

## بیان ژن هورمون ادیپونکتین و گیرنده‌های آن در هیپوتالاموس و هیپوفیز گاو هلستاین در طول سیکل فحلی

محمد رضا تابنده<sup>۱\*</sup>، ارسلان حسینی<sup>۲</sup>، مهدی صائب<sup>۳</sup>، مجتبی کافی<sup>۴</sup>، ناهید کبیری<sup>۱</sup>

۱) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز - ایران

۲) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران

۳) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران

۴) گروه علوم درماتوگامی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران

(دریافت مقاله: ۷ مرداد ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۲۷ مهر ماه ۱۳۹۴)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** ادیپونکتین یکی از مهمترین ادیپوسیتوکاین‌های بافت چربی است که بواسطه گیرنده‌های AdipoR1 و AdipoR2 در تنظیم باروری جنس نر و ماده نقش دارد. اخیراً بیان ژن‌های سیستم ادیپونکتین و نقش تنظیمی منفی آن بر محور هیپوفیز-هیپوتالاموس به تأیید رسیده است. **هدف:** در حال حاضر اطلاعاتی در مورد بیان ادیپونکتین و گیرنده‌های آن در محور هیپوفیز-هیپوتالاموس در دام‌های اهلی در دسترس نمی‌باشد. در این مطالعه برای اولین بار بیان ژن‌های سیستم ادیپونکتین در مراحل مختلف سیکل فحلی گاو در بافت‌های هیپوفیز و هیپوتالاموس مورد مطالعه قرار گرفت. **روش کار:** نمونه‌گیری از بافت‌های هیپوفیز و هیپوتالاموس از گاوهای هلستاین ماده در کشتارگاه بعمل آمد. تعیین مراحل مختلف سیکل استروس (پرو استروس، مت استروس، ابتدای لوتئال، انتهای لوتئال) بر اساس ارزیابی ماکروسکوپی تخمدان‌ها و رحم انجام گرفت. ارزیابی کمی بیان ژن‌های ادیپونکتین و گیرنده‌های آن با استفاده از آزمون PCR در زمان حقیقی کمی (qPCR Probe) و بر اساس روش مقایسه ای  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  انجام شد. مقادیر هورمون‌های استروژن و پروژسترون با استفاده از روش الیزا اندازه‌گیری شد. **نتایج:** نتایج این مطالعه نشان‌دهنده بیان ادیپونکتین و گیرنده‌های آن در بافت‌های مورد مطالعه بود. بالاترین بیان ادیپونکتین در بافت‌های مورد مطالعه در فاز لوتئال مشاهده شد در حالیکه حداقل میزان بیان ادیپونکتین مربوط به دوره پرو استروس بود. تغییر معنی‌داری در بیان گیرنده ۱ در طول سیکل فحلی در بافت‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. بالاترین میزان بیان گیرنده ۲ در مرحله پرو استروس و کمترین میزان آن مربوط به اواخر فاز لوتئال بود. بین تغییرات ادیپونکتین در بافت‌های مورد مطالعه با استروژن ارتباط منفی و با پروژسترون ارتباط مثبت وجود داشت. **نتیجه‌گیری نهایی:** بر اساس یافته‌های این تحقیق در خصوص بیان پایین ادیپونکتین در پرو استروس و نتایج سایرین مبنی بر اثر منفی ادیپونکتین بر ترشح هورمون LH از هیپوفیز می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ممکن است ادیپونکتین بر عملکرد محور هیپوفیز-هیپوتالاموس در گاو در طول سیکل فحلی نقش تنظیمی داشته باشد.

**واژه‌های کلیدی:** ادیپونکتین، گاو، سیکل فحلی، هیپوفیز، هیپوتالاموس

### مقدمه

گیرنده این هورمون تحت عنوان AdipoRI و AdipoRII در سال ۲۰۰۴ جدا سازی و کلون شده است که بین موش، انسان، خوک و گاو بیش از ۷۰ درصد شباهت در توالی ژن و پروتئین وجود دارد (۲۹). این هورمون یکی از فراوان ترین پروتئین‌های پلازما می‌باشد که در حدود ۰/۰۱٪ کل پروتئین‌های پلازما را تشکیل می‌دهد. بطور کلی عملکرد اصلی شناخته شده این هورمون در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها می‌باشد (۹). در سال ۲۰۰۲ با مطالعه بر روی موش‌های فاقد ژن ادیپونکتین نقش این هورمون در جلوگیری از ضخیم شدن عروق و تکثیر عضلات صاف جدار عروق و بطور کلی اثرات حفاظتی آن بر سیستم قلبی عروقی و ضد آترسکلروز مشخص گردید (۲۱). بنظر می‌رسد هورمون بواسطه اثرات مرکزی بر بخش‌های تنظیم سیری و گرسنگی هیپوتالاموس در تنظیم اشتها نقش داشته باشد (۱۷). ساختار کروموزومی، توالی ژن و اسیدهای آمینه هورمون در سالهای اخیر در خوک (۸)، گاو (۲۶، ۲۷، ۱۸)، سگ (۱۳) و گربه (۱۴) مورد ارزیابی و

ادیپونکتین هورمون جدیدی است که اولین بار از سلول‌های بافت چربی رده سلولی ۳T۳-L۱ جدا سازی و یک سال بعد در انسان و موش شناسایی شد (۲۰، ۲۲، ۲۵). ادیپونکتین دارای ۲۴۴ اسید آمینه و ساختمان مشابه TNF $\alpha$  و C1q سیستم ایمنی می‌باشد. توالی نوکلئوتیدی و اسیدهای آمینه این هورمون در گونه‌های سگ (۱۳)، انسان (۲۰، ۲۵)، گاو (۲۶، ۲۷، ۱۸)، خوک (۸)، موش و رات (۲۰، ۲۵) دارای ۸۰٪ شباهت می‌باشد، که نشان‌دهنده نقش حفاظت شده این هورمون در گونه‌های مختلف است. تاکنون انواع مختلف این هورمون با وزن مولکولی پایین (سه زیر واحدی)، وزن مولکولی بالا (شش زیر واحدی) و وزن مولکولی بسیار بالا دارای ۱۲ تا ۱۸ زیر واحد در سرم انسان، موش و گاو شناسایی شده است (۱۶). بنظر می‌رسد شکل اخیر مسوول بروز فعالیت بیولوژیک هورمون باشد با اینحال اطلاعاتی در مورد شکل اصلی بیولوژیک هورمون در دام‌های اهلی در دسترس نمی‌باشد. دو



آمد. مرحله دقیق سیکل فحلی بر اساس مشاهدات ماکروسکوپی تخمدان (۱۵) و رحم (۳) تعیین گردید. اطلاعات مورد استفاده در تعیین گامه فحلی بر اساس خصوصیات تخمدان و ویژگی‌های رحم و سرویکس در جداول ۱ و ۲ آمده است. بر این اساس پس از ارزیابی اولیه دستگاه تناسلی دام‌های کشتار شده و عدم وجود هر گونه عارضه پاتولوژیک ظاهری نمونه‌های مغز پس از برش استخوان جمجمه بصورت عرضی خارج و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد. همزمان اطلاعات مربوط به ویژگی‌های تخمدان و رحم ثبت گردید. در آزمایشگاه بلافاصله از بافت‌های هیپوتالاموس خلفی و میانی و هیپوفیز قدامی نمونه‌گیری بعمل آمد. بافت‌های جدا شده با بافر فسفات (PBS)  $0.05 \text{ mol/L}$  و  $\text{pH}=7$  شستشو و تا زمان استخراج RNA در فریزر  $80^\circ\text{C}$  - نگهداری شدند. نمونه‌های خون به منظور تعیین مقادیر هورمون‌های استرادیول و پروژسترون اخذ گردید.

**استخراج RNA و واکنش RT-PCR:** استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری TRIZOL (Roche، آمریکا) و مطابق روش ارائه شده توسط شرکت انجام شد. به منظور حذف DNA، تمام نمونه‌های RNA بمدت ۱ ساعت با آنزیم Dnase (Fermentase، آمریکا) و مطابق روش ارائه شده توسط شرکت تیمار شدند. غلظت و میزان خلوص نمونه‌های RNA پس از قرائت جذب آنها در طول موج  $260 \text{ nm}$  و نیز محاسبه نسبت جذب  $260/280$  با استفاده از اسپکتروفوتومتر بیوفتومتر (اپندورف، آلمان) تعیین گردید. نمونه‌های که نسبت جذب  $260/280$  آنها بیش از  $1/8$  بود جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت تجاری AmpliSence (AmpliSens، روسیه)، پرایمرهای تصادفی هگزامر و در واکنش‌هایی با حجم  $20 \mu\text{L}$  مطابق دستورالعمل شرکت انجام شد.

به منظور تأیید بیان ژن‌های ادیپونکتین و گیرنده‌های ۱ و ۲ آن در بافت‌های مورد مطالعه، ابتدا واکنش PCR بر روی بافت‌های مورد نظر انجام گردید و در صورت تأیید بیان ژن‌های مورد نظر به منظور بررسی مقایسه‌ای بیان ژن‌ها از آزمون PCR در زمان حقیقی استفاده گردید. لیست پرایمر و پروب‌های مورد استفاده در این مطالعه، توالی، طول قطعه‌ای که توسط آنها تکثیر می‌شود و نیز دمای اتصال هر یک در جدول ۲ آمده است. به منظور طراحی پروب و پرایمر از نرم افزار Beacon designer  $TM7/01$  (PREMIER Biosoft international، آمریکا) استفاده شد. واکنش‌های PCR با استفاده از آنزیم Taq polymerase (سیناژن، ایران) در واکنش‌هایی با حجم  $25 \mu\text{L}$  انجام شد. نمونه cDNA بافت چربی به عنوان کنترل مثبت و یک نمونه واکنش فاقد cDNA به عنوان کنترل منفی در هر واکنش PCR در نظر گرفته شد. به منظور مشاهده محصول PCR از ژل آگاروز ۲٪، تهیه شده در محلول بافر TAE استفاده شد.

**آزمون PCR در زمان حقیقی:** برای ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های ادیپونکتین و گیرنده‌های آن از آزمون PCR در زمان حقیقی، روش

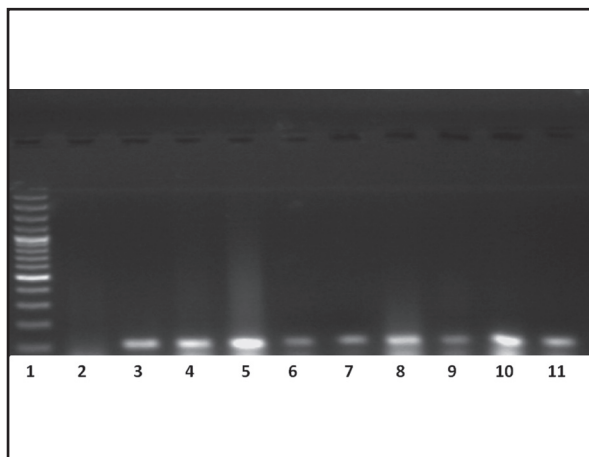
شناسایی قرار گرفته است. با اینحال در مورد تغییرات این هورمون در شرایط فیزیولوژیک مختلف مانند گرسنگی، تغییرات فصلی، تغییرات در سیکل جنسی و میزان بیان پروتئین یا گیرنده‌ها در بافت‌های مختلف حیوانات اطلاعاتی اندکی موجود می‌باشد.

ادیپونکتین با تأثیر بر بخش‌های مختلف سیستم تولید مثلی مانند هیپوفیز (۲۴، ۲۳، ۱۹) و بیضه (۵) در باروری جنس ماده و نر در انسان و جوندگان نقش دارد. مطالعات موجود نشان می‌دهد که موش‌های ترانسژن با بیان بالای ادیپونکتین نابارور هستند. همچنین در موش‌های با کمبود ادیپونکتین اختلالات متعدد در بافت‌های تولید مثلی مانند رحم و تخمدان گزارش شده است (۷). به نظر می‌رسد ادیپونکتین سبب مهار تولید اندروژن‌ها توسط سلول‌های تکا می‌شود و کاهش این هورمون در بیماران مبتلا به سندرم پلی کیستیک تخمدان سبب برداشت اثر مهار ادیپونکتین بر تولید اندروژن‌ها و افزایش تولید اندروژن‌ها می‌شود (۶). در سلول‌های گنادوتروپ رده LBTZ موشی و در سلول‌های هیپوفیز موش ادیپونکتین سبب مهار ترشح LH می‌شود (۲۴، ۱۹). در موش‌هایی که هیپوفیز آنها برداشت می‌شود بیان ادیپونکتین کاهش می‌یابد و جایگزینی گنادوتروپین‌ها بخصوص hCG سبب افزایش میزان mRNA ادیپونکتین می‌شود (۲۴). گیرنده‌های هورمون در هیپوتالاموس و سلول‌های اندوتلیال شبکه کرونید انسان و موش شناسایی شده که بنظر می‌رسد این گیرنده‌ها در انتقال پروتئین به مغز و اثرات مرکزی هورمون نقش داشته باشند (۱۷، ۱۲). اخیراً بیان ژن‌های سیستم ادیپونکتین در تخمدان گاو مورد بررسی قرار گرفته است (۲۷، ۲۶، ۱۷). با اینحال اطلاعات موجود در خصوص نقش‌های احتمالی ادیپونکتین بر تولید مثل از طریق تأثیر بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز در دام‌های اهلی و نشخوارکنندگان بسیار اندک می‌باشد. با توجه به اهمیت محور هیپوفیز-هیپوتالاموس در کنترل وقایع فیزیولوژیک سیکل استروس و تأثیر ادیپونکتین بر رده‌های سلولی این بافت‌ها در کشت سلول (۲۴، ۲۳، ۱۹، ۱۷، ۱۲) بنظر می‌رسد تغییرات موضعی بیان ژن این هورمون و گیرنده‌های آن در طول سیکل فحلی بر عملکرد بافت‌های مذکور مؤثر باشد. با توجه به اهمیت هورمون ادیپونکتین در کنترل متابولیسم کربوهیدرات‌ها و لیپیدها و اختلالات وسیع متابولیکی در گاوهای پر تولید که بر هیپوتالاموس و هیپوفیز تأثیر قابل توجه دارد، شناسایی تغییرات بیان این هورمون و گیرنده‌ها در این بافت‌ها ضروری می‌باشد. لذا هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن‌های ادیپونکتین و گیرنده‌های ۱ و ۲ آن در هیپوتالاموس و هیپوفیز در مراحل مختلف سیکل فحلی و ارتباط آن با تغییرات هورمون‌های جنسی در گاوهای ماده هلستاین می‌باشد.

## مواد و روش کار

**تعیین مراحل سیکل فحلی و نمونه‌گیری:** در این مطالعه از گاوهای هلستاین ماده سنین بین ۳-۵ سال در کشتارگاه شیراز نمونه‌گیری بعمل





تصویر ۱. الکتروفورز محصول PCR ادیپونکتین در بافت‌های هیپوفیز قدامی (۳)، هیپوتالاموس جانبی (۴) و میانی (۵)، AdipoR۱ در بافت‌های هیپوفیز قدامی (۶)، هیپوتالاموس جانبی (۷) و میانی (۸) و AdipoR۲ در بافت‌های هیپوفیز قدامی (۹)، هیپوتالاموس جانبی (۱۰) و میانی (۱۱). ۱: نشانگر اندازه DNA bp ۲۰۰۰؛ کنترل منفی فاقد cDNA.

بیان ژن ادیپونکتین در هیپوتالاموس میانی از مت استروس بطرف پرو استروس بطور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0/05$ ) بطوریکه بالاترین میزان بیان آن مربوط به مرحله مت استروس و ابتدای لوتتال و پایین‌ترین بیان آن مربوط به پرو استروس بود. بیان AdipoRI در مراحل پرو استروس، مت استروس و ابتدای گامه لوتتال تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $p > 0/05$ ) اما میزان بیان آن در انتهای گامه لوتتال بطور معنی‌داری بالاتر از سایر مراحل بود ( $p < 0/05$ ). بیان AdipoRII در مراحل انتهایی گامه لوتتال و پرو استروس بطور معنی‌داری بیشتر از سایر مراحل بود ( $p < 0/05$ ).

نمودار ۳ بیان ژن‌های ادیپونکتین، AdipoRI و AdipoRII در هیپوتالاموس جانبی در بخش‌های مختلف سیکل فحلی شامل پرو استروس، مت استروس، ابتدا و انتهای گامه لوتتال را نشان می‌دهد. بالاترین میزان بیان ادیپونکتین در هیپوتالاموس جانبی مشابه با هیپوتالاموس میانی در ابتدای لوتتال مشاهده شد ( $p < 0/05$ ). بیان ادیپونکتین در هیپوتالاموس جانبی از مت استروس بطرف پرو استروس در طول یک سیکل فحلی بطور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0/05$ ). بالاترین میزان بیان آن مربوط به ابتدای لوتتال و پایین‌ترین آن مربوط به مت استروس و پرو استروس بود ( $p < 0/05$ ). بیان AdipoRI در طول سیکل فحلی در هیپوتالاموس جانبی مشابه آنچه در مورد هیپوفیز قدامی بدست آمد، همراه با تغییرات معنی‌دار نبود ( $p > 0/05$ ). بیان AdipoR۲ در دوره پرو استروس نسبت به سایر مراحل بطور معنی‌داری بالاتر بود اما بیان این ژن در سایر بخش‌های سیکل فحلی تفاوت آماری معنی‌داری نداشت.

جدول ۴ ارتباط بین تغییرات بیان ادیپونکتین، AdipoR۱ و AdipoR۲ در بافت‌های مورد مطالعه با مقادیر هورمون‌های استروژن و پروژسترون را نشان می‌دهد. ارتباط معنی‌دار معکوس بین بیان ادیپونکتین در بافت‌های هیپوفیز ( $r = -0/864$ ،  $p < 0/01$ )، هیپوتالاموس میانی ( $r = -0/741$ )، هیپوفیز ( $r = -0/719$ ) و هیپوتالاموس جانبی ( $r = -0/719$ ) مشاهده شد.

مقایسه‌ای  $\Delta\Delta Ct$  و دستگاه MiniOptionTm محصول شرکت بیوراد و کیت تجاری qPCR Probe Master (Bioneer، کره) استفاده شد. روش آزمون بر پایه کاربرد پروبهای TaqMan نشاندار با رنگ فلئورسنت ۶- کربوکسی فلئورسینس (FAM) در انتهای ۵' و ترکیب خاموشگر ۶- کربوکسی تترامیتیل رودامین (TAMRA) در انتهای ۳' پروب استوار بود. از ژن بتا اکتین به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. همه نمونه‌ها بصورت تکرار سه تایی ارزیابی شدند.

روش مورد استفاده در آنالیز داده‌ها بر پایه روش  $\Delta\Delta Ct$  استوار بود. مقادیر مقایسه‌ای بیان ژن‌های مورد نظر در مقایسه با بیان بتا اکتین در هر بافت توسط نرم افزار ۳ Opticon monitor ارزیابی و بر اساس رابطه  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  گزارش گردید.

**اندازه‌گیری هورمونی:** مقادیر هورمون‌های استرادیول و پروژسترون با استفاده از روش الیزا (ALPCO Diagnostics، آمریکا) و طبق دستور العمل کیت انجام شد. برای هر دو تست ضریب داخلی آزمون کمتر از ۶٪ و ضریب خارجی کمتر از ۷/۵٪ بود. به منظور اندازه‌گیری هورمون استرادیول از شش کالیبراتور با غلظت‌های ۲۰، ۳۰۰، ۱۰۰۰، ۸۰۰ و ۳۳۰۰ pg/mL و به منظور اندازه‌گیری هورمون پروژسترون از پنج کالیبراتور با غلظت‌های ۰/۴، ۵/۵، ۶/۱، ۲۵ و ۱۰۰ ng/mL استفاده شد.

**آنالیز آماری:** تمام داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۶ آنالیز و بر اساس میانگین انحراف معیار نشان داده شدند. جهت مقایسه بین میانگین‌های مختلف از تست آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و LSD استفاده شد. تست ارتباط پارامتریک پیرسون به منظور بررسی ارتباط تغییرات مقدار mRNA ژن‌های مختلف و هورمون‌ها مورد استفاده قرار گرفت. سطح معنی‌داری تست‌های آماری  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد.

## نتایج

الکتروفورز محصولات واکنش PCR نشان‌دهنده بیان ژن‌های ادیپونکتین (۱۳۹bp)، گیرنده ۱ (AdipoR۱) (۱۰۱bp) و گیرنده ۲ (AdipoR۲) (۱۰۹bp) در بافت‌های هیپوتالاموس و هیپوفیز بود (تصویر ۱).

نمودار ۱ بیان ژن‌های ادیپونکتین، AdipoRI و AdipoRII را در هیپوفیز قدامی در بخش‌های مختلف سیکل فحلی شامل پرو استروس، مت استروس، ابتدا و انتهای گامه لوتتال نشان می‌دهد. بیشترین میزان بیان ادیپونکتین مربوط به گامه لوتتال و کمترین میزان بیان آن مربوط به پرو استروس و مت استروس بود ( $p < 0/05$ ). بیان AdipoRI در طول سیکل تغییرات آماری معنی‌داری نداشت ( $p > 0/05$ ) اما میزان بیان AdipoRII در گامه لوتتال کمتر از دوره‌های پرو استروس و مت استروس بود ( $p < 0/05$ ). نمودار ۲ تغییرات بیان ژن‌های ادیپونکتین، AdipoRI و AdipoRII را در هیپوتالاموس میانی در بخش‌های مختلف سیکل فحلی نشان می‌دهد.

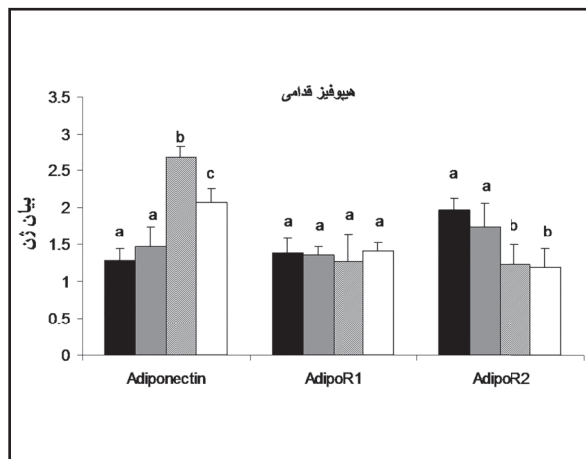


همچنین ارتباط معنی‌دار مثبت بین مقدار هورمون پروژسترون و بیان ادیپونکتین در بافت‌های هیپوفیز ( $r=0/762$ ,  $p<0/01$ )، هیپوتالاموس میانی ( $r=0/752$ ,  $p<0/01$ ) و هیپوتالاموس جانبی ( $r=0/637$ ,  $p<0/01$ ) مشاهده شد. بین مقدار هورمون استروژن بیان AdipoR1 در بافت‌های مورد مطالعه ارتباط آماری معنی‌دار مشاهده نشد اما ارتباط مثبت معنی‌داری بین مقدار استروژن و تغییرات بیان ژن AdipoR2 در بافت‌های هیپوفیز ( $r=0/597$ ,  $p<0/05$ )، هیپوتالاموس میانی ( $r=0/613$ ,  $p<0/05$ ) و هیپوتالاموس جانبی ( $r=0/547$ ,  $p<0/05$ ) مشاهده شد. بیان AdipoR2 تنها در بافت هیپوفیز قدامی با پروژسترون دارای ارتباط آماری معنی‌دار مثبت بود ( $r=0/572$ ,  $p<0/05$ ) اما در سایر بافت‌ها ارتباط آماری معنی‌دار مشاهده نشد.

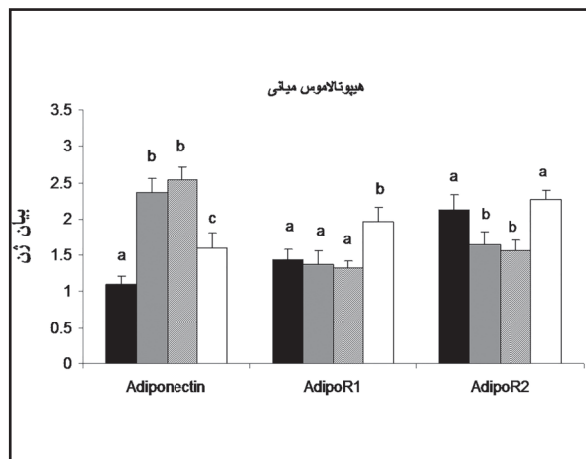
### بحث

شواهد موجود نشان دهنده نقش ادیپونکتین در باروری جنس ماده بدلیل تأثیر بر بخش‌های مختلف سیستم تولید مثلی می‌باشد. در پستانداران بویژه گاو مصرف چربی در جیره غذایی بر روی عملکرد تولید مثلی تأثیر مطلوب می‌گذارد. مصرف اسید چرب در جیره غذایی سبب افزایش تعداد فولیکول‌ها و تحریک رشد فولیکول‌ها پیش از تخمک گذاری می‌شود (۴). با توجه به اینکه عملکرد اصلی ادیپونکتین در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و چربی شناخته شده است می‌توان این اثرات را به عمل هماهنگ مسیرهای انتقال سیگنال PPAR و AMPK مؤثر بر متابولیسم لیپید و کربوهیدرات که همگی توسط ادیپونکتین القا می‌شوند نسبت داد (۱۷، ۱۶، ۹). بیان گیرنده‌های ادیپونکتین در بخش‌هایی از هیپوتالاموس و سلول‌های اندوتلیال شبکه کورویید شناسایی شده است و بنظر می‌رسد این گیرنده‌ها در انتقال پروتئین به مغز و اثرات مرکزی هورمون نقش داشته باشند (۱۷، ۱۲). علی‌رغم تایید بیان گیرنده‌های ۱ و ۲ ادیپونکتین در سلول‌های اندوتلیومی مغز و هیپوتالاموس نقش حقیقی ادیپونکتین در سیستم عصبی مرکزی مبهم است. تزریق وریدی ادیپونکتین منجر به افزایش سه برابری ادیپونکتین در مایع مغزی-نخاعی می‌شود. لذا به نظر می‌رسد ادیپونکتین از سد خونی مغزی عبور می‌نماید (۱۷، ۱۲). مطالعات انجام شده بر روی ادیپونکتین در حیوانات اهلی و نقش‌های احتمالی آن بر تولید مثل بسیار اندک و در مراحل ابتدایی می‌باشد.

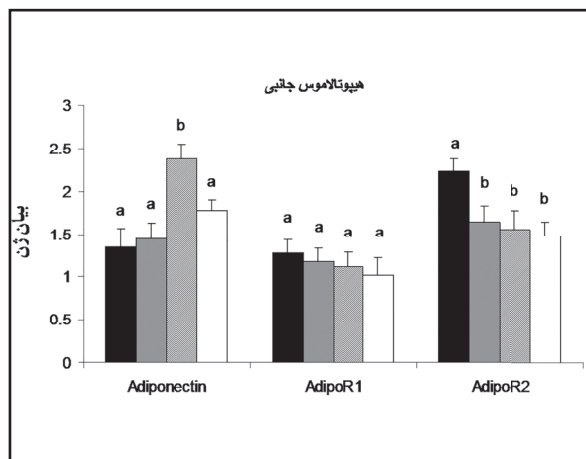
در مطالعه حاضر بیان ادیپونکتین و گیرنده‌های آن در هیپوتالاموس و هیپوفیز در طول سیکل فحلی در گاو ماده مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده بیان ادیپونکتین و گیرنده‌های آن در بافت‌های هیپوتالاموس و هیپوفیز قدامی بود. بیان ادیپونکتین در هیپوفیز قدامی در طول سیکل فحلی تغییرات قابل توجهی را نشان داد. بطوریکه بیشترین میزان بیان ادیپونکتین مربوط به گامه لوتئال و کمترین میزان آن مربوط به پرو استروس و مت استروس بود. میزان بیان AdipoR2 در



نمودار ۱. مقایسه بیان ژن‌های ادیپونکتین، AdipoRI و AdipoR2 در هیپوفیز قدامی در بخش‌های مختلف سیکل فحلی. حروف متفاوت در بالای هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p<0/05$  می‌باشد. مت استروس (■)، پرو استروس (■)، انتهای لوتئال (▨)، ابتدای لوتئال (□)



نمودار ۲. مقایسه بیان ژن‌های ادیپونکتین، AdipoRI و AdipoR2 در هیپوتالاموس میانی در بخش‌های مختلف سیکل فحلی. حروف متفاوت در بالای هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p<0/05$  می‌باشد. مت استروس (■)، پرو استروس (■)، انتهای لوتئال (▨)، ابتدای لوتئال (□)



نمودار ۳. مقایسه بیان ژن‌های ادیپونکتین، AdipoRI و AdipoR2 در هیپوتالاموس جانبی در بخش‌های مختلف سیکل فحلی. حروف متفاوت در بالای هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p<0/05$  می‌باشد. مت استروس (■)، پرو استروس (■)، انتهای لوتئال (▨)، ابتدای لوتئال (□)



جدول ۱. تعیین مراحل مختلف سیکل فحلی گاو بر اساس خصوصیات مورفولوژیک تخمدان (Ireland, ۱۹۸۰).

بافت جسم زرد	ویژگی	روز سیکل فحلی		
		۱۸-۲۱	۱۵-۱۷	۵-۱۴
بخش خارجی	سطح	پوشیده شده با سلول‌های لوتئال و بافت پیوندی	پوشیده شده با سلول‌های لوتئال	پوشیده شده با سلول‌های لوتئال
	رنگ	زرد روشن تا سفید	نارنجی تا زرد پر رنگ	قهوه ای روشن خرمایی تا نارنجی
	قطر (Cm)	۱-۲	۲/۲-۲/۵	۱/۸-۲/۸
	شبکه عروقی در سطح	شبکه ی عروقی در حال تحلیل در راس و اطراف	شبکه ی عروقی توسعه یافته در راس و اطراف	عروق در حال رشد در راس و به میزان کمتر در اطراف
بخش داخلی	راس	نارنجی تا زرد	نارنجی	قهوه ای، خرمایی
	سایر نواحی	زرد	نارنجی تا زرد	نارنجی قرمز - خرمایی تا نارنجی
	فاصله ی بین جسم زرد و استرومای تخمدانی	واضح با ملامسه	واضح با ملامسه	کاملاً مشخص و مجزا
	خونریزی از جسم زرد در زمان برش	-	+/-	+
	قوام	کاملاً سفت	فشرده تا سفت	فشرده و ارتجاعی
	قطر فولیکول (mm)	>۱۵	۱۰-۱۵	۵-۱۵
				۲۵ و دارای ناحیه ی تخمک گذاری مشخص

جدول ۲. خصوصیات مورفولوژیک رحم و سرویکس بر اساس معاینه ظاهری و تعیین مرحله سیکل فحلی گاو بر اساس آن (Arosh, ۲۰۰۲).

بافت	ویژگی	روز سیکل فحلی		
رحم	تونیستی	۱۸-۲۱	۱۵-۱۷	۵-۱۴
	اندومترיום	+	-	-
	رنگ	صورتی رنگ پریده	صورتی رنگ پریده	صورتی یا صورتی رنگ پریده
	ادم	+/-	-	-
سرویکس	موکوس	+/-	-	-
	حضور	+/-	-	-
	رنگ	شفاف	شفاف	شفاف تا قهوه ای کدر
	بسته یا باز بودن	بسته	بسته	باز و شل

استرادیول و پروژسترون در طول سیکل فحلی گاو با تغییرات بیان ادیپونکتین در بافت‌های مورد مطالعه بترتیب دارای ارتباط منفی و مثبت بودند. این در حالیست که تغییرات پروژسترون و استروژن با بیان AdipoR<sub>2</sub> بویژه در بافت هیپوفیز ارتباط مثبت داشتند.

مطالعه‌ای در خصوص تغییرات بیان ادیپونکتین و گیرنده‌های آن در بافت‌های عصبی در طول سیکل فحلی گاو در دسترس نمی‌باشد. از اینرو تفسیر تغییرات ژن‌های سیستم ادیپونکتین در بافت‌های عصبی مذکور نیازمند تحقیقات گسترده‌تری می‌باشد. با این وجود اطلاعات معدودی در سایر گونه‌ها به غیر از گاو در خصوص بیان ژن‌های سیستم ادیپونکتین در بخش‌های مختلف سیستم عصبی یا تغییرات آنها تحت تأثیر عوامل هورمونی متعدد در شرایط آزمایشگاهی بدست آمده است. گیرنده ۱

گامه لوتئال کمتر از دوره‌های پرو استروس و مت استروس بود و این در حالیست که بیان AdipoR<sub>1</sub> در بخش‌های مختلف سیکل فحلی تغییرات قابل توجهی را نشان نداد.

در بخش‌های مختلف هیپوتالاموس بیان ادیپونکتین از مت استروس بطرف پرو استروس در طول سیکل فحلی کاهش یافت بطوریکه بالاترین میزان بیان آن مربوط به ابتدای لوتئال و پایین‌ترین آن مربوط به پرو استروس بود. اگر چه بیان AdipoR<sub>1</sub> در هیپوتالاموس میانی در مراحل پرو استروس، مت استروس و ابتدای گامه لوتئال تغییری نداشت اما میزان بیان آن در انتهای گامه لوتئال بالاتر از سایر مراحل بود. الگوی تقریباً مشابهی در مورد بیان AdipoR<sub>2</sub> در هیپوتالاموس میانی بدست آمد بطوریکه بیان آن در مراحل انتهایی گامه لوتئال و پرو استروس بیشتر از سایر مراحل بود. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که تغییرات هورمون‌های



جدول ۳. لیست، توالی و خصوصیات پرایمرها و پروبهای TaqMan مورد استفاده در این مطالعه.

نام ژن	توالی پرایمر (R و F) و پروب (P)	دمای ذوب (C°)	عدد توافق بانک ژن	اندازه محصول PCR (bp)
Adiponectin	F: TCTTACCTACGACCAGTATCAG	۵۶	NC-۰۰۷۲۹۹	۱۳۹
	R: ACATTATCTGCATAGACCCCATG	۵۶		
	P: TTCACCCTCGTACACCTGGAGCCA	۶۰		
AdipoR1	F: CTCATCTACCTCTCCATCGTCTG	۵۴	NM-۰۰۱۰۳۴۰۵۵	۱۰۱
	R: CCTGCTCTTGCTGCGGCTGCTTG	۵۴		
	P: CATCTCCGCCATCATCGTGGCGCA	۶۰		
AdipoR2	F: AGGTCGGGAGCGTCTGTAG	۵۶	NM-۰۰۱۰۴۰۴۹۹	۱۰۹
	R: CATGAACCCCTCATCTTCCTGAG	۵۶		
	P: CATCGCACTCACGCTCCTCCACGC	۶۰		
$\beta$ -Actin	F: TGCCCATCTATGAGGGGTACG	۵۸	NM-۱۷۳۹۷۹	۱۰۳
	R: CAACGTTCCGTGAGGATCTTCA	۵۸		
	P: CCATGCCATCCTGCGTCTGGACCT	۶۰		

جدول ۴. ارتباط بین بیان ژنهای ادیپونکتین، AdipoR1 و AdipoR2 در بافت‌های هیپوتالاموس و هیپوفیز با سطح سرمی هورمون‌های پروژسترون و استرادیول در طول سیکل فحلی گاو.

هیپوتالاموس میانی			هیپوفیز قدامی		
AdipoR2	AdipoR1	ادیپونکتین	AdipoR2	AdipoR1	ادیپونکتین
r			r		
۰/۵۴۷*	۰/۲۰۷	-۰/۷۱۹**	۰/۶۱۳*	۰/۱۲۳	-۰/۷۴۱**
۰/۴۲۰	۰/۱۷۸	۰/۶۳۷*	۰/۴۴۱	۰/۱۳۷	۰/۷۵۲**

نسبت داد. بدین صورت که با کاهش ادیپونکتین در بافت‌های مذکور اثرات مهاری فوق‌فوق قبل از تخمک‌گذاری برداشته می‌شود. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که موش‌های ترانسژن با بیان بالای ادیپونکتین نابارور هستند (۱۶). براساس شواهد ارائه شده فوق‌مبنی بر اثر مهاری ادیپونکتین بر سلول‌های گنادوتروپ به نظر می‌رسد بخشی از ناباروری در مدل‌های آزمایشگاهی ناشی از اثر مهاری این هورمون بر هیپوفیز باشد. کاهش ترشح LH و پالس‌های هورمون رشد که در زمان گرسنگی (۲۸) در گاو اتفاق می‌افتد ممکن است از راه افزایش ادیپونکتین در پاسخ به کاهش وزن قابل تفسیر باشد که نشانه‌ای از اثرات ادیپونکتین بر هیپوفیز در سازگاری با شرایط گرسنگی می‌باشد.

در موش‌های ترانسژن کوتوله اسنل که دارای جهش در ژن Pit-1 و نقص در عملکرد هورمون‌های هیپوفیز قدامی مانند پرولاکتین، هورمون آزادکننده تیروئیدی و هورمون رشد هستند افزایش پلاسمایی ادیپونکتین و افزایش حساسیت به انسولین مشاهده شده است (۱). این یافته نشان‌دهنده تأثیرات متقابل هورمون‌های هیپوفیز و ادیپونکتین می‌باشد که به همراه عملکرد استروژن و پروژسترون محیطی بر تغییرات ترشحات این هورمون‌ها کنترل وقایع تولید مثلی در بافت‌های محیطی بویژه تخمدان انجام می‌شود. اگر چه در مورد تأثیر استروژن و پروژسترون بر تغییرات بیان ادیپونکتین و گیرنده‌های آن در بافت مغز اطلاعاتی در دسترس نیست اما مطالعات موجود نشان می‌دهد که برداشت تخمدان در موش سبب

ادیپونکتین در بخش‌های مختلف مغز موش و انسان بطور گسترده‌ای بیان می‌شود اما بیان گیرنده نوع ۲ منحصر به نقاطی خاصی از مغز می‌باشد. بالاترین میزان بیان گیرنده ۲ ادیپونکتین در هسته‌های پاراونتریکولار می‌باشد که در ارتباط با تنظیم هموستاز انرژی هستند (۲۳). بیان بالای ادیپونکتین در غده هیپوفیز انسان نیز گزارش شده است. در ناحیه دیستال هیپوفیز قدامی ادیپونکتین به همراه گیرنده‌های آن در سلول‌های ترشح‌کننده هورمون محرک تیروئیدی (TSH)، هورمون رشد (GH)، هورمون لوتئینه‌کننده (LH) و هورمون محرک فولیکولی (FSH) بیان می‌شود در حالی که در ناحیه توبولار تنها ادیپونکتین در سلول‌های ترشح‌کننده TSH, LH بیان می‌شود و بیان گیرنده‌های ادیپونکتین در این نواحی تأیید نشده است (۲۳). بیان بالای گیرنده ۱ در نورون‌های هیپوتالاموس جانبی و هسته‌های قاعده‌ای مینرت گزارش شده است (۲۳).

در سلول‌های گنادوتروپ، ادیپونکتین سبب مهار آزادسازی هورمون LH و کاهش بیان گیرنده GnRH می‌شود (۱۹، ۲۴). با توجه به کاهش ادیپونکتین پلازما همزمان با بلوغ در انسان و حیوانات آزمایشگاهی (۲۲) و نیز نقش این هورمون در مهار ترشح پایه و تحریک شده GnRH از هیپوفیز (۱۹، ۲۴) می‌توان نقش آن در مهار عملکرد تولید مثلی را تأیید نمود. از این رو شاید بتوان کاهش بیان ادیپونکتین در هیپوفیز قدامی و هیپوتالاموس در انتهای گامه فولیکولار و پرو استروس که در این مطالعه مشاهده گردید را به اثرات مهاری ادیپونکتین در افزایش ناگهانی پیش از تخمک‌گذاری LH و نیز اثر مهاری آن بر بیان گیرنده‌های GnRH



## References

1. Alderman, J.M., Flurkey, K., Brooks, N.L., Naik, S.B., Gutierrez, J.M., Srinivas, U., Ziara, K.B., Jing, L., Boysen, G., Bronson, R., Klebanov, S., Chen, X., Swenberg, J.A., Stridsberg, M., Parker, C.E., Harrison, D.E., Combs, T.P. (2009) Neuroendocrine inhibition of glucose production and resistance to cancer in dwarf mice. *Exp Gerontol.* 44: 26-33.
2. Archanco, M., Gómez-Ambrosi, J., Tena-Sempere, M., Frühbeck, G., Burrell, M.A. (2007) Expression of Leptin and Adiponectin in the Rat Oviduct. *J Histochem Cytochem.* 55: 1027-1037.
3. Arosh, J.A., Parent, J., Chapdelaine, P., Sirois, J., Fortier, M.A. (2002) Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biol Reprod.* 67: 161-169.
4. Butler, W.R. (2000) Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci.* 60: 449-57.
5. Caminos, J.E., Nogueiras, R., Gaytán, F., Pineda, R., González, C.R., Barreiro, M.L., Castaño, J.P., Malagón, M.M., Pinilla, L., Toppari, J., Diéguez, C., Tena-Sempere, M. (2008) Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis. *Endocrinology.* 149: 3390-402.
6. Carmina, E., Orio, F., Palomba, S., Cascella, T., Longo, R.A., Colao, A.M., Lombardi, G., Lobo, R.A. (2005) Evidence for altered adipocyte function in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.* 152: 389-394.
7. Combs, T.P., Berg, A.H., Rajala, M.W., Klebanov, S., Iyengar, P., Jimenez-Chillaron, J.C., Patti, M.E., Klein, S.L., Weinstein, R.S., Scherer, P.E. (2003) Sexual Differentiation, Pregnancy, Calorie Restriction, and Aging Affect the Adipocyte-Specific Secretory Protein Adiponectin. *Diabetes.* 52: 268-276.
8. Dai, M.H., Xia, T., Zhang, G.D., Chen, X.D., Gan, L., Feng, S.Q., Qiu, H., Peng, Y., Yang, Z.Q. (2006) Cloning, expression and chromosome localization of porcine adiponectin and adiponectin receptors genes. *Domest Anim Endocrinol.* 30: 117-125.

افزایش ادیپونکتین پلازما و استروژن در ادیپوسیت‌های رده L1-3T3 سبب سرکوب بیان ادیپونکتین می‌شوند (۱۰). این یافته می‌تواند توجیهی بر نتایج این مطالعه مبنی بر وجود رابطه منفی بین تغییرات بیان ادیپونکتین در هیپوفیز و هیپوتالاموس و استروژن سرمی باشد. در پایان نتایج این تحقیق نشان داد که بیان ادیپونکتین و گیرنده‌های آن در بافت‌های هیپوفیز و هیپوتالاموس گاو ماده در طول سیکل فحلی و همزمان با تغییرات هورمون‌های استرادیول و پروژسترون تغییر می‌کند. با توجه به مطالعات موجود در خصوص نقش مهاری ادیپونکتین بر ترشح هورمون‌های LH و GnRH در هیپوتالاموس و هیپوفیز می‌توان حلقه هورمونی نوینی بین استرادیول، پروژسترون، هورمون‌های مترشحه از هیپوفیز و ادیپونکتین در کنترل وقایع تولید مثلی در گاو مفروض دانست. احتمالاً همزمان با افزایش ترشح استرادیول تخمدانی در اواخر گامه لوتئال و پرو استروس اثر مهاری استروژن بر بیان ادیپونکتین در بافت‌های هیپوفیز و هیپوتالاموس تشدید می‌شود. این وضعیت می‌تواند منجر به کاهش اثر سرکوبی ادیپونکتین بر ترشح LH و GnRH در بافت‌های هیپوفیز و هیپوتالاموس گردد و امکان افزایش هورمون‌های اخیر همزمان با استروس را فراهم نماید.

## تشکر و قدردانی

این مطالعه از محل پژوهانه معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز (Grant No: ۶۳۶۴۱۰/۴/۶/۱۳۹۱) و معاونت پژوهشی دانشگاه شیراز تأمین گردیده است.

9. Donohoue, P.A. (2008) Contemporary Endocrinology, Energy Metabolism and Obesity; Research and Clinical Applications. (1<sup>st</sup> ed.) Humana Press, New York, USA.
10. Fasshauer, M., Klein, J., Kralisch, S., Klier, M., Ossner, U., Uher, M., Paschke, R. (2004) Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS. Letters.* 558: 27-32.
11. Gaudreau, K.B., Beaudry, D., Blouin, R., Bordignon, V., Murphy, B.D., Palin, M.F. (2008) Adiponectin Regulates Gene Expression in the Porcine Uterus. *Biol Reprod.* 211: 664.
12. Guillod-Maximin, E., Roy, A.F., Vacher, C.M., Aubourg, A., Bailleux, V., Lorsignol, A., Péni-caud, L., Parquet, M., Taouis, M. (2009) Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiomelanocortin and



- neuropeptide Y in rodent arcuate neurons. *J Endocrinol.* 200: 93-105.
13. Ishioka, K Omachi, A., Sagawa, M., Shibata, H., Honjoh, T., Kimura, K., Saito, M. (2006) Canine adiponectin: cDNA structure, mRNA expression in adipose tissues and reduced plasma levels in obesity. *Res Vet Sci.* 80: 127-132.
  14. Ishioka, K., Omachi, A., Sasaki, N., Kimura, K., Saito, M. (1980) Feline Adiponectin: Molecular Structures and Plasma Concentrations in Obese Cats. *J Vet Med Sci.* 71: 189-194.
  15. Ireland, J.J., Murphee, R.L., Coulson, P.B. (1980) Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J Dairy Sci.* 63: 155.
  16. Kadowaki, T., Yamauchi, T. (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 26: 439-451.
  17. Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Okamoto, S., Shiuchi, T., Suzuki, R., Satoh, H., Tsuchida, A., Moroi, M., Sugi, K., Noda, T., Ebinuma, H., Ueta, Y., Kondo, T., Araki, E., Ezaki, O., Nagai, R., Tobe, K., Terauchi, Y., Ueki, K., Minokoshi, Y., Kadowaki, T. (2007) Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab.* 6: 55-68.
  18. Lagaly, D.V., Aad, P.Y., Grado-Ahuir, J.A., Hulsey, L.B., Spicer, L.J. (2008) Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Mol Cell Endocr.* 284: 38-45.
  19. Lu, M., Tang, Q., Olefsky, J.M., Mellon, P.L., Webster, N.J. (2008) Adiponectin activates adenosine monophosphate-activated protein kinase and decreases luteinizing hormone secretion in L $\beta$ T2 gonadotropes. *Mol Endocrinol.* 22:760-771.
  20. Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Tochino, Y., Okutomi, K., Horie, M., Takeda, S., Aoyama, T., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. (2002) Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/aCRP30. *Nat Med.* 8: 731-737.
  21. Matsuda, M., Shimomura, I., Sata, M., Arita, Y., Nishida, M., Maeda, N., Kumada, M., Okamoto, Y., Nagaretani, H., Nishizawa, H., Kishida, K., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Nagai, R., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. (2002) Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem.* 277: 37487-37491.
  22. Mitchell, M., Armstrong, D.T., Robker, R.L., Norman, R.J. (2005) Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction.* 130: 583-597.
  23. Psilopanagioti, A., Papadaki, H., Kranioti, E.F., Alexandrides, T.K., Varakis, J.N. (2009) Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain. *Neuroendocrinology.* 89: 38-47.
  24. Rodriguez-Pacheco, F., Martinez-Fuentes, A.J., Tovar, S., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., Dieguez, C., Castano, J.P., Malagon, M.M. (2007) Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology.* 148: 401-410.
  25. Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., Lodish, H.F. (1995) A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 270: 26746-26749.
  26. Tabandeh, M.R., Hosseini, A., Kafi, M., Saeb, M., Saeb, S. (2010) Changes in the gene expression of adiponectin and adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in ovarian follicular cells of dairy cow at different stages of development. *Theriogenology* 15: 659-69.
  27. Tabandeh, M.R., Golestani, N., Kafi, M., Hosseini, A., Saeb, M., Sarkoobi, P. (2012) Gene expression pattern of adiponectin and adiponectin receptors in dominant and atretic follicles and oocytes screened based on brilliant cresyl blue staining. *Anim Reprod Sci.* 131: 30-40.
  28. Wathes, D.C., Fenwick, M., Cheng, Z., Bourne, N., Liewellyn, S, Morris, D.G. (2007) Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in high producing dairy cow. *Theriogenology.* 68: 232-41.
  29. Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A.,





Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, NH., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., Kadowaki, T. (2004) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 423: 762–769.



## Gene expression of adiponectin and its receptors in hypothalamus and pituitary of Holstein cattle during the estrous cycle

Tabandeh, M.R.<sup>1\*</sup>, Hosseini, A.<sup>2</sup>, Saeb, M.<sup>3</sup>, Kafi, M.<sup>4</sup>, Kabiri, N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

<sup>2</sup>Department of Immunology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

<sup>4</sup>Department of Clinical Science, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

(Received 29 July 2015, Accepted 19 October 2015)

### Abstract:

**BACKGROUND:** Adiponectin is one of the most important adipocytokines that regulate male and female fertility via AdipoR1 and AdipoR2 receptors. Recently expression of adiponectin system and its negative regulatory role on hypothalamus-pituitary axis have been confirmed. **OBJECTIVES:** No information is available about the expression pattern of adiponectin and its receptors in hypothalamus-pituitary axis in domestic animals. Here for the first time, we studied hypothalamus-pituitary adiponectin system gene expression in different stages of bovine estrous cycle. **METHODS:** Anterior pituitary and hypothalamus were collected from Holstein cow at the local abattoir. The estrous cycle was classified to four phases (proestrous, metestrous, early luteal and late luteal) based on macroscopic examination of ovaries and uteri. Gene expression analysis of adiponectin and its receptors was done using quantitative real time PCR (qPCR Probe MasteKit) and according to the comparative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. E2 and P4 levels were measured using ELISA method. **RESULTS:** Our results demonstrated that adiponectin and its two receptors were expressed in pituitary and hypothalamus of cyclic cow. Maximal expression of adiponectin was observed in early luteal phase, while it was expressed at minimal level during the proestrous stage. We observed no significant changes in the expression of AdipoR1 in both tissues at different stages of estrous cycle. The highest expression of AdipoR2 in both tissues was detected during the proestrous stage, while it expressed at minimal level during the late luteal phase. E2 and P4 had respectively negative and positive correlations with adiponectin expression levels in hypothalamus and pituitary. **CONCLUSIONS:** Based on our results that demonstrated adiponectin was minimally expressed at proestrous stage and other data about the negative action of adiponectin on LH secretion from pituitary, we concluded that adiponectin may has role in the hormonal function of this axis during the estrous cycle.

**Keyword:** adiponectin, cow, estrous cycle, hypothalamus, pituitary

### Figure Legends and Table Captions

**Figure 1.** Electrophoresis of PCR products. Adiponectin in anterior pituitary (3), lateral hypothalamus (4) and median hypothalamus (5). AdipoR1 in anterior pituitary (6), lateral hypothalamus (7) and median hypothalamus (8). AdipoR2 in anterior pituitary (9), lateral hypothalamus (10) and median hypothalamus (11). 1: DNA sized marker 100 bp, negative control without cDNA.

**Graph 1.** Expression of adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 genes in anterior pituitary.

**Graph 2.** Expression of adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 genes in median hypothalamus.

**Graph 3.** Expression of adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 genes in lateral hypothalamus.

**Table 1.** Determination of estrous cycle stages based on morphology of ovaries.

**Table 2.** Determination of estrous cycle stages based on morphology of uterus and cervix.

**Table 3.** Primers and probes sequences, used in this study.

**Table 4.** Correlations between expression of target genes in hypothalamus and pituitary tissues and sex hormones.

\*Corresponding author's email: m.tabandeh@scu.ac.ir, Tel: 0613-333078, Fax: 0613-3330807

