss1 سنتز و خالص‌سازی شد. در مرحله بعد فعالیت زیستی این پپتید بر روی مدل آزمایشگاهی ماهی سفید دریای خزر مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به این که هورمون پروژسترون در رسیدگی نهایی و استرادیول در زرده‌سازی نقش دارد، با بررسی غلظت‌های مختلف از پپتید مورد نظر سطح پلاسمایی هورمون‌های β -۱۷ استرادیول و α -۱۷ هیدروکسی پروژسترون مورد مطالعه قرار گرفت.

آن بلوغ به تاخیر می‌افتد یا جاندار به بلوغ نمی‌رسد و ترشح هورمون آزاد کننده گنادوتروپین و گنادوتروپین‌ها سرکوب می‌شود. در نتیجه، سیستم کیسپیتین و گیرنده آن به عنوان تنظیم کننده اصلی محور HPG شناسایی شد (De Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). بنابراین می‌توان گفت لازمه بلوغ و نگهداری تولیدمثل در حد طبیعی، ترشح GnRH در هیپوتالاموس تحت تاثیر کیسپیتین‌ها است.

مطالعات صورت گرفته روی مغز ماهیان استخوانی ثابت کرده است که چندین شکل از کیسپیتین (Kiss1, Kiss2) در آنها وجود دارد. نورون‌هایی که کیسپیتین را بیان می‌کنند سلول‌های هدف اصلی برای بازخورد مثبت و منفی هورمون‌های استروئیدی جنسی هستند (Kotani et al., 2001). تزریق کیسپیتین در بسیاری از مهره‌داران مانند انسان صورت گرفته است که باعث افزایش غلظت گنادوتروپین‌های LH و FSH شده است (Gottsch et al., 2004). توالی ژن Kiss1 و Kiss2 شبیه هم نیست، ولی با کیسپیتین ۱۰ که کوچک‌ترین کیسپیتین شناخته شده است ۶۰ تا ۸۰ درصد تشابه توالی آمینو اسیدی دارند (Mitani et al.,

مواد و روش‌ها

تاییدیه اخلاقی

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

ماهی

تعداد ۱۴۴ قطعه مولد ماده ماهی سفید (*Rutilus kutum*) در فصل مهاجرت تولیدمثلی از رودخانه سفیدرود تهیه و برای تیمار بندی به مرکز تکثیر شهید انصاری رشت منتقل شد. مولدین پس از ۲ هفته سازگاری با شرایط جدید در استخرهای ۱۵ متری با عمق ۲ متر، به تعداد ۲۰ قطعه در هر استخر معرفی شدند. شرایط فیزیکی شیمیایی آب در حد اپتیمم گونه کنترل شد (دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد و اکسیژن‌دهی به مقدار $8/4 \pm 0/1$ میلی‌گرم در لیتر، نیتريت $0/12 \pm 0/01$ میلی‌گرم در لیتر، سختی کل $186/6 \pm 15/1$ میلی‌گرم در لیتر و pH $8/2 \pm 0/3$). بافت‌های کبد ۴ ماهی برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت.

تعداد ۵ تیمار جداگانه برای بررسی اثر ۵ غلظت از پپتید به دست آمده از ژن Kiss1 تهیه شد که در هر تیمار ۲۰ قطعه ماهی مولد قرار داشت (مجموع ماهی‌های ۵ تیمار گروه Kiss1،

۱۰۰ قطعه بود). از این ۲۰ قطعه ۱۰ قطعه برای سنجش هورمون α -۱۷ هیدروکسی پروژسترون و ۱۰ قطعه نیز برای سنجش هورمون β -۱۷ استرادیول در نظر گرفته شده است. از تزریق پروپیلن گلایکول به همراه دامپریدون به عنوان شاهد مثبت استفاده شد و به گروه شاهد منفی هیچ تزریقی انجام نشد. در هر دو گروه ۲۰ قطعه ماهی مولد قرار داده شد.

استخراج DNA از کبد

بافت‌های کبد پس از بیهوش کردن ماهی با پودر گل میخک (۳۰ میلی‌گرم در لیتر)، جداسازی و تا زمان استخراج DNA در اتانول ۹۶ درصد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های کبد با استفاده از کیت استخراج GPP Solution (شرکت ژن پژوهان، ایران) و بر اساس دستور العمل ارائه شده توسط شرکت سازنده انجام شد. به این ترتیب که ابتدا ۱ میلی‌لیتر از محلول GPP Solution در یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری ریخته شد و به آن نمونه کبد اضافه شد. میکروتیوب به مدت ۱۰-۵ ثانیه ورتکس شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموستات که از قبل در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود، قرار داده شد. به ترتیب ۳۵۰ میکرولیتر کلروفرم و ۳۵۰

۱۲۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و محلول رویی به آرامی خالی شد. پس از این مراحل میکروتیوب به صورت واژگون و در باز به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا الکل آن تبخیر شود. سپس مقدار ۱۵۰-۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به میکروتیوب اضافه شد و میکروتیوب به مدت نیم ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا DNA در آب حل شود. پس از این مرحله محلول DNA آماده استفاده در آزمایش‌های مولکولی شد.

ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده

برای ارزیابی کیفیت استخراج DNA (الکتروفورز شده روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز (الکتروفورز افقی) شد. برای تهیه ۵۰ میلی‌لیتر ژل آگارز ۱ درصد، ۰/۵ گرم پودر آگارز به همراه ۵۰ میلی‌لیتر بافر TBE IX در یک بشر ریخته شد و بر روی هیتر حرارت داده شد تا پودر آگارز درون بافر حل شود. پس از این که محلول شفاف مشاهده شد، بشر از روی حرارت برداشته شده و در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا کمی خنک شود. به محلول مورد نظر ۵۰ میکرولیتر اتیدیوم بروماید اضافه و به خوبی مخلوط شد، سپس به درون سینی ژل ریخته شد تا ببندد.

میکرولیتر محلول کلرید سدیم ۵ مولار به میکروتیوب اضافه شد و سپس میکروتیوب به شدت حدود ۲۰ مرتبه با دست تکان داده شد. پس از آن، میکروتیوب با دور ۵۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (Scan Speed 1730R، Labogene، دانمارک) شد. پس از پایان سانتریفوژ، سه فاز تشکیل شد: قسمت بالایی میکروتیوب فاز آبی شامل DNA سلولی بود و قسمت زیرین میکروتیوب فاز آلی وجود داشت. بین این دو لایه یک خط سفید جدا کننده وجود داشت که پروتئین‌های دناتوره شده بودند. حدود ۸۰۰-۱۰۰۰ میکرولیتر از فاز آبی یا بالایی برداشته شد و به میکروتیوب دیگری منتقل شد. ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول سرد ۱۰۰ درصد به میکروتیوب جدید اضافه و به آرامی تکان داده شد تا کلاف DNA کریستالی تشکیل شود (در این مرحله ممکن است به علت اینکه مدتی از تهیه نمونه کبد گذشته باشد و کبد تازه نباشد کلاف DNA تشکیل نشود). میکروتیوب با دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و محلول رویی به آرامی خالی شد. پس از افزودن ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد، میکروتیوب حدود ۲۰ مرتبه تکان داده شد. سپس میکروتیوب با دور

حفاظت شده در این ژن شناسایی و آغازگرهای رو به جلو (Forward) و معکوس (Reverse) بر اساس تطبیق توالی‌ها و با استفاده از نرم‌افزار Genrunner طراحی شدند. طول محصول ژن مورد مطالعه Kiss1 برابر با ۱۹۲ باز در ۲۳۶۰ بررسی و برای Kiss2 برابر با ۱۵۵ باز در ۱۸۷۷ بررسی بود (Lorenz, 2012).

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

پس از حصول اطمینان از کیفیت خوب DNA استخراج شده، برای تکثیر قطعه‌ای از DNA که مربوط به پپتید ۵۴ آمینواسیدی ژن Kiss1 و Kiss2 است از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شد، به نحوی که با استفاده از کیت Master Mix (ایراژن، ایران) و دمای اتصال بر اساس دمای بهینه (Tm) آغازگرها انتخاب شد. دمای اتصال برای تکثیر ژن کیسپتین به صورت گرادیان و بین ۶۰-۵۰ و زمان گسترش نهایی ۱۰ دقیقه انتخاب شد (Lorenz, 2012).

پس از انجام PCR، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. ۰/۱۸ گرم پودر آگارز به ۱/۸ میلی‌لیتر بافر TBE 10X اضافه شد و با گرم کردن آن محلول شفاف‌ی به دست آمد. پس از سرد شدن محلول آگارز و قبل از بسته شدن

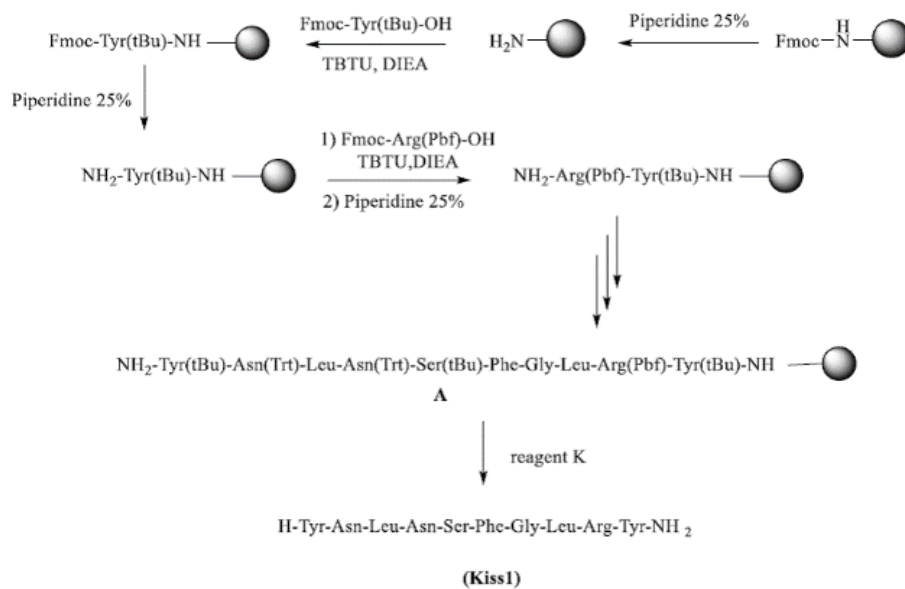
پس از بسته شدن ژل، شانه به آهستگی برداشته شد و چسب‌های اطراف سینی باز شد. سپس سینی محتوی ژل درون تانک الکتروفورز قرار داده شد و مقداری بافر TBE1X درون تانک ریخته شد به طوری که بافر حدود ۱ میلی‌لیتر بالای ژل را بپوشاند. در این مرحله ۵-۳ میکرولیتر از DNA ژنومی با ۱ میکرو لیتر بافر سنگین کننده مخلوط و با دقت درون چاهک‌های ژل تزریق شد. بعد از گذشت ۳۰-۲۰ دقیقه، دستگاه مولد برق خاموش شد و ژل به دستگاه Gel Doc منتقل شد. سپس با کمک پرتو UV از ژل عکس‌برداری و کیفیت DNA استخراج شده ارزیابی شد (Lee, et al., 2012).

تعیین توالی پپتید

به منظور تعیین توالی Kiss1 و Kiss2 ماهی سفید از ماهی‌های هم خانواده آن شامل *Cyprinus carpio*, *Danio rerio*, *Labeo*, *Catla catla*, *Carassius auratus*, *Tribolodon brandtii*, *rohita*, *Gobiocypris* و *Sinocyclocheilus tingi* *rarus* استفاده شد. از طریق جستجو در بانک‌های اطلاعاتی EMBL/GenBank و SwissProt توالی Kiss1 و Kiss2 این ماهی‌ها به دست آمد. سپس از طریق Clustalw نواحی

محلول اتیدیوم برماید به حجم نهایی ۱۸ میکرولیتر به آن اضافه شد و برای مخزن نیز ۵۰ میکرولیتر از بافر TBE 10X با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسید و بافر TBE 1X تهیه شد. الکتروفورز به صورت Submarine انجام شد. برای تهیه بافر TBE 10X ۱۰/۸ گرم Tris، ۵/۵ گرم بوریک اسید و ۰/۹۲ گرم EDTA وزن و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد (Lee, et al., 2012).

سنتز پپتید Kiss1 با استفاده از شیمی سنتز پپتید فاز جامد Fmoc استاندارد، سنتز شد و با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا فاز معکوس (RP-HPLC) تا خلوص ۹۲ درصد، به دست آمد (شکل ۱). ساختارهای شیمیایی توسط آنالیز طیف سنجی جرمی یونیزاسیون الکترو اسپری (ESI-MS) تایید شد (Sewald and Jakubke, 2002).



شکل ۱: مسیر سنتز پپتید Kiss1 ماهی سفید

تعیین غلظت بهینه پیتید

به منظور تعیین غلظت بهینه از ۲۱ مولد ماده در ۷ تیمار استفاده شد. چهار تیمار پیتید Kiss1 با غلظت‌های ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم وزن ماهی به همراه دامپریدون (با نسبت ۱ درصد دامپریدون، ۰/۱ درصد پیتید و < ۹۵ درصد پروپیلن گلیکول)، یک تیمار Kiss1 با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم بدون دامپریدون و دو تیمار نیز برای شاهد مثبت (دامپریدون و پروپیلن گلیکول) و شاهد منفی (بدون تزریق) تهیه شد که در هر تیمار ماده مورد نظر به ۳ ماهی تزریق شد (به جز شاهد منفی). خون‌گیری از مولدین ۶ ساعت بعد از تزریق صورت گرفت. برای این کار با استفاده از سرنگ‌های ۲ میلی‌لیتری هیپارینه از سیاهرگ باله مخرجی خون‌گیری شد. نمونه‌های خون در دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد تا پلاسما از سلول‌های خونی جدا شود. نمونه‌های پلاسما تا زمان بررسی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اثر تزریق پیتید Kiss1 بر هورمون‌های ۱۷- β استرادیول و ۱۷- α هیدروکسی پروژسترون بررسی شد. برای این منظور طبق پروتکل، ۲۵ میکرولیتر از نمونه و ۵۰ میلی‌لیتر از معرف

استرادیول بیوتین به چاهک‌ها اضافه شد و پس از تکان دادن به مدت ۳۰ ثانیه، چاهک‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از آن ۵۰ میکرولیتر از معرف آنزیم استرادیول به داخل هر چاهک پیبت شد. پس از تکان دادن به مدت ۳۰ ثانیه، چاهک‌ها به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس بافر شستشو (۳۵۰ میکرولیتر) و ۱۰۰ میکرولیتر محلول بستر به ترتیب به تمام چاهک‌ها اضافه شد. چاهک‌ها دوباره در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند. در مرحله بعد محلول توقف (۵۰ میکرولیتر) اضافه شد. در نهایت چاهک‌ها به آرامی مخلوط شدند و در طول موج ۴۵۰ نانومتر جذب توسط ELISA Reader (ELx800, BioTek, آلمان) خوانده شد. ۱۷- α هیدروکسی پروژسترون نیز بر اساس پروتکل کیت ELISA Monobind (Monobind, آمریکا) اندازه‌گیری شد (Nash et al., 2000; Rodriguez et al., 2000; Rodriguez et al., 2001; Niida et al., 2006; Moles et al., 2008; Moles et al., 2012; Al-Khalafah et al., 2020)

تجزیه و تحلیل آماری

نرم‌افزار Prism 8.2.0 مخصوص ویندوز برای نمودارسازی مورد استفاده قرار گرفت.

موقعیت دقیق پپتید ۱۰ آمینواسیدی در ژن Kiss1 و Kiss2 ماهی سفید مشخص شد (شکل‌های ۲ و ۳). بر اساس موقعیت Kiss1 و Kiss2 در ژنوم ماهی آغازگرهای رو به جلو و معکوس طراحی شدند (جدول ۱).

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای طراحی شده انجام شد (شکل ۴) و باندهای به دست آمده تعیین توالی شدند (جدول ۲). بر اساس توالی به دست آمده، پپتید Kiss1 سنتز شد (شکل ۵).

داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) (GraphPad Software, La Jolla, CA,) در سطح اطمینان (www.graphpad.com) ۹۵ درصد ($P < 0.05$) مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها در متن به صورت میانگین \pm خطای استاندارد ارائه شده‌اند.

نتایج

تعیین توالی پپتید

مقایسه توالی‌های Kiss1 و Kiss2 که با استفاده از روش Clustalw صورت گرفت و

```

Catla          AGGCCTTAC--ACAAAAAGAAGGCAGAATGTTGCATACTATAATCTCAATTCCTTTGGCC
Labeo          AGGCCTTAC--ACGAAAAGAAGGCAGAATGTTGCATACTACAATCTCAATTCCTTTGGCC
Sinocyclocheilus AGGCCTTAC--TCAAAAAGGAGGCAGAATGTTGCGTACTACAATCTCAATTCCTTCGGCC
Tribolodon    ---CCTTAC--ACAAATAGAAGGCAGCGTGTTCATACTACAACCTCAATTCCTTCGGTC
Gobiocypris   AGGCCTTAC--ACAAAGAGAAGGCATAATGTTGCTTACTACAACCTCAATTCCTTCGGTT
Cyprinus      AGGCCTTAC--ACAAAAAGGAAGCAGAATGTTGCGTACTACAATCTCAATTCCTTCGGCC
Carassius     AAACCTTAC--ACAAAAAGGAAGCAAAAGGTTGCATACTACAATCTCAATTCCTTCGGCC
Danio         AGTCCTTAC--ACCAAGAGGAGACAGAATGTAGCTTACTACAATCTCAACTCCTTCGGCC
metastin      GCGCGGTGCTGCTGCAGCGGGAAGGACCTGCCGAAC TACAAC TGAACCTCCTTCGGCC
kiss10        -----TACAAC TGAACCTCCTTCGGCC
                ** **  ** ***** **

Catla          TCCGCTATGGGAAGAGAGAGCAGAACATGCTTGCAGAGT-----
Labeo          TCCGCTATGGGAAGAGAGAACAAGAATGCTTGCAGGGTTTAAACAGCACATACCTGTAA
Sinocyclocheilus TCCGCTATGGGAAGAGAGAACAAGAATGCTTGCAGGGTTTAAACAGAAGATTCTATAA
Tribolodon    TCCGCTATGGGAAGAGAGAACAAGAATGCTTGCAGG-----
Gobiocypris   TCCGCTACGGGAAGAGAGAACAAGAATGCGTGCAGGATTTAAACAGAAGATACCTGTAA
Cyprinus      TCCGTTATGGAAAGAGAGAGCAGAACATGCTTGCAGAGTTTAAACAGAAGATAGCCATAA
Carassius     TCCGCTATGGAAAAAAGCAAAACATGCTTGTGAGTTTAAACAAAAAATACCTATGA
Danio         TCCGCTATGGCAAGAGAGAACAAGGACATGCTCACACGATTGAAACAGAAAAGTCTGTAA
metastin      TGCGCTTC-----
kiss10        TGCGCTTC-----
                * ** *

```

شکل ۲: مقایسه توالی ژنومی Kiss1 mRNA در گونه‌های مختلف و Kiss10 انسانی

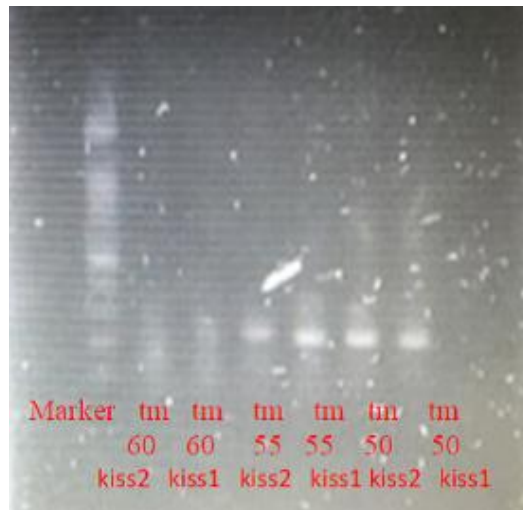
```

Tribolodon      TCGATTAACACGTAGTAAAT TAACTACAATCCGTT-----
Gobiocypris     TCGATTAACACGCAGTAAAT TCAACTACAATCCGTTTGGGCTGCGTTTTGGGAAGCGAGA
Sinocyclocheilus TCGATTAACACGCAGTAAAT TCAACTACAACCCGTTTGGGCTACGCTTTGGGAAGCGAAA
Catla           TCGATTAACACGCAGTAAAT TCAACTACAATCCGTTTGGGCTGCGCTTTGGGAAGCGAAA
Labeo          TCGATTAACACGCAGTAAAT TCAACTACAACCCGTTTGGGCTGCGCTTTGGGAAGCGAAA
Carassius      TCGATTACCACGCAGTAAAT TCAACTACAACCCGTTTGGGCTGCGCTTTGGGAAGCGAAA
Danio          TCGACTAGCACGCAGTAAAT TCAACTACAATCCGTTTGGGCTGCGATTGGGAAAGAGAAA
Cyprinus       TCGATTAACACGCAGTAAAT TCAACTACAACCCGTTTGGGCTGCGCTTTGGGAAGCGAAA
metastin       GAGAAGGACCTGCCG-AACTACAATGGAACCTCCTTCGGCCTGCGCTTC-----
kiss10        -----TACAACCTGGAACCTCCTTCGGCCTGCGCTTC-----
                *   *   *   *   *
    
```

شکل ۳: مقایسه توالی ژنومی Kiss2 mRNA در گونه‌های مختلف و Kiss10 انسانی

جدول ۱: توالی آغازگرهای رو به جلو و معکوس ژن‌های Kiss1 و Kiss2

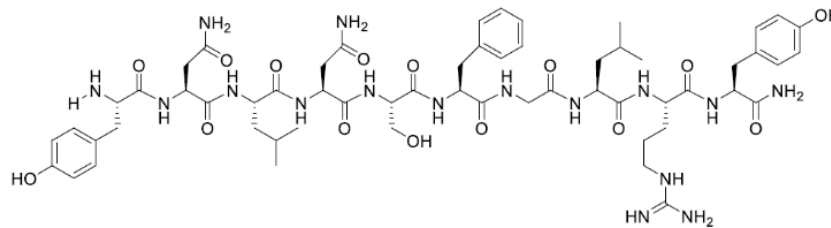
نام آغازگر	توالی آغازگرها از ۵' به ۳'	دمای بهینه (C°)	طول (bp)	%GC
رو به جلو Kiss1	GGAAACATCACTCCGGGTCCTCAG	۵۳/۲	۲۴	۵۸/۳
معکوس Kiss1	TGAGCATGTCCTGTTCTCTCTTGCC	۵۲/۴	۲۵	۵۲
رو به جلو Kiss2	GCAGCAGTATCTCTCAATGGAGCG	۵۰/۹	۲۴	۵۴/۲
معکوس Kiss2	TTTCGCTTCCCAAAGCGCAG	۵۱/۳	۲۰	۵۵



شکل ۴: عکس از ژل آگارز پروتئین‌های Kiss1 و Kiss2 ماهی سفید

جدول ۲: مقایسه توالی Kiss1 و Kiss2 ماهی سفید و Kiss10 انسانی

نام پپتید ها	توالی آمینواسیدی
Human Kiss10	YNWNSFGLRF
<i>R. kutum</i> Kiss1	YNLNSFGLRY
<i>R. Kutum</i> Kiss2	FNYNPFGLRF

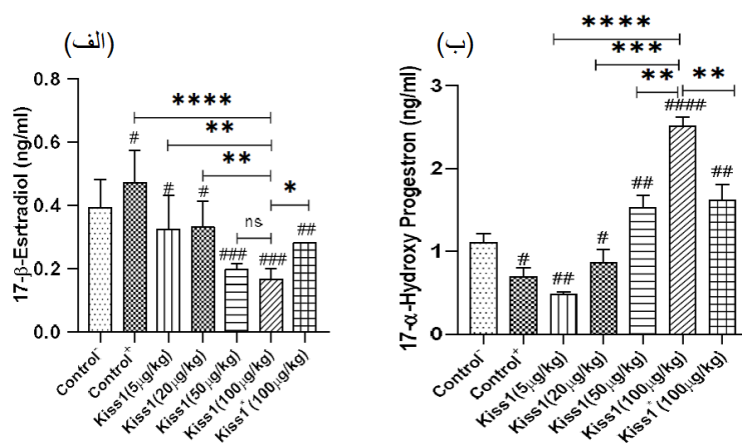


شکل ۵: ساختار پپتید Kiss1 ماهی سفید

تعیین غلظت بهینه

اثر پپتید Kiss1 سنتزی در غلظت‌های ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم وزن ماهی بررسی شد. نتایج نشان داد که پپتید Kiss1 در

غلظت ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم باعث افزایش غلظت α -17 هیدروکسی پروژسترون شد (شکل ۶). این در حالی است که پپتید در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم در عدم حضور دامپریدون فعالیت کمتری نشان داد.



شکل ۶: تاثیر غلظت‌های مختلف پپتید Kiss1 (۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم به همراه دامپریدون و ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم بدون دامپریدون) بر میزان هورمون‌های α -17 هیدروکسی پروژسترون و 17-

β استرادیول ۶ ساعت بعد از تزریق. به منظور تعیین غلظت بهینه پیتید از غلظت‌های استفاده شد. الف) هورمون β -۱۷ استرادیول. ب) هورمون α -۱۷ هیدروکسی پروژسترون. غلظت ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم بیشترین میزان تاثیر را در افزایش هورمون α -۱۷ هیدروکسی پروژسترون داشت. $Kiss1^*$: تیمار فاقد دامپریدون؛ $Control^+$: شاهد مثبت (تزریق دامپریدون و پروپیلن گلایکول بدون حضور پیتید)؛ $Control^-$: شاهد منفی (بدون تزریق)؛ علامت «#» نشان دهنده تفاوت معنادار بین گروه تیمار شده و کنترل منفی است. # $P<0/05$; ## $P<0/01$; ### $P<0/001$; #### $P<0/0001$; ns: بدون اختلاف معنی‌دار.

۲۰۰۰). در سال ۱۹۹۸ تعداد گونه در حال

انقراض *Ompok bimaculatus* به کمک هورمون اوپرایم افزایش یافت (Saridhar et al., 1998). مطالعه‌ای دیگر نشان داد که عصاره هیپوفیز کپور، تخم‌ریزی را در گربه‌ماهی آسیایی (*Clarias batrachus*) افزایش می‌دهد (Zonneveld et al., 1988). Heyrati و همکارانش (۲۰۰۶) نشان دادند که در ماهی سفید لازمه القای تخم‌ریزی توسط هورمون GnRHa حضور آنتاگونیست دوپامین است.

مطالعات گذشته نشان داد که در ماهی گورخری (*Danio rerio*) $Kiss1$ محرک اولیه رشد عصبی GnRH3 در جنین و فعال کننده تحریک فعالیت‌های نورون هیپوفیزیوتروپیک در بالغ است (Zhao et al., 2014). از طرفی Faheem و همکارانش (۲۰۱۹) نشان دادند که قرار گرفتن ماهی‌های *Catla catla* در معرض بایفنول A (BPA) می‌تواند سازماندهی مسیرهای سیگنالینگ کیسپتین را مختل کند.

بحث

مطالعات صورت گرفته روی مغز ماهیان استخوانی ثابت کرده است که چندین شکل از کیسپتین ($Kiss1$, $Kiss2$) در آن وجود دارد. مطالعات گذشته نشان داد $Kiss1$ میزان ترشح گنادوتروپین را در ماهی قرمز (*Carassius auratus*) افزایش داد، در حالی که $Kiss2$ بروی آن بی‌اثر بود (Li et al., 2009). طبق مطالعه‌ای بر ماهی مورل خالدار (*Channa striatus*) تاثیر هورمون‌های غیرسنتتیک مانند عصاره هیپوفیز و گنادوتروپین کوریونیک انسانی و هورمون‌های سنتتیک مانند LHRHa نشان داد که بالاترین قطر تخمک در تیمار اوپرایم و کمترین قطر در تیمار LHRHa مشاهده شد. از طرفی در ماهی مورل خالدار تزریق شده با هیپوفیز، درصد لقاح کمترین مقدار (۶۸-۶۰ درصد) را در مقایسه با تیمارهای دیگر داشت. در حالی که در تیمار اوپرایم نتایج بهتری (۹۸-۹۵ درصد) مشاهده شد (Haniffa et al.,

ماهیان، هورمون β -۱۷ استرادیول است که با به پایان رسیدن فرآیند زرده‌سازی، پیش‌ساز پروگنولون به هورمون پروژسترون تبدیل می‌شود و مقدار آن کاهش می‌یابد. عامل القای رسیدگی نهایی در ماهی هورمون پروژسترون است که بر سلول‌های فولیکولی تخمدان اثر می‌گذارد (Poortenaar et al., 2001; Mylonas et al., 2010; Akhondian et al., 2015).

بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر سطح پلاسمایی هورمون‌های استروئیدی، Kiss10 سنتزی متناظر با انتهای Kiss1 ماهی سفید با غلظت بهینه ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم می‌تواند انتخاب مناسبی برای القای بلوغ جنسی در این ماهی باشد.

این اختلال عصبی غدد درون‌ریز ممکن است باعث ناهنجاری‌های تولیدمثلی شود (Faheem et al., 2019). بر همین اساس در مطالعه حاضر به تعیین توالی، سنتز و خالص‌سازی Kiss1 و Kiss2 ماهی سفید پرداخته شد تا اثر پپتید Kiss10 متناظر با توالی Kiss1 ماهی سفید بر القای بلوغ جنسی بررسی شود.

طبق نتایج مطالعه حاضر، بهترین غلظت بهینه پپتید با توجه به غلظت پلاسمایی هورمون‌های α -۱۷ هیدروکسی پروژسترون و β -۱۷ استرادیول، ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم به دست آمد که در این غلظت هورمون α -۱۷ هیدروکسی پروژسترون به بیشترین مقدار و β -۱۷ استرادیول به کمترین مقدار در مقایسه با غلظت‌های دیگر رسید. عامل زرده‌سازی در

منابع

- Abdurakhmanov Y.A. 1962.** Fish of freshwater bodies of Azerbaijan. Academy of Sciences of Azerbaijan SSR, USSR. P: 89–96.
- Akhondian M., Savari A., Salamat N., Movahdynya A.A. and Salari M.A. 2015.** Changes in plasma level of steroid hormones (estradiol 17β , $17\alpha20\beta$ hydroxy progesteron and cortisol) and electrolytes, during different stages of reproductive cycle in *Rutilus rutilus caspicus* from Bandar Torkaman (South of Caspian Sea). *Oceanography*, 6(21): 117–126.
- Al-Khalaifah H.S., Amer S.A., Al-Sadek D.M.M., Khalil A.A., Zaki E.M. and El-Araby D.A. 2020.** Optimizing the growth, health, reproductive performance, and gonadal histology of broodstock fantail goldfish (*Carassius auratus*, L.) by dietary cacao bean meal. *Animals (Basel)*, 10(10): 1–22 (1808).
- Apter D., Butzow T.L., Laughlin G.A. and Yen S.S. 1993.** Gonadotropin- releasing hormone pulse generator activity during pubertal transition in girls: Pulsatile and diurnal patterns of circulating gonadotropins. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 76: 940–949.
- Asimakopoulos B. 2012.** Hypothalamus-pituitary-gonadal axis: It is time for revision. *Human Genetics and Embryology*, 2: 1–3.
- Clarke I.J. and Cummins J.T. 1982.** The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*, 111: 1737–1739.
- Coad B.W. and Vilenkin B.Y. 2004.** Co-occurrence and zoogeography of the freshwater fishes of Iran. *Zoology in the Middle East*, 31: 53–61.
- Corradi P.F., Corradi R.B. and Greene L.W. 2016.** Physiology of the hypothalamic pituitary gonadal axis in the male. *Urologic Clinics of North America*, 43: 151–162.
- De Roux N., Genin E., Carel J.C., Matsuda F., Chaussain J.L. and Milgrom E. 2003.** Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS₁-derived peptide receptor GPR₅₄. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 10972–10976.
- Faheem M., Jahan N., Khaliq S. and Lone K.P. 2019.** Modulation of brain kisspeptin expression after bisphenol-A exposure in a teleost fish, *Catla catla*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(1): 33–42.

- Freeman M.E. 1994.** The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. P: 613–658. In: Knobil E. and Neill J.D. (Eds.). The Physiology of Reproduction. Raven Press Ltd, USA.
- Goodman R.L. 1994.** Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. P: 659–710. In: Knobil E., Neill J.D. (Eds.). The Physiology of Reproduction. Raven Press Ltd, USA.
- Goodman R.L. and Inskoop E.K. 2006.** Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep. 2247–2389. In: Neill J.D. (Ed.). Physiology of Reproduction. Academic Press, USA.
- Gottsch M.L., Cunningham M.J., Smith J.T., Popa S.M., Acohido B.V., Crowley W.F., Seminara S., Clifton D.K. and Steiner R.A. 2004.** A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 145(9): 4073–4077.
- Haniffa M.A., Merlin T. and Shaik Mohamed J. 2000.** Induced spawning of the striped murrel *Channa striatus* using pituitary extracts, human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone releasing hormone analogue, and ovaprim. *Acta Ichthyologica et Piscatorial*, 30(1): 53–60.
- Heyrati F.P., Mostafavi H., Toloei H. and Dorafshan S. 2006.** Induced spawning of kutum, *Rutilus frisii kutum* using (D-Ala6, Pro9-NEt) GnRH α combined with domperidone. *Aquaculture*, 265: 288–293.
- Kiabi B.H., Abdoli A. and Naderi M. 1999.** Status of fish fauna in the south Caspian basin of Iran. *Zoology in the Middle East*, 18: 57–65.
- Kotani M., Detheux M., Van Den Bogaerde A., Communi D., Van Der Winden J.M., Le P.E., Brezillon S., Tyldesley R., Suarez-Huerta N., Vandeput F., Blanpain C., Schiffmann S.N., Vassart G. and Parmentier M. 2001.** The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37): 34631–34636.
- Lee J.H., Miele M.E., Hicks D.J., Phillips K.K., Trent J.M., Weissman B.E. and Welch D.R. 1996.** KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*, 88 (23): 1731–1737.
- Lee D.K., Nguyen T., O'Neill G.P., Cheng R., Liu Y., Howard A.D., Coulombe N., Tan C.P., Tang-Nguyen A.T., George S.R. and O'Dowd B.F. 1999.** Discovery of a receptor related to the galanin

- receptors. Federation of European Biochemical Societies letters, 446(1): 103–107.
- Lee P.Y., Costumbrado J., Hsu C.Y. and Kim Y.H. 2012.** Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. Journal of Visualized Experiments, 62: 1–5 (3923).
- Li S., Zhang Y., Liu Y., Huang X., Huang W., Lu D., Zhu P., Shi Y., Cheng C.H. and Liu X. 2009.** Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (*Carassius auratus*). Journal of Endocrinology, 201: 407–418.
- Lorenz T.C. 2012.** Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. Journal of Visualized Experiments, 63: 1–15 (e3998).
- Mitani Y., Kanda S., Akazome Y., Zempo B. and Oka Y. 2010.** Hypothalamic Kiss1 but not Kiss2 neurons are involved in estrogen feedback in medaka (*Oryzias latipes*). Endocrinology, 151(4): 1751–1759.
- Moles G., Gomez A., Carrillo M. and Zanuy S. 2012.** Development of a homologous enzyme linked immunosorbent assay for European sea bass FSH. Reproductive cycle plasma levels in both sexes and in yearling precocious and non-precocious males. General and Comparative Endocrinology, 176(1): 70–78.
- Moles G., Gomez A., Rocha A., Carrillo M. and Zanuy S. 2008.** Purification and characterization of follicle-stimulating hormone from pituitary glands of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). General and Comparative Endocrinology, 158: 68–76.
- Muir A.I., Chamberlain L., Elshourbagy N.A., Michalovich D., Moore D.J., Calamari A., Szekeres P.G., Sarau H.M., Chambers J.K., Murdock P., Steplewski K., Shabon U., Miller J.E., Middleton S.E., Darker J.G., Larminie C.G.C., Wilson S., Bergsma D.J., Emson P., Faull R., Philpott K.L. and Harrison D.C. 2001.** AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. Journal of Biological Chemistry, 276: 28969–28975.
- Mylonas C.C., Fostier A. and Zanuy S. 2010.** Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General and Comparative Endocrinology, 165(3): 516–534.
- Nash J.P., Cuisset-Davail B., Bhattacharyya S., Suter H.C., Menn F. and Kime D.E. 2000.** An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for testosterone, estradiol, and 17, 20- dihydroxy-4-pregnen-3-one using acetylcholinesterase as tracer:

- Application to measurement of diel patterns in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 22: 355–363.
- Niida A., Wang Z., Tomita K., Oishi S., Tamamura H., Otaka A., Navenot J.M., Broach J.R., Peiper S.C. and Fujii N. 2006.** Design and synthesis of downsized metastin (45-54) analogs with maintenance of high KISS1RA agonistic activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16(1): 134–137.
- Ohtaki T., Shintani Y., Honda S., Matsumoto H., Hori A., Kanehashi K., Terao Y., Kumano S., Takatsu Y., Masuda Y., Ishibashi Y., Watanabe T., Asada M., Yamada T., Suenaga M., Kitada C., Usuki S., Kurokawa T., Onda H., Nishimura O. and Fujino M. 2001.** Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 411: 613–617.
- Ojeda S.R., Lomniczi A., Mastronardi C., Heger S., Roth C. and Parent A.S. 2006.** Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: Is the time ripe for a systems biology approach. *Endocrinology*, 147: 1166–1174.
- Poortenaar C., Hooker S. and Sharp N. 2001.** Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi lalandi*) reproductive physiology, as a basis for aquaculture development. *Aquaculture*, 201: 271–286.
- Rodriguez L., Begtashi I., Zanuy S. and Carrillo M. 2000.** Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: Effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at puberty. *Fish Physiology and Biochemistry*, 23: 141–150.
- Rodriguez L., Begtashi I., Zanuy S., Shaw M. and Carrillo M. 2001.** Changes in plasma levels of reproductive hormones during first sexual maturation in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under artificial day lengths. *Aquaculture*, 202: 235–248.
- Saridhar S., Vijayakumar C. and Haniffa M.A. 1998.** Induced spawning and establishment of captive population for an endangered fish, *Ompok bimaculatus* in India. *Current Science*, 75(10): 1066–1068.
- Seminara S.B., Messenger S., Chatzidaki E.E., Thresher R.R., Acierno Jr J.S., Shagoury J.K., Bo-Abbas Y., Kuohung W., Schwino K.M., Hendrick A.G., Zahn D., Dixon J., Kaiser U.B., Slaugenhaupt S.A., Gusella J.F., O’Rahilly S., Carlton M.B., Crowley Jr W.F., Aparicio S.A.**

- and Colledge W.H. 2003.** The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England Journal of Medicine*, 349: 1614–1627.
- Sewald N. and Jakubke H.D. 2002.** *Peptides: Chemistry and Biology*. Wiley-VCH, German. 594P.
- Shahab M., Mastronardi C., Seminara S.B., Crowley W.F., Ojeda S.R. and Plant T.M. 2005.** Increased hypothalamic GPR54 signaling: A potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(6): 2129–2134.
- Simerly R.B. 1998.** Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behavioural Brain Research*, 92: 195–203.
- Walker J.J., Terry J.R., Tsaneva-Atanasova K., Armstrong S.P., McArdle C.A. and Lightman S.L. 2010.** Encoding and decoding mechanisms of pulsatile hormone secretion. *Journal of Neuroendocrinology*, 22: 1226–1238.
- Zhao Y., Lin M.C.A., Mock A., Yang M. and Wayne N.L. 2014.** Kisspeptins modulate the biology of multiple populations of gonadotropin-releasing hormone neurons during embryogenesis and adulthood in zebrafish (*Danio rerio*). *PLOS One* 9(8): 1–11 (e104330).
- Zonneveld N., Rustidja Viveen W.J.A.R. and Mudana W. 1988.** Induced spawning and egg incubation of the Asian catfish, *Clarias batrachus*. *Aquaculture*, 74: 41–47.



Research Paper

Determination of *Rutilus kutum* kisspeptin and its effect on reproductive hormones

Hanieh Rabouti¹, Seyed Mohsen Asghari^{2,3*}, Reihaneh Sariri⁴, Behrooz Heidari^{2,5}, Saeed Balalae⁶

Received: December 2021

Accepted: January 2022

Abstract

The Caspian kutum (*Rutilus kutum*) is the most important commercially and nutritionally bony fish, which is used to prevent the extinction of this valuable species by induced reproduction to synchronize and increase the level of fecundity in breeding conditions. Previous research has shown that kisspeptin, a super-stimulatory protein in the sex-secreting gland axis, leads to puberty and gametogenesis. However, the sequence of kisspeptin 1 and 2 of *R. kutum* has not been determined and the ability of this peptide from protein (Kiss1) in reproduction has not been studied so far. In the present study, the kisspeptin10 sequence of *R. kutum* was determined by CLUSTALW method by designing a primer from the Kiss1 sequence of the same family fish of *R. kutum*. Doses of 5, 25, 50 and 100µg/kg were used to achieve the best dose of this peptide; and concentrations of 17-α hydroxy progesterone and 17-β estradiol were examined. The results of this study showed that synthetic kisspeptin 10 with an optimal dose of 100µg/kg can be introduced as a suitable candidate for induction of spawning in *R. kutum*.

Key words: *Kisspeptin*, *Synthetic Hormone*, *Rutilus kutum*, *Reproduction*.

1- Ph.D. Student in Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

2- Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

3- Associate Professor in Department of Biochemistry and Biophysics, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran.

4- Professor in Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

5- Associate Professor in Department of Marine Sciences, Caspian Sea Basin Research Center, University of Guilan, Rasht, Iran.

6- Professor in Department of Medicinal Chemistry, Institute of Synthesis Chemistry, K.N. Toosi University of Technology, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: sm.asghari@ut.ac.ir