مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۳، سال ۱۳۸۴ (۷۶۴-۷۵۵)

اثر محرک لپتین بر ترشح گونادوتروپینها در میشهای تحت محدودیت انرژی

آرمین توحیدی[۱]، همایون خزعلی[۲]، علی نیکخواه[۳]، امیر نیاسری[٤] و مهدی ژندی[٥]
۱، ۳، استادیار و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران – کرج ۲، عضو هیات علمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید بهشتی ٤، عضو هیأت علمی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تهران
۵، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۷/۸

خلاصه

هدف از این آزمایش، تعیین تأثیر تزریق وریدی (محیطی) هورمون لپتین بر ترشح گونادوتروپینها در میشهایی بود که در اثر محدودیت انرژی مصرفی با توقف ترشحات پالسی **LH** مواجه بودند. شش رأس میش شال غیرسیکلیک انتخاب و یک روز قبل از شروع تیمار (روز صفر)، به هر یک مقدار **۲۵۰µg** کلوپرستنول تزریق شد. سپس میشها در دو گروه سه رأسی قرار گرفته و گروه اول و دوم ضمن تغذیه در حد ٦۰٪ انرژی نگهداری به ترتیب **۱µg/kg** و **٤µg/kg** لپتین به صورت وریدی به مدت چهار روز دریافت نمودند. جهت تعیین چگونگی ترشح **LH** و **FSH** در روزهای صفر و پنج، نمونه‌های خون به مقدار سه میلی لیتر و به مدت سه ساعت به ترتیب به فواصل بیست دقیقه‌ای و یک ساعته جمع‌آوری شد. علاوه بر آن در روزهای دوم و چهارم به ترتیب فوق و به مدت سه ساعت قبل و بعد از تزریق خونگیری انجام شد. همچنین بعد از دورهٔ تیمار، تعداد تخمک‌گذاری به روش لاپاروسکوپی مشخص گردید. تزریق **۱µg/kg** یا **٤µg/kg** لپتین به طور معنی‌دار موجب افزایش میانگین غلظت **LH** (P<۰/۰۵)، بسامد (P<۰/۰۱) و دامنه (P<۰/۰۵) پالسهای آن و غلظت **FSH** (P<۰/۰۱) پلاسما گردید. میزان تخمک گذاری تغییرات معنی‌دار نداشت. نتایج این آزمایش نشان داد، تزریق وریدی لپتین می‌تواند اثرات بازدارنده محدودیت انرژی بر ترشح گونادوتروپینها را در میش خنثی نماید.

واژه‌های کلیدی: لپتین، گونادوتروپین‌ها، میش، محدودیت انرژی

مقدمه

در سال ۱۹۹۴، پروتئین جدیدی در موشهای چاق (*ob/ob*) کشف شد (۳۶) که پس از چندی به نام هورمون لپتین نامیده شد. این هورمون از بافت چربی ترشح شده و به عنوان شاخص میزان چربی و انرژی بدن عمل می‌کند (۲۴،۱۸). در طی چند سال اخیر مشخص شده است، لپتین دارای اثرات محرک بر ترشحات گونادوتروپینها در برخی گونه‌های پستانداران می‌باشد. به عبارت دیگر، لپتین به عنوان یک سیگنال متابولیکی محرک برای سیستم تولیدمثلی عمل می‌کند (۶ ، ۸، ۱۸، ۳۳). تزریق هورمون لپتین به داخل بطن سوم مغز (ICV) در بسیاری از گونه‌های پستانداران از جمله گوسفند موجب تحریک ترشح LH^1 و FSH^2 می‌شود(۷، ۱۷، ۲۲، ۳۰). آزمایشهای *in vitro* نیز تأییدکننده اثرات محرک لپتین بر محور$GnRH^3$-LH/FSH است (۷، ۹، ۲۸، ۳۲). اما از اثر لپتین محیطی که در واقع شاخصی از وضعیت چربی و انرژی بدن می‌باشد، گزارشی در نشخوارکنندگان در دست نیست.

مکاتبه کننده: آرمین توحیدی e-mail: atowhidi@ut.ac.ir

1. Luteinizing hormone
2. Follicle Stimulating hormone
3. Gonadotropin-releasing hormone

Archive of SID
www.SID.ir

با توجه به مطالب فوق، هدف از این آزمایش، مطالعه اثر تزریق وریدی لپتین در دو سطح ۱μg/kg و ۴μg/kg بر روی الگوی ترشحات پالسی LH و میانگین غلظت هورمونهای LH و FSH در میشهایی است که در اثر محدودیت انرژی مصرفی با توقف ترشحات پالسهای LH و چرخه فحلی مواجه بودند.

مواد و روش‌ها

حیوانات و طرح آزمایشی

شش راس میش آسیکلیک که ترشحات پالسی LH آنها دراثر محدودیت انرژی مصرفی طولانی مدت متوقف شده بود (باتعیین الگوی ترشحات پالسی LH) انتخاب شدند. میشهای فوق دارای میانگین وزن (± خطای معیار) (±۰/۷۶) ۳۴/۷۸ کیلوگرم و امتیاز وضع بدن (±خطای معیار) (۰/۰۰) ± ۱/۰۰ بر مبنای سیستم صفر تا پنج بودند. یک روز پیش از شروع تیمار، میش‌ها به طور تصادفی به دو گروه سه رأسی تقسیم شده و از روز اول به مدت چهار روز، تیمارهای زیر را در قفسهای انفرادی دریافت کردند. گروه اول با استفاده از جیره‌ای حاوی ۶۰٪ انرژی متابولیسمی نگهداری تغذیه شده و به علاوه روزانه ۱μg/kg لپتین نوترکیب انسانی[1] (Abcam Ltd., UK) به صورت وریدی دریافت کرد. گروه دوم ضمن تغذیه از جیره‌ای حاوی ۶۰٪ انرژی متابولیسمی نگهداری، روزانه ۴μg/kg لپتین به صورت وریدی دریافت نمود. نمونه‌های خون در روزهای صفر، دو، چهار و پنج از کلیه حیوانات جمع‌آوری گردید. همچنین وضعیت تخمدانها قبل از دوره تیمار و نیز ده روز پس از آغاز دوره تیمار به روش لاپاروسکوپی مشخص شد و در پی آن جهت جلوگیری از بروز عفونت، کلیه حیوانات به مدت سه روز تحت تزریق پنی‌سیلین ـ استرپتومایسین (۱+۱) قرار گرفتند.

تغذیه

ترکیبات شیمیایی خوراک‌ها شامل ماده خشک، انرژی خام، پروتئین خام، چربی خام، خاکستر کل، دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی‌سلولز، کلسیم و فسفر در آزمایشگاه تغذیه موسسه تحقیقات علوم دامی کشور تعیین شد. جیره غذایی بر اساس AFRC سال ۱۹۹۵ (۱) تنظیم گردید. جیره مصرفی حاوی ۶۰٪ انرژی متابولیسمی و سایر احتیاجات غذایی میشها در حد نگهداری بود (جدول ۱). خوراک روزانه به صورت حبه شده هر روز صبح پس از توزین دقیق بر مبنای وزن بدن و به صورت انفرادی در اختیار دامها قرار می‌گرفت. در طی دوره آزمایش، گوسفندان به آب تازه، سنگ نمک و آجر لیسیدنی معدنی (کلسیویت، کانی دام) به طور آزاد دسترسی داشتند.

روش خونگیری

در روزهای صفر (یک روز قبل از شروع دورهٔ تیمار)، دو، چهار و پنج (یک روز بعد از پایان دورهٔ تیمار)، خونگیری به ترتیب زیر انجام شد. نمونه‌های خون به میزان سه میلی لیتر و به مدت سه ساعت و به فواصل بیست دقیقه‌ای جهت تعیین تغییرات پالسهای LH و به فواصل یک ساعته جهت تعیین تغییرات غلظت FSH در روز صفر و پنج آزمایش و پیش از خوراک‌دهی و نیز در روز دوم و چهارم به ترتیب قبل و بعد از تزریق جمع‌آوری شد. نمونه‌های حاصله به مدت بیست دقیقه و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و پلاسمای آنها در داخل لوله‌های پلاستیکی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد در فریزر نگهداری شد.

اندازه‌گیری هورمونها

غلظت هورمونهای LH، FSH و پروژسترون در نمونه‌های پلاسما به روش رادیوایمنواسی[2] و با دو تکرار برای هر نمونه با استفاده از پادتن پلی کلونال گوسفندی (Abcam Ltd., UK) و توسط دستگاه گاما کانتر اندازه‌گیری شد. حساسیت روشهای به کار رفته برای اندازه‌گیری غلظت هورمونهای LH، FSH، پروژسترون به ترتیب معادل ۰/۰۵ ng/ml، ۰/۰۴ ng/ml و ۰/۰۵ ng/ml بود. ضریب تغییرات داخل[3] و بین[4] سنجش برای اندازه‌گیری غلظت LH به ترتیب ۶/۶٪ و ۱۱/۲٪ و FSH به ترتیب ۵/۵٪ و ۷/۹٪ و پروژسترون به ترتیب ۵/۴٪ و ۱۲/۶٪ بود.

1. Recombinant human leptin

2. Radioimmunoassay
3. Inter-assay
4. Intra-assay

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- اجزای جیرهٔ آزمایشی بر حسب مادهٔ خشک، مقدار انرژی و مواد مغذی مصرفی

اجزای جیره	مقدار	اجزای جیره	مقدار
کاه گندم (گرم در روز)	۱۰	پروتئین خام (%)	٤۲/۰۰
یونجه (گرم در روز)	۵۰	کلسیم (%)	۰/۵۲
ذرت (گرم در روز)	۱۰	فسفر (%)	۰/۵۲
آرد گلوتن ذرت (گرم در روز)	۲۱۰	سدیم (%)	۰/٤۵
پودر استخوان (گرم در روز)	۱/۳٤	منیزیم (%)	۰/۲٤
نمك (گرم در روز)	۱/٦٦	مادة خشك مصرفي (گرم در روز)	۲۸۷
اکسید منیزیم (گرم در روز)	۰/٦۹	انرژي متابوليسمي مصرفي (مگاژول در روز)	۳/۷٤
مکمل ویتامینه و معدني رازك (گرم در روز)	۳/۵۰	پروتئین متابولیسمي مصرفي (گرم در روز)	۵٦/۰۰
انرژي متابوليسمي (مگاژول در کیلوگرم)	۱۳/۰۳		

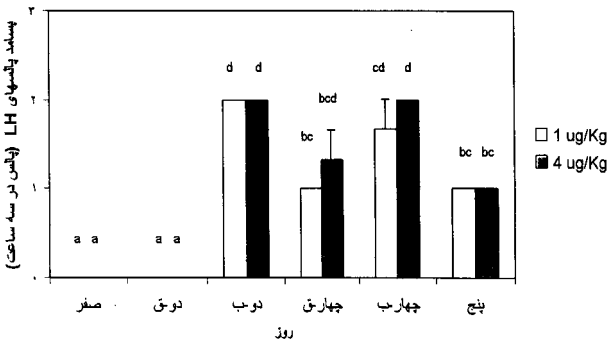
تجزیه و تحلیل آماري

تفاوت در میزان تخمک‌گذاری با استفاده از آزمون مربع کای طبقه بندی شده بر مبنای تعداد تخمک گذاری (بدون تخمک‌گذاری یا یک تخمک‌گذاری و بیشتر) مورد مقایسه قرار گرفت. داده‌های حاصل از تعیین غلظت پلاسمایی FSH، LH و دامنه[1] و بسامد[2] پالسهای LH با استفاده از طرح اندازه‌گیریهای مکرر و به رویهٔ مدل خطی عمومی (GLM) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پالسهای LH با استفاده از روش الگوریتم خوشه‌ای تجزیه و تحلیل شد. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفت. نرم افزار آماری مورد استفاده SPSS-9 بود.

نتایج

فراوانی تخمک‌گذاری بین تیمارهای مختلف در زمانهای قبل و بعد از تیمار تفاوت معنی‌دار نشان نداد؛ زیرا در هیچ کدام از حیوانات، تخمک‌گذاری انجام نشده بود.

در هر دو گروه میانگین بسامد پالسهای LH در روز دوم بعد از تزریق تا یک روز بعد از آخرین تزریق (روز پنجم) به طور معنی‌داری نسبت به زمانهای قبل (روز صفر و روز دوم قبل از تزریق) بیشتر بود. این میانگین در گروهی که ۱µg /kg لپتین دریافت کرده بود، در روز چهارم قبل از تزریق و یک روز بعد از آخرین تزریق نسبت به روز دوم بعد از تزریق کاهش معنی‌دار نشان داد، اما در گروهی که ۴µg /kg لپتین دریافت کرده بودند، یک روز بعد از آخرین تزریق نسبت به روزهای دوم و چهارم بعد از تزریق به طور معنی‌داری کمتر بود (شکل ۱).



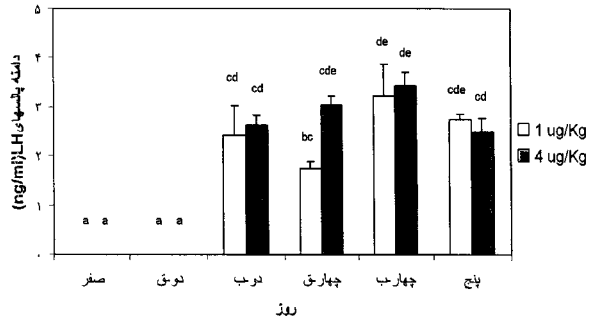
شکل ۱- میانگین (±خطای معیار) بسامد پالسهای LH در طی سه ساعت در گوسفندانی که µg/kg ۱ یا ۴µg/kg لپتین دریافت کردند (ق: قبل از تزریق، ب: بعد از تزریق)

در هر دو گروه میانگین دامنه پالسهای LH در روز دوم بعد از تزریق تا یک روز بعد از آخرین تزریق (روز پنجم) به طور معنی‌دار نسبت به زمانهای قبل (روز صفر و روز دوم قبل از

1. Amplitude
2. Frequency

Archive of SID
www.SID.ir

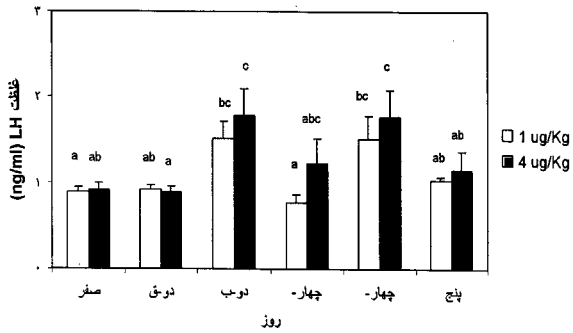
تزریق) بیشتر بود. در گروهی که ۱µg/kg لپتین دریافت کرده بود، دامنه پالسهای LH در روز چهارم قبل از تزریق نسبت به زمان بعد از تزریق به طور معنی‌داری کمتر بود (شکل ۲).



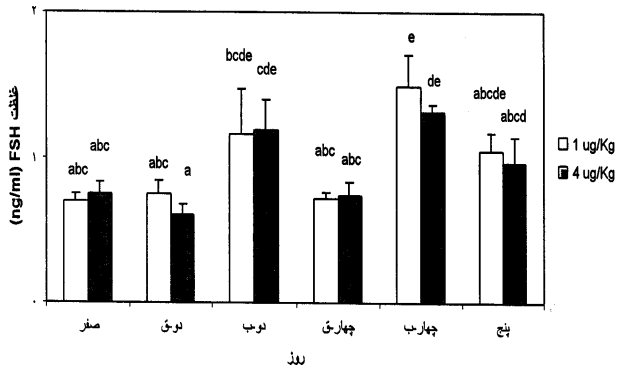
شکل ۲- میانگین (±خطای معیار) دامنه پالسهای LH در گوسفندانی که ۱µg/kg یا ۴µg/kg لپتین دریافت کردند
(ق: قبل از تزرق، ب: بعد از تزریق)

میانگین غلظت LH پلاسما در گروهی که ۱µg/kg لپتین دریافت کرده، در روزهای دوم و چهارم بعد از تزریق نسبت به روز قبل از شروع تیمار (روز صفر) و روز چهارم قبل از تزریق به طور معنی‌دار و به نسبت به روز دوم قبل از تزریق و یک روز بعد از پایان دوره چهار روزه تیمار (روز پنجم) به طور غیر معنی‌دار بالاتر بود. میانگین غلظت LH در گروهی که ۴µg/kg لپتین دریافت کرده، در روزهای دوم و چهارم بعد از تزریق نسبت به روز قبل از دوره تیمار (روز صفر)، روز دوم قبل از تزریق و یک روز بعد از آخرین تزریق (روز پنجم) به طور معنی‌دار و در مقایسه با روز چهارم قبل از تزریق به طور غیر معنی‌دار بالاتر بود (شکل ۳).

تیمار اثر معنی دار بر میانگین غلظت FSH پلاسما نداشت. اما جهت بررسی تغییرات این میانگین در تیمارهای مختلف، مقایسات میانگین انجام و در نتیجه تفاوتهایی مشاهده شد. چنانکه در شکل شمارهٔچهارم نشان داده شده است، میانگین غلظت FSH در گروهی که ۱µg/kg لپتین دریافت کرده، در روز چهارم بعد از تیمار نسبت به روز صفر و نیز روزهای دوم و چهارم قبل از تیمار در گروه خودش و نیز در روزهای صفر، دوم قبل از تیمار، چهارم قبل از تیمار و یک روز بعد از پایان دوره تیمار (روز پنجم) در مقایسه با گروهی که ۴µg/kg لپتین دریافت کرده به طور معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۵). در گروهی که ۴µg/kg لپتین دریافت کرده، میانگین غلظت FSH در روز دوم بعد از تزریق نسبت به روز دوم قبل از تزریق بالاتر بود (P<۰/۰۵). علاوه بر آن میانگین غلظت FSH در این گروه، در روز چهارم بعد از تیمار نسبت به روز صفر و نیز روزهای دوم و چهارم قبل از تیمار در گروه خودش و نیز نسبت به گروهی که ۱µg/kg لپتین دریافت داشته، به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر بود (شکل ۴).



شکل ۳- میانگین (±خطای معیار) غلظت LH پلاسما در گوسفندانی که ۱µg/kg یا ۴µg/kg لپتین دریافت کردند
(ق: قبل از تزریق، ب: بعد از تزریق)



شکل ۴- میانگین (±خطای معیار) غلظت LH پلاسما در گوسفندانی که ۱µg/kg یا ۴µg/kg لپتین دریافت کردند
(ق: قبل از تزریق، ب: بعد از تزریق)

نتایج تعیین غلظت پروژسترون پلاسما نشان داد، کلیه میشها قبل و بعد از دوره تیمار، وارد مرحله جسم زرد چرخه فحلی نشدند و غلظت پروژسترون در کلیهٔ دامها قبل و بعد از تیمار کمتر از ng/ml ۱ بود.

www.SID.ir

بحث

تزریق ۱µg/kg یا ۴µg/kg لپتین به صورت وریدی در طی چهار روز در میشهایی که در اثر محدودیت انرژی مصرفی، پالسهای LH در آنها متوقف شده، موجب احیای پالسها در کلیه حیوانات، پس از گذشت دو روز از آغاز تیمار شد. به طوری که میانگین غلظت، دامنه و بسامد پالسهای LH پس از تزریق دوم و چهارم افزایش یافت که بیانگر توانایی لپتین محیطی در تحریک محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز جهت ایجاد ترشحات پالسی LH است. در هر حال تزریق نسبتاً کوتاه مدت لپتین در این آزمایش نتوانست موجب بازگشت تخمک‌گذاری گردد. از این رو به نظر می رسد، شرایط لازم جهت بازگرداندن کلیه فعالیتهای محور هیپولاتاموس ـ هیپوفیز ـ تخمدانها از جمله ایجاد غلیان LH جهت تخمک‌گذاری با تیمارهای بکار رفته فراهم نشده است.

میانگین غلظت هورمون LH در روز دوم و چهارم آزمایش و پیش از تزریقات دوم و چهارم، نسبت به زمان پیش از آزمایش، تغییرات معنی‌دار نشان نمی‌دهد. اما بسامد و دامنه پالسهای LH پیش از تزریق چهارم، به طور معنی‌داری بالاتر از روز قبل از آزمایش، قبل از تزریق دوم و یک روز بعد از پایان آزمایش می‌باشد. این امر احتمالاً بیانگر اثر محرک لپتین در سنتز LH در هیپوفیز قدامی است، به طوری که ترشحات پالسهای LH پیش از تزریق روز چهارم و نیز یک روز پس از پایان تیمار، همچنان مشاهده می‌شود. هرچند این ترشحات پیش از تزریق چهارم، دارای بسامد و دامنه نسبتاً کمتری در گروهی است که ۱µg/kg لپتین نسبت به ۴µg/kg دریافت کرده‌اند. این امر نشانگر آن است که هر چه مقدار لپتین دریافتی بیشتر و در نتیجه سطح لپتین خون و مدت بالا بودن آن در خون بیشتر باشد، اثرات تحریکی آن بر محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز، مدت بیشتری باقی خواهد ماند. در عین حال عدم وجود تفاوت معنی‌دار در میانگین، بسامد و دامنه پالسهای LH بلافاصله پس از تزریق دو دز مختلف لپتین، احتمالاً حاکی از عدم واکنش وابسته به دز در محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز به لپتین در کوتاه مدت است. به عبارت دیگر به نظر می‌رسد، گیرنده‌های هورمون لپتین بر روی محور GnRH-LH محدود است و با مقدار مشخصی از هورمون لپتین اشباع شده و تا پلاریزاسیون مجدد آنها واکنشی مشاهده نخواهد شد. اما با گذشت زمان گیرنده‌ها دوباره احیاء شده و در صورتی که سطح لپتین در خون بالا باشد به آن واکنش نشان می‌دهند. به همین علت بلافاصله پس از تزریقات لپتین در سطوح مختلف، پاسخ وابسته به دز ظاهر نمی‌شود، ولی در طی ساعات یا روز بعد، اثر محرک لپتین در گروهی که دز بیشتری دریافت کرده‌اند، بر روی ترشحات LH ملاحظه می‌گردد. در پایان دوره آزمایش، هر چند میانگین غلظت LH در هر دو گروهی که لپتین دریافت کرده‌اند، به سطوح پس از تزریق در روزهای دوم و چهارم نمی‌رسد، ولی پالسهای LH مشاهده شده و بسامد و دامنه پالسهای آن کماکان در سطوح بالا قرار دارد.

اثر تحریک کننده لپتین برترشحات پالسی LH در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است. در گوسفند (هنری و همکاران، مکاتبه شخصی ۲۰۰۲، ۱۷، ۲۲، ۳۰) و گاوهای ماده (۳)، میمونهای نر (۲۱)، موش صحرایی (۲۶، ۳۱) و موش (۲) که همگی در اثر گرسنگی یا کاهش سطح انرژی مصرفی با کاهش یا توقف ترشحات پالسهای LH مواجه بودند، تزریق داخل مغزی یا محیطی (فقط در غیر نشخوارکنندگان گزارشهایی موجود است) لپتین موجب افزایش میانگین غلظت، بسامد و دامنه پالسهای LH تا سطح طبیعی شده است. در هر حال گزارشی از تزریق وریدی (محیطی) لپتین بر ترشحات LH در گوسفند یا گاو به عنوان حیوانات نشخوارکننده ارائه نشده است. در حیوانات چاق هوموزیگوت (ob/ob) مانند موشهای نر و ماده(۵) که به طور ذاتی نابارور هستند، تزریق لپتین موجب آغاز ترشحات پالسی LH و باروری حیوانات می‌شود. درمطالعات *in vitro* نیز اضافه کردن لپتین به محیط کشت موجب افزایش ترشح LH از سلولهای هیپوفیز قدامی گاوهای نر اخته شده (۲۸، ۳۲)، موشهای معمولی و چاق (۲۸) و موشهای صحرایی ماده (۳۵) شده است. همچنین درآزمایشهای *in vitro* افزودن لپتین موجب افزایش ترشح GnRH از سلولهای هیپوتالاموسی خوکچه (۸ ، ۹ ، ۱۱) و موش صحرایی ماده (۳۵) گردیده است.

در برخی مطالعات تزریق لپتین به میش (۲۳)، قوچ (۱۵)، و خوکچه (۸) بر ترشحات LH بی‌اثر بود. اما به نظر می‌رسد دلیل

Archive of SID

www.SID.ir

این تفاوت، نوع تیمارهای به کار رفته و میزان لپتین مصرفی و یا گونهٔ حیوانی باشد . به طور مثال، این احتمال وجود دارد که در مطالعات فوق به دلیل بالاتر بودن دز لپتین از حد فیزیولوژیک نورونهای GnRH غیر حساس و گیرنده‌های آن کاهش یافته باشد. در تائید این نظریه یو و همکاران (۱۹۹۷) یک کاهش وابسته به دز لپتین را در آزاد سازی GnRH از هیپوتالاموس نشان داده‌اند. در هر حال در آزمایش هنری و همکاران (۱۹۹۹) بر روی میش حیوانات مورد استفاده قبلاً تحت عمل تخمدان‌برداری قرار گرفته بودند، و پالسهای LH در آنها ذاتاً دارای بسامد و دامنه بالایی بوده و از این رو مدل خوبی برای بررسی اثر لپتین بر ترشح لپتین نبودند. در مطالعه سلی و همکاران بر روی قوچ (۱۵) نیز کاهش ترشح LH پس از تزریق لپتین احتمالابه دلیل تزریق لپتین نبوده، بلکه ناشی از کاهش سطح تغذیه پس از تزریق لپتین است.

در تحقیق حاضر، پس از آن که به دلیل محدودیت طولانی مدت در انرژی مصرفی، ترشحات پالسی LH متوقف و میانگین غلظت LH به شدت کاهش یافته بود، تزریق محیطی لپتین با وجود ادامه محدودیت انرژی موجب احیای فعالیتهای نوروآندوکرینی مغز و در نتیجه ترشحات پالسی LH شده است. بنابراین به نظر می‌رسد، در میشها نظیر جوندگان (۲، ۲۶، ۳۱) و کف روها (۲۱)، لپتین محیطی یکی از عوامل مهم کنترل‌کننده فعالیتهای نوروآندوکرینی جنسی مغزی می‌باشد. به عبارت دیگر در میش، لپتین محیطی قادر به خنثی کردن اثرات مهاری محدودیت انرژی بر محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز و ترشحات پالسی GnRH – LH است.

پدیدار شدن سریع پالسهای LH پس از تزریق لپتین در روزهای دوم و چهارم در آزمایش حاضر، احتمالاً نشانه اثر فوری لپتین بر محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز بوده، به طوری که موجب تخلیه هیپوفیز قدامی از LH می‌شود. اما علاوه بر آن، لپتین با تحریک سلولهای گونادوتروف موجب تحریک ساخت هورمون LH شده و به صورت یک محرک طولانی مدت متابولیکی جهت ادامه فعالیتهای محور GnRH-LH عمل می‌کند. به طور مثال در روز چهارم قبل از تزریق و نیز روز پنجم (یک روز بعد از پایان دورهٔ تیمار) غلظت لپتین پلاسما در سطح بالایی قرار ندارد، ولی افزایش سطح لپتین در طی روزهای قبل، موجب ادامه فعالیتهای محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز و ترشحات پالسی LH شده است. با این حال در روز دوم تیمار و قبل از تزریق دوم (در آزمایش حاضر تزریق لپتین در روز اول بوده که در این روز نمونه‌های خون جمع آوری نشده است)، پالسهای LH مشاهده نشد. این امر بیان کننده آن است که تنها یک تزریق محیطی لپتین، قابلیت تحریک نمودن طولانی مدت محور GnRH-LH را نداشته و از این رو پالسهای LH در روز دوم قبل از تزریق مشاهده نشد. این نتیجه برخلاف گزارش میلر و همکاران (۲۰۰۱) است و علت آن احتمالاً تفاوت در نوع تزریق لپتین می‌باشد، زیرا در آزمایش مذکور از تزریق لپتین به صورت داخل مغزی استفاده شده است. گرچه در آزمایش حاضر به دلیل عدم خونگیری در روز اول در خصوص چگونگی ترشحات LH پس از اولین نوبت دریافت لپتین اطلاعی در دست نیست.

همانطور که قبلا اشاره شد، علت به کارگیری تزریق محیطی لپتین در این پژوهش شناسایی تأثیر لپتین موجود درخون بر محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز در میش بود. در بسیاری از مطالعات مشخص شده است، تأثیرات انرژی مصرفی عمدتاً از طریق نوروترنسمیترهایی چون NPY[1] ، POMC[2] ، CART[3] و سایر نورو ترانسمیترها بر روی نورونهای GnRH و از آنجا بر ترشحات پالسی LH اعمال می‌شود (۴، ۲۷). از طرفی لپتین از بافت چربی سفید ترشح شده (۲۴) و غلظت پلاسمایی آن همبستگی مثبت و بالایی با ذخایر چربی بدن دارد (۱۴، ۱۹). در چند مطالعه هورمون لپتین در مایع مغزی ـ نخاعی ردیابی شده (۱۳،۱۴) و گیرنده‌های آن در نواحی مختلف مغز از جمله نورونهای درگیر در فرایندهای تولیدمثلی مانند GnRH (۱۰، ۲۹)، NPY و POMC (۲۱) کشف شده است. یک مطالعه نیز نشان می‌دهد، لپتین قادر است پس از عبور از سد خونی مغز توسط گیرنده‌هایی خاص، بر روی قسمتهای فوقانی مغز تأثیر نماید (۱۲). افزودن لپتین در آزمایشهای *in vitro* نیز موجب افزایش ترشح GnRH از سلولهای هیپوتالاموسی خوکچه

1. Neuropeptide Y
2. Propiomelanocortin
3. Cocaine and amphetamine-regulated transcript

Archive of SID

www.SID.ir

(۸، ۱۰) و موش صحرایی ماده (۳۵) می‌شود. همچنین در مطالعات پیشین مشخص شده است، لپتین می‌تواند از طریق نوروترنسمیترهایی نظیر NPY (۲، ۲۷)، POMC (۳۴)، CART (۱۷، ۲۷) بر ترشحات GnRH و LH اثر نماید. بنابراین این امکان وجود دارد که لپتین موجود در خون محیطی توانایی تأثیرگذاری بر روی ترشحات GnRH را داشته باشد.

با توجه به وجود گیرنده های لپتین بر روی هیپوفیز قدامی گوسفند (۲۰ و ۲۵) و نیز اثر محرک لپتین بر ترشح LH از سلولهای هیپوفیز قدامی در آزمایشهای *in vitro* (۷ ، ۱۰، ۱۱، ۲۸، ۳۲، ۳۵)، احتمال تأثیر مستقیم لپتین بر روی سلولهای گونادوتروف هیپوفیز قدامی جهت میانجیگری کردن ترشحات LH و FSH نیز وجود دارد.

تزریق ۱μg/kg یا ۴μg/kg لپتین به صورت وریدی در گوسفندانی که به دلیل محدودیت طولانی مدت انرژی مصرفی با کاهش ترشحات FSH مواجه بودند، موجب افزایش میانگین غلظت FSH پلاسما پس از هر نوبت تزریق گردید؛ اما واکنشی وابسته به دز مشاهده نشد. به عبارت دیگر مشابه با محور GnRH-LH ، گیرنده‌های هورمون لپتین بر روی محور GnRH-FSH نیز محدود است. سطح FSH در انتهای دوره آزمایش و پس از گذشت یک روز از آخرین تزریق نیز نسبت به دوره پیش از آزمایش هرچند به طور غیر معنی‌دار بالاتر بود. لذا تغییرات فوق می‌تواند حاکی از تأثیر محرک لپتین بر محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز جهت ساخت زیرواحد βFSH و ترشح FSH باشد. تأثیر مثبت تزریق لپتین بر ترشحات FSH قبلاً در مطالعه بر روی موشهای نر و ماده چاق (ob/ob) مشاهده شده است (۵). همچنین در مطالعات *in vitro* اضافه کردن لپتین به محیط کشت حاوی سلولهای هیپوفیز قدامی گاوهای نر اخته شده و موش (۲۸) و موش صحرایی ماده (۳۵) موجب افزایش ترشح FSH گردید. بنابراین نتایج این آزمایش ضمن تأیید نتایج مطالعات پیشین، بیانگر اثرات محرک لپتین محیطی بر ترشحات FSH در میش می‌باشد. گرچه از چگونگی اعمال این اثرات اطلاع دقیقی در دست نیست، اما همانند LH مسیرهای مختلفی احتمالاً وجود دارد. به طور مثال ممکن است لپتین با عبور از سد خونی مغز بر ترشح GnRH از هیپوتالاموس اثر نماید (۱۲). هرچند با توجه به وجود گیرنده‌های لپتین بر روی هیپوفیز قدامی میش (۲۰، ۲۵)، یک سازوکار احتمالی دیگر، تأثیر مستقیم لپتین بر روی سلولهای گونادوتروف هیپوفیز قدامی است.

بطور کلی از نتایج این پژوهش چنین استنباط می‌شود که تزریق محیطی لپتین به عنوان یک سیگنال متابولیکی، اثر مهار کنندهٔ کمبودهای انرژی بر محور نوروآندوکرینی جنسی مغز در میشهای تحت محدودیت غذایی را خنثی نموده و موجب تحریک ترشح گونادوتروپینها می گردد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مسئولین محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس و مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور به جهت مساعدت و تأمین هزینه‌های لازم تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

REFERENCES

1. AFRC. 1995. Agricultural and Food Research Council, energy and protein requirements of ruminants. An advisory manual prepared by the AFRC technical committee on responses to nutrients. 2nd edn. CAB International, Wallingford, U.K.
2. Ahima, R.S., D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Qu, B. Lowell, E. Maratos-Flier, & J. S. Flier. 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature, 382: 250-252.
3. Amstalden, M., M. R. Garcia, R. L. Stanko, S. E. Nizielski, C. D. Morrison, D. H. Keisler, & G. L. Williams, 2000. Effects of acute feed restriction and central infusion of recombinant oleptin on the metabolic and central reproductive axes of mature cows. Proceedings of Society for the Study of Reproduction,Wisconsin.
4. Aubert, M.L., D. D. Pierroz, N. M. Gruaz – Gumowski, B. Sudre – Vuagnat, P. D. Raposinho, J. M. Dubuis, P. Broqua, & F. Pralong. 2000. Leptin and human reproduction. Available on the http:// matweb. hcuge.ch /matweb/ endo/Lectures10th-PGC/leptin-and-human-reproduction.htm.

Archive of SID
www.SID.ir

5. Barash, I. A., C. C. Cheung, D. S. Weigle, H. Ren, E. B. Kabigting, J. L. Kuijper, D. K. Clifton, & R. A. Steiner. 1996. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. Endocrinology,137: 3144-3147.
6. Barb, C.R. 1999. The brain-pituitary-adipocyte axis: Role of leptin in modulating neuroendocrine function: Journal of Animal Science, 77: 1249 – 1257.
7. Barb, C. R., J. B. Barrett, R. R. Kraeling, G. B. Rampacek, X. Yan, & T. G. Ramsay. 1997. Leptin modulation of luteinizing hormone (LH) secretion by pig pituitary cells in culture. Journal of Reproduction and Fertility. 52 (Suppl.): 63.
8. Barb, C.R., J. B. Barrett, R. R. Kraeling, & G. B. Rampacek. 1999. Role of leptin in modulating neuroendocrine function: A metabolic link between the brain-pituitary and adipose tissue. Reproduction in Domestic Animals, 34: 111-125.
9. Barb, C. R., R. R. Kraeling, G. B. Rampacek, & J. B. Barrett. 1999. Neuropeptide Y: A possible link between LH and GH secretion in the gilt. Journal of Animal Science, 77 (Suppl. 1) : 441.
10. Barb, C.R., R. R. Kraeling, & G. B. Rampacek. 2000. Central action of leptin: Effects on growth and reproduction performance. Journal of Animal Science, 78 (Suppl. 1): 68.
11. Barb, C. R., R. R. Kraeling, G. B. Rampacek, & J. B. Barrett. 2001. Leptin modulates GnRH secretion from hypotholamic-preoptic area in the gilt. Available on the http://199.245.200.58/SSR/ html/287.html
12. Bjorbaek. C., J. K. Elmquist, P. Michl, R. S. Ahima, A. Van Bueren, A. L. McCall, & J. Flier. 1998. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. Endocrinology, 139: 3485- 3491.
13. Blache, D., L. M. Chagas, M. A. Blackberry, P. E. Vercoe, & G. B. Martin. 2000a. Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. Journal of Reproduction and Fertility, 120: 1-11.
14. Blache, D., R. L. Tellam, L. M. Chagas, M. A. Blackberry, P. E. Verco, & G. B. Martin. 2000b. Level of nutrition affects leptin concentration in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. Journal of Endocrinology, 165: 625-637.
15. Celi, P., G. B. Martin, B. Blache, P. E. Vercoe, & R. L. Tellam. 2000. Leptin does not appear to be the metabolic signal to central reproductive centers in mature male sheep. Proceedings of 14th International Congress on Animal Reproduction. 7: 19.
16. Christensen, R.A., K. Malinowski, A. M. Massenzio, H. D. Hafs, & C. G. Scanes. 1997. Acute effects of short-term feed deprivation and refeeding on circulating concentrations of metabolites, Insulin-like growth factor, Insulin-like growth factor-binding protein, somatotropin and thyroid hormones in adult geldings. Journal of Animal Science, 75: 1351-1358.
17. Clarke, I. J. 2002. Fat regulates the neuroendocrine system; Studies with leptin. Available on the http. www. endocrine-abstracts. org/ea/2002/ea00025p3.htm
18. Cunningham, M. J., D. K. Clifton, & R. A. Steiner. 1999. Leptin's actions on the reprodutive axis: Perspectives and Mechanisms. Biology of Reproduction, 60: 216-222.
19. Delavaud, C., F. Bocquier, Y. Chilliard, D. H. Keisler, & A. Gertler. 2000. Plasma leptin determination in ruminants: Effect of nutritional status and body fatness plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. Journal of Endocrinology, 165: 519-526.
20. Dyer, C.J., J. M. Simmones, R. L. Matteri, & D. H. Keisler. 1997. Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissue, and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. Domestic Animal Endocrinology, 14: 119 - 128.
21. Finn, P.D., M. J. Cunningham, K. Y. F. Pau, H. G. Spies, D. K. Clifton, & R. A. Steiner. 1998. Leptin's stimulatory effect on the neuroendocrine axis of the monkey. Endocrinology, 139: 4652-4662.
22. Fischer, L. 2001. Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinizing hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective to body weight, Journal of Endocrinology, 168: 67-77.
23. Henry, B.A., J. W. Goding, W. S. Alexander, A. J. Tilbrook, B. J. Canny, F. Dunshea, A. Rao, A. Mansell & I. J. Clarcke. 1999. Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without

Archive of SID

www.SID.ir

affecting the secretion of hormones from the pituitary gland: Evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. Endocrinology, 140: 1175-1182.
24. Houseknecht, K.I., C. A. Baile, R. L. Matteri, & M. E. Spurlock. 1998. The biology of leptin : A review .Journal of Animal Science, 76: 1405-1420.
25. Iqbal, J., S. Pompolo, R. V. Considine, & I. J. Clarke. 2000. Localization of leptin receptor-like immunoreactivity in the corticotropins, somatotropins, and gonadotropes in the ovine anterior pituitary. Endocrinology, 141: 1515 - 1520.
26. Kalra , S.P., B. Xu, M. G. Dube, L. L. Moldawer, D. Martin, & P. S. Kalra. 1998. Leptin and ciliary neurotropic factor (CNTF) inhibit fasting-induced suppression of luteinizing hormone release in rats: Role of neuropeptide Y. Neuroscience Letter, 240: 45-49.
27. Lebrethon, M. C., E. Vandersmissen, A. Gerard, A. S. Parent, J. L. Junien, & J. P. Bourguignon. 2000. *In vitro* stimulation of the prepubertal rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator by leptin and neuropeptide Y through distinct mechanisms. Endocrinology, 141: 1467-1469.
28. Liou, S.S., J. M. Lim, R. M. Blair, & W. Hansel. 1997. Leptin causes release of LH and FSH from perfused murine and bovine pituitary glands. Biology of Reproduction , 56 (Suppl. 1): 354.
29. Magni, P., R. Vettor, C. Pagano, A. Calcagno, E. Beretta, E. Messim, M. Zanisi, L. Martini, & M. Motta, 1999. Expression of a leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone-secreting neurons. Endocrinology, 140: 1581-1585.
30. Miller, D. W., M. A. Morrison, P. A. Findlay, D. G. Hazlerig, & C. L. Adam. 2001. A single central leptin injection stimulates LH secretion in sheep: Interaction with α-melanocyte-stimulating hormone (α-MSH) and neuropeptide Y (NPY). Available on the http://WWW.bris.ac.uk/depts/Anatomy/ BNG/ Programme.htm
31. Nagatani, S., P. Guthikonda, P. Thompson, R. C. Tsukamura, K. I. Maeda, & D. L. Foster. 1998. Evidence for GnRH regulation by leptin: Leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. Neuroendocrinology, 66: 370-376.
32. Ridgway, T.D., R. P. Wettemann, & L. J. Spicer. 2000. Effect of leptin on release of luteinizing hormone from bovine anterior pituitary cells *in vitro*. Journal of Animal Science, 78 (Suppl. 1): 861.
33. Schneider, J.E., D. Zhou, & R. M. Blum. 2000. Leptin and metabolic control of reproduction. Hormones and Behavior, 37: 306-326.
34. Thornton, J. E., C. C. Cheung, D. K. Clifton, & R. A. Steiner. 1997. Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in mice. Endocrinology, 138: 5063-5066
35. Yu, W.H., M. Kimura, A. Walczewska, S. Karanth, & McCann. 1997. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. Proceedings of National Academy of Science, U.S.A, 94: 1023-1028.
36. Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, & J. M. Freidman. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature, 372: 425-432.

Archive of SID

www.SID.ir

Stimulatory Effect of Leptin on Gonadotropins Secretion in Energy-Restricted Ewes

A. TOHIDI[1], H. KHAZALI[2], A. NIKKHAH[3], A. NIASARI[4] AND M. ZHANDI[5]

1, 3, Assistant Professor and Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, 2, Scientific Member, Faculty of Basic Sciences, University of Shahid Beheshti, 4, Scientific Member, Faculty of Veterinary Sciences, University of Tehran, 5, Former Graduate Student, Tarbiat Modarres University

Accepted. Sep. 29, 2004

SUMMARY

This study was conducted to investigate the effect of intravascular (peripheral) leptin injection on gonadotropins secretion in energy-restricted ewes. Six acyclic (LH pulses secretion lacking) Chal ewes each received 250 μg cloprostenol one day prior to treatment (day 0). Ewes were assigned to two groups (n=3), receiving the following treatments for a duration of 4 days. Groups I and II received intravenous injection with 1μg and 4 μg/Kg BW leptin, respectively. Ewes were fed a ration that provided 60% of the maintenance energy requirements. Blood samples were collected (3 ml) at 20 minutes and hourly intervals for 3 hours on days 0 and 5 (before feeding) to determine LH and FSH secretion pattern. In addition, blood samples were collected for 3 hours before and after leptin injection on days 2 and 4 the same way as above. Ovulation rate was also determined after treatment period through laparoscopy. Mean plasma concentration ($p<0.05$), pulse frequency ($p<0.01$), and LH amplitude ($p<0.05$) as well as mean plasma FSH concentration ($p<0.01$) were significantly increased in either groups. Ovulation rate was not affected. The Results indicate that intravascular (peripheral) leptin injection can restore gonadotropins secretion (limited in energy-restricted ewes).

Key words: Leptin, Gonadotropin, Energy-restricted ewe.

Archive of SID

www.SID.ir