تغییرات غلظت پلاسمایی هورمونهای تیروئیدی در گوسفندان تحت محدودیت انرژی و اثر تزریق وریدی لپتین بر آن

آرمین توحیدی[1]* همایون خزعلی[2] امیر نیاسری[3] مهدی ژندی[4]

دریافت مقاله: ۶ خردادماه ۱۳۸۵
پذیرش نهایی: ۲۲شهریورماه ۱۳۸۵

هدف مطالعه حاضر، تعیین تغییرات غلظت هورمون‌های لپتین و تیروئیدی در میش‌های تحت محدودیت انرژی و اثر تزریق لپتین بر ترشح غده تیروئید پس از کاهش سطح هورمونها در اثر محدودیت انرژی بود. درآزمایش اول، ۲۸ رأس میش به دو گروه چهارده رأسی تقسیم و ۷۱ روز از جیرهٔ حاوی ۶۰درصد یا ۱۰۰درصد انرژی نگهداری تغذیه‌شدند. نمونه‌های خون اخذ ووزن وامتیاز وضعیت بدن تعیین‌گردید. درآزمایش دوم، ۶ رأس میش تحت محدودیت انرژی ازآزمایش اول انتخاب وبه دو گروه سه رأسی تقسیم و ضمن تغذیه در حد ۶۰درصد انرژی نگهداری به ترتیب ۱ یا ۴ BW µg/kg لپتین دریافت نمودند. نمونه‌های خون اخذ ووزن وامتیاز وضعیت بدن تعیین شد. درآزمایش اول، غلظت هورمونهای تیروئیدی ولپتین، وزن وامتیاز وضعیت بدن درگروه تحت محدودیت انرژی کاهش یافت. درآزمایش دوم، تزریق لپتین، موجب افزایش غلظت T_3 و T_4 ولپتین‌شد. نتایج نشان داد که لپتین قادر به تقلیل اثر کاهندهٔ محدودیت انرژی بر ترشح هورمونهای تیروئیدی در میش است. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۱، ۲۰-۱۵.

واژه‌های کلیدی: لپتین، هورمونهای تیروئیدی، محدودیت انرژی، میش.

هورمونهای تیروکسین(T_4) و تری یدوتیرونین(T_3) در متابولیسم انرژی نقش اساسی داشته و سطح آنها در خون، میزان متابولیسم پایه را در بدن تعیین می‌کند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند، تغییرات غلظت هورمونهای تیروئیدی در خون در ارتباط مستقیم با سطح خوراک مصرفی است(۳،۷،۸،۱۷). درنشخوارکنندگان، کاهش سطح خوراک مصرفی موجب کاهش ترشح و غلظت پلاسمایی T_3 و T_4 شده است(۷،۲۵). دراسبهای نابالغ و بالغ با محدودیت غذایی کوتاه مدت، هورمون T_3 کاهش و با افزایش سطح تغذیه بلافاصله افزایش یافته است(۸،۱۸). دریک آزمایش دیگر، محدودیت غذایی طولانی مدت درکره اسب نیز موجب کاهش سطح T_3 شد(۱۲).

از سوی دیگر در سالهای اخیر مشخص شده است که هورمون لپتین نقش مهمی در افزایش متابولیسم پایه و ترموژنز(۵،۱۴،۱۵،۱۹،۲۰) و لیپولیز(۱۰،۱۱،۱۴) در پستانداران دارد. با توجه به نقش یکسان هورمونهای تیروئیدی ولپتین درفرایندهای ذکرشده، مطالعاتی درخصوص نحوهٔ ارتباط بین این دو هورمون انجام شده است. تزریق هورمون لپتین به داخل بطن سوم مغز(ICV) در موشهای گرسنه، از کاهش سطح هورمونهای T_3 و T_4 و کاهش ساخت پیش مولکول TRH(۱۶) جلوگیری به عمل آورده است(۲). همچنین شواهدی در دست است که نشان می‌دهد، لپتین باعث افزایش آزادسازی هورمونهای TSH و T_4 می‌شود(۹)؛ اما تاکنون گزارشی از اثر احتمالی لپتین بر ترشح هورمونهای تیروئیدی در نشخوارکنندگان از جمله گوسفند منتشر نشده است.

با توجه به مطالب فوق، هدف از آزمایش حاضر، مطالعهٔ اثر محدودیت

۱) گروه علوم دامی، دانشکدهٔ علوم زراعی و دامی، دانشگاه تهران، کرج - ایران.
۲) گروه زیست شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهید بهشتی، تهران - ایران.
۳) گروه علوم درمانگاهی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۴) دانش آموخته گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۲۲۴۸۰۸۲ -۰۲۶۱ نمابر: ۲۲۴۶۷۵۲ -۰۲۶۱
Email:atowhidi@ut.ac.ir

CHANGES IN THE PLASMA CONCENTRATIONS OF THYROID HORMONES IN ENERGYRESTRICTED EWES AND THE EFFECT OF INTRAVENOUS INJECTION OF LEPTIN ON THEIR LEVELS

Towhidi, A.[1]*, Khazali, H.[2], Niasari Naslaji, A.[3], Zhandi, M.[4]

[1]Department of Animal Sciences, Faculty of Agronomy and Animal Sciences, University of Tehran, Karaj-Iran. [2]Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Shaheid Beheshti, Tehran-Iran. [3]Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary, Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. [4]Graduated from the Faculty of Agriculture, University of Tarbiat Modarres, Tehran-Iran.

The aim of this study was to determine changes in the concentration of leptin and thyroid hormone in energyrestricted ewes and effect of leptin injection on thyroid hormone level. In the first experiment, 28 ewes were assigned to two groups(n=14). Ewes were fed by a ration that provided 60% or 100% of maintenance energy requirements during 71 days. Blood samples were collected and body weight(BW) and body condition score(BCS) were determined. In the second experiment, 6 energy-restricted ewes from the first experiment were selected and assigned to two groups(n=3). Ewes were fed a ration that provided 60% of maintenance energy requirements and injected by 1 or 4 µg leptin/Kg BW. Blood samples were taken and BW and BCS were determined. In the first experiment, concentrations of leptin, T_3 and T_4, BW and BCS were decreased in energyrestricted ewes($p<0.01$). In the second experiment, concentration of T_3, T_4 and leptin were increased by leptin injection($p<0.01$). The results suggested leptin injection may restore thyroid hormone secretion to normal levels in energy-restricted ewes. ***J.Vet.Res. 62,1:15-20,2007***.

Key words: leptin, thyroid hormones, energy-restriction, ewe.

***Corresponding author's email: atowhidi@ut.ac.ir, Tel: 0261-2248082, Fax: 0261-2226752**

انرژی بر سطح هورمونهای تیروئیدی و لپتین در خون میش و تأثیر تزریق وریدی لپتین در دو سطح یک و چهار میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن(µg/KgBW) بر روی غلظت پلاسمایی هورمونهای T_3 و T_4 در میش‌هایی بود که با محدودیت انرژی مواجه‌بودند.

مواد و روش کار

مکان و زمان آزمایش: آزمایش حاضر در پائیز سال ۱۳۷۹ در مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور واقع در شهرستان کرج با طول جغرافیایی ´۵۱°۲ شرقی و عرض جغرافیایی ´۳۵°۴۸ شمالی اجرا گردید. حیوانات در طول دوره آزمایش در قفسهای انفرادی و در جایگاه بسته نگهداری شدند.

حیوانات: در آزمایش اول، بیست و هشت رأس میش شال با میانگین وزن۲/۳۵± ۴۵/۱۶ کیلوگرم و امتیاز وضعیت بدن۰/۴۱±۲/۹۳ انتخاب شده و به مدت هفتاد و یک روز در دو گروه چهارده رأسی تحت محدودیت انرژی یا در سطح نگهداری قرار گرفتند. در آزمایش دوم، از میان چهارده رأس میشی که تحت محدودیت غذایی قرار داشتند، تعداد شش رأس انتخاب شدند. میش‌ها پس از دورهٔ محدودیت غذایی دارای میانگین وزن۰/۷۶±۳۴/۷۸ کیلوگرم و امتیاز وضعیت بدن۰/۰۰±۱/۰۰ بودند.

طرح آزمایش: در آزمایش اول، پس از طی دوره عادت‌دهی، میش‌ها به طور تصادفی به دو گروه مساوی ۱۴ رأسی تقسیم شده و در طی شش دوره فحلی به مدت هفتاد و یک روز تحت تیمار قرار گرفتند. گروه اول به عنوان تیمار از جیره‌ای حاوی ۶۰درصد انرژی متابولیسمی نگهداری و گروه دوم به عنوان شاهد با استفاده از جیره‌ای حاوی ۱۰۰درصد انرژی متابولیسمی نگهداری(AFRC ,1995)، تغذیه شدند. در صورتی که روز شروع تیمار غذایی را روز اول آزمایش در نظر بگیریم، جهت همزمان کردن فحلی از هفت تزریق متوالی پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$(کلوپرستنول، شرکت نصر، ایران) به میزان ۲۵۰ میکروگرم به ازای هر میش در روزهای ۱۱-، ۰، ۱۴، ۲۸، ۴۲، ۵۶ و ۷۰ استفاده شد. در کلیهٔ میش‌ها، وزن و امتیاز وضعیت بدن به روش لمس ناحیهٔ پشتی مهرهٔ سیزدهم کمری(بر مبنای سیستم صفر تا پنج) هر دو هفته یک بار در روزهای ۱-، ۱۳، ۲۷، ۴۱، ۵۵ و ۶۹ قبل از شروع چرخهٔ فحلی جدید تعیین شد. لازم به ذکر است که چرخه فحلی در انتهای آزمایش اول در گروه تحت محدودیت انرژی متوقف شد. این امر توسط فحل یابی بوسیله قوچ‌های تیزر مشخص گردید. نمونه‌های خون از چهار حیوان به‌صورت ثابت در هر گروه در روزهای ۱، ۱۵، ۲۹، ۴۳، ۵۷ و ۱۷۱ اخذ شد.

در آزمایش دوم و یک روز پیش از شروع تزریق لپتین، از بین میش‌های آسیکلیک تحت محدودیت انرژی آزمایش اول(یک هفته بعد از آزمایش نخست)، ۶ رأس میش انتخاب و به طور تصادفی به دو گروه سه رأسی تقسیم شده و از روز اول به مدت چهار روز، تیمارهای زیر را دریافت کردند. گروه‌های اول و دوم با استفاده از جیره‌ای حاوی۶۰درصد انرژی متابولیسمی نگهداری تغذیه شده و به علاوه روزانه به ترتیب مقدار ۱µg/kgBW و ۴µg/kgBW لپتین نوترکیب انسانی(Mediagnost Ltd .,Germany) به صورت وریدی

جدول ۱- اجزای جیره‌های آزمایشی برحسب ماده خشک، مقدار انرژی و مواد مغذی مصرفی.

شمارهٔ جیره / اجزای جیره	۱[۱]	۲[۲]	شمارهٔ جیره / اجزای جیره	۱[۱]	۲[۲]
کاه گندم(گرم در روز)	۱۰	۲۶۰	پروتئین خام(٪)	۴۲/۰۰	۱۳/۷۲
یونجه(گرم در روز)	۵۰	۵۰	کلسیم(٪)	۰/۵۲	۰/۲۴
ذرت(گرم در روز)	۱۰	۲۲۰	فسفر(٪)	۰/۵۲	۰/۲۴
آرد گلوتن ذرت(گرم در روز)	۲۱۰	۸۵	سدیم(٪)	۰/۴۵	۰/۲۱
پودر استخوان(گرم در روز)	۱/۳۴	۰/۴۷	منیزیوم(٪)	۰/۲۴	۰/۱۱
نمک(گرم در روز)	۱/۶۶	۱/۲۲	ماده خشک مصرفی(گرم در روز)	۲۸۷	۶۲۰
اکسید منیزیوم(گرم در روز)	۰/۶۹	--	انرژی متابولیسمی مصرفی(مگاژول در روز)	۳/۷۴	۶/۰۳
مکمل ویتامینه و معدنی رازک(گرم در روز)	۳/۵۰	۳/۵۰	پروتئین متابولیسمی مصرفی(گرم در روز)	۵۶/۰۰	۵۵/۳۷
انرژی متابولیسمی(مگاژول در گیلوگرم)	۱۳/۰۳	۹/۷۳			

۱- جیرهٔ حاوی ۶۰درصد انرژی متابولیسمی و سایر احتیاجات در حد نگهداری.
۲- جیرهٔ حاوی ۱۰۰درصد انرژی متابولیسمی و سایر احتیاجات در حد نگهداری.

دریافت کردند. نمونه‌های خون در روزهای صفر و پنج، نیم ساعت پیش از خوراک‌دهی و در روزهای دو و چهار، نیم ساعت قبل و بعد از تزریق لپتین، از کلیه میش‌ها جمع‌آوری گردید. همچنین، وزن بدن و امتیاز وضعیت بدن یک روز قبل(روز صفر) و یک روز بعد از دورهٔ تیمار(روز پنج) تعیین شد.

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 مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور تعیین شد. جیره‌های غذایی مورد استفاده در این مطالعه براساس AFRC(۱۹۹۵)(۱) تنظیم گردید(جدول۱). خوراک روزانه به صورت حبه‌شده هر روز صبح پس از توزین دقیق بر مبنای وزن بدن و به صورت انفرادی در ساعت ۸ صبح در اختیار دامها قرار گرفت. در طی دوره آزمایش، گوسفندان به آب تازه، سنگ نمک و آجر لیسیدنی معدنی(کلسیویت، شرکت کانی دام ایران) به طور آزاد دسترسی داشتند.

روش خونگیری: خونگیری با استفاده از لوله‌های تحت خلاء حاوی هپارین و از طریق ورید وداج صورت گرفت. در آزمایش نخست، نمونه‌های خون به میزان ۱۰ میلی لیتر از چهار حیوان در هر گروه در روزهای ۱، ۱۵، ۲۹، ۴۳، ۵۷ و ۷۱ و پیش از خوراک‌دهی، جمع‌آوری گردید.

در آزمایش دوم، در صورت آن که روز آغاز تیمار با لپتین را روز یک فرض کنیم، نمونه‌های خون در ساعت هشت روز صفر(یک روز قبل از آغاز تزریقات)، در ساعت هشت(قبل از تزریق لپتین) و نه(بعد از تزریق لپتین) روزهای دوم و چهارم، و در ساعت هشت روز پنج(یک روز بعد از پایان تزریقات لپتین) جمع‌آوری شد. نمونه‌های حاصله به مدت بیست دقیقه و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و پلاسمای حاصله در داخل لوله‌های پلاستیکی تا زمان سنجش هورمون‌ها در دمای ۲۰- درجهٔ سانتیگراد در فریزر نگهداری شد.

اندازه‌گیری هورمونها: غلظت هورمونهای تیروئیدی و لپتین با

آنتی‌بادی گوسفندی(شرکت تابشیار نور، تهران، ایران) در نمونه‌های پلاسما به روش رادیوایمنواسی و با دو تکرار برای هر نمونه اندازه‌گیری شد. حساسیت روش به کار رفته برای اندازه‌گیری غلظت هورمونهای لپتین، T_3 و T_4 به ترتیب معادل ۰/۱ng/ml، ۰/۰۵ng/ml و ۱ng/ml بود. ضریب تغییرات داخل سنجش برای اندازه‌گیری غلظت هورمونهای لپتین، T_3 و T_4 به ترتیب معادل ۶/۳درصد، ۲/۳درصد و ۴/۷درصد بود. ضریب تغییرات بین سنجش برای اندازه‌گیری غلظت هورمونهای لپتین، T_3 و T_4 به ترتیب معادل ۹/۳درصد، ۶/۹درصد و ۵/۳درصد بود.

برای سنجش هورمونهای مختلف از روش‌های زیر استفاده شد:

الف) لپتین: ۱۰۰ میکرولیتر نمونه پلاسما به داخل لوله‌های پوشش‌دار شده با آنتی‌بادی اضافه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر تریسر به کلیه لوله‌ها اضافه شد. لوله‌ها بخوبی به‌هم زده شده و پس از ۱۵ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، ۵۰۰ میکرولیتر محلول رسوب دهنده به آنها افزوده گردید. بعد از مخلوط کردن محتویات، لوله‌ها در دمای ۲ تا ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت نگهداری شد، سپس ۱ میلی لیتر آب یخ به لوله‌ها اضافه شد. کلیه لوله‌ها در ۳۰۰۰ دور در ثانیه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. در پایان مایع رویی مکیده شد به طوری که بیش از ۰/۳ میلی لیتر در ته لوله باقی نماند.

ب) T_4: به میزان ۲۰ میکرولیتر نمونه پلاسما به داخل لوله‌های پوشش‌دار شده با آنتی‌بادی ریخته شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر تریسر اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد همراه با حرکت مداوم انکوباسیون شد. در پایان مایع رویی تخلیه گردید.

ج) T_3: به میزان ۵۰ میکرولیتر نمونه پلاسما به داخل لوله‌های پوشش‌دار شده با آنتی‌بادی ریخته شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر تریسر اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد همراه با حرکت مداوم انکوباسیون شد. در پایان مایع رویی تخلیه گردید.

برای اندازه‌گیری تشعشعات رسوب حاصله در نمونه‌ها از دستگاه گاماکانتر استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از تعیین وزن، امتیاز وضعیت بدن و غلظت پلاسمایی هورمونهای لپتین و تیروئیدی با استفاده از طرح اندازه‌گیری‌های مکرر و به روش مدل خطی عمومی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفت. جهت تعیین نحوهٔ ارتباط خطی میان فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده، از روش تابعیت یک متغیره استفاده شد. نرم افزار آماری مورد استفاده SPSS-9بود.

نتایج

آزمایش اول: سطح انرژی مصرفی، زمان و اثر متقابل آنها دارای اثر معنی‌دار($p<0/01$) بر وزن بدن و امتیاز وضعیت بدن بود. در گروه تیمار، میانگین وزن بدن و امتیاز وضعیت بدن در طی زمان و از روز ۱۵ تا انتهای دورهٔ آزمایش به تدریج کاهش یافت. در گروه شاهد، تفاوت معنی‌دار در زمانهای مختلف مشاهده نشد(جدول ۱).

سطح انرژی مصرفی، زمان و اثر متقابل آنها دارای اثر معنی‌دار($p<0/01$) بر سطح هورمون لپتین پلاسما بود. به طوری‌که در گروه تیمار غلظت هورمون لپتین پلاسما از روز ۲۹ تا انتهای آزمایش به تدریج کاهش یافت. در گروه شاهد، تفاوت معنی‌دار در زمانهای مختلف مشاهده نشد(جدول ۱).

سطح انرژی مصرفی، زمان و اثر متقابل آنها دارای اثر معنی‌دار($p<0/01$) بر سطح هورمون T_4 پلاسما بود. میانگین غلظت هورمون T_4 پلاسما در گروه تیمار (گروهی که در سطح ۶۰درصد انرژی نگهداری تغذیه شدند) با گذشت زمان کاهش یافت، به طوری که این میانگین در روزهای ۴۳، ۵۷، ۷۱ نسبت به زمانهای قبل و گروه شاهد(گروهی که در سطح ۱۰۰درصد انرژی نگهداری تغذیه شدند) پایین‌تر بود(جدول ۱).

سطح انرژی مصرفی، زمان و اثر متقابل آنها دارای اثر معنی‌دار($p<0/01$) بر سطح هورمون T_3 پلاسما بود. در گروه تیمار، میانگین غلظت هورمون T_3 در گروه تیمار در طی زمان کاهش یافت، به طوری که این میانگین در روزهای ۴۳ و ۵۷ نسبت به زمانهای قبل و گروه شاهد پایین‌تر بود. در روز ۷۱، مجدداً میانگین غلظت هورمون T_3 نسبت به زمانهای قبل و گروه شاهد تقلیل یافت(جدول ۱).

ضریب همبستگی بین غلظت پلاسمایی هورمونهای T_3 و T_4 با وزن بدن، به ترتیب ۰/۵۷+($p<0/001$) و ۰/۴۶+($p<0/05$)، با امتیاز وضعیت بدن، به ترتیب ۰/۶۹+($p<0/001$) و ۰/۵۵+($p<0/01$) و با غلظت لپتین، به ترتیب ۰/۶۵+($p<0/001$) و ۰/۶۷+($p<0/001$)بود.

آزمایش دوم: تیمار($p<0/01$)، زمان($p<0/01$) و اثر متقابل آنها($p<0/01$) دارای اثر معنی‌دار بر سطح هورمون لپتین پلاسما بود. در هر دو گروه، میانگین غلظت هورمون لپتین پلاسما در روزهای دوم و چهارم پس از تزریق لپتین به طور معنی‌دار نسبت به زمانهای قبل از تزریق مربوطه و یک روز پس از آخرین تزریق(روز پنجم) بالاتر بود. میانگین غلظت این هورمون در گروهی که ۴μg/kgBW به جای ۱μg/kg BW لپتین دریافت کرده، در روزهای دوم و چهارم پس از تزریق به طور معنی‌داری($p<0/01$) بیشتر از گروه دیگر بود(جدول ۲).

تیمار($p<0/01$)، زمان($p<0/01$) و اثر متقابل آنها($p<0/01$) دارای اثر معنی‌دار بر سطح هورمون T_4 پلاسما بود. در هر دو گروه، میانگین غلظت هورمون T_4 پلاسما در روزهای دوم و چهارم پس از تزریق لپتین به طور معنی‌دار نسبت به زمانهای قبل از تزریق مربوطه و یک روز پس از آخرین تزریق(روز پنجم) بالاتر بود. میانگین غلظت این هورمون در گروهی که ۴μg/kgBW به جای ۱μg/kg BW لپتین دریافت کرده، در روزهای دوم و چهارم پس از تزریق به طور معنی‌داری($p<0/01$) بیشتر از گروه دیگر بود(جدول ۲).

تیمار($p<0/01$)، زمان($p<0/01$) و اثر متقابل آنها($p<0/01$) دارای اثر معنی‌دار بر سطح هورمون T_3 پلاسما بود. در هر دو گروه، میانگین غلظت

جدول ۲- میانگین ±(خطای معیار) وزن، امتیاز وضعیت بدن، غلظت هورمونهای تیروکسین، تری یدو تیرونین و لپتین(ng/ml) در میش‌هایی که ۶۰درصد(تیمار) یا ۱۰۰درصد(شاهد) انرژی نگهداری دریافت کرده بودند در روزهای مختلف آزمایش اول. میانگین‌های هر صفت که دارای حرف انگلیسی (abc) مشترک نیستند، دارای اختلاف معنی دارند($p<0/05$).

روز	وزن		امتیازوضعیت بدن		تیروکسین		تری یدو تیرونین		لپتین	
	شاهد (۱۰۰٪انرژی)	تیمار (۶۰٪انرژی)	شاهد (۱۰۰٪انرژی)	تیمار (۶۰٪انرژی)	شاهد (۱۰۰٪انرژی)	تیمار (۶۰٪انرژی)	شاهد (۱۰۰٪انرژی)	تیمار (۶۰٪انرژی)	شاهد (۱۰۰٪انرژی)	تیمار (۶۰٪انرژی)
۱	۴۵/۱۸^{a}±۰/۶۰	۴۵/۱۴^{a}±۰/۶۸	۲/۹۵^{a}±۰/۱۱	۲/۹۱^{a}±۰/۱۱	۵۰/۰۱^{c}±۱/۲۴	۵۳/۲۱^{abc}±۳/۸۸	۰/۸۸^{abcd}±۰/۱۳	۰/۸۵^{abcd}±۰/۰۹	۳/۸۷^{a}±۰/۲۲	۳/۶۴^{ab}±۰/۳۴
۱۵	۴۶/۲۵^{a}±۰/۷۴	۴۱/۶۴^{b}±۰/۷۲	۲/۹۱^{a}±۰/۱۰	۲/۳۰^{b}±۰/۱۰	۶۳/۱۲^{abc}±۴/۱۸	۶۴/۴۲^{ab}±۲/۸۹	۰/۹۴^{abcd}±۰/۱۰	۱/۰۴^{abc}±۰/۱۹	۳/۵۳^{ab}±۰/۲۰	۳/۱۵^{ab}±۰/۱۷
۲۹	۴۵/۲۹^{a}±۰/۵۹	۴۱/۳۱^{b}±۰/۸۹	۲/۹۸^{a}±۰/۰۶	۲/۱۵^{b}±۰/۰۹	۵۷/۰۳^{abc}±۲/۲۵	۵۱/۰۳^{bc}±۳/۸۹	۱/۱۳^{ab}±۰/۱۵	۰/۸۱^{bcd}±۰/۰۹	۴/۰۳^{a}±۰/۰۷	۲/۸۷^{bc}±۰/۲۲
۴۳	۴۵/۵۰^{a}±۰/۶۶	۳۹/۷۳^{bc}±۰/۹۷	۲/۹۶^{a}±۰/۰۸	۱/۷۵^{c}±۰/۰۶	۶۵/۹۳^{a}±۲/۷۸	۳۶/۰۵^{d}±۴/۰۸	۱/۲۲^{a}±۰/۰۷	۰/۶۶^{cd}±۰/۰۹	۳/۳۳^{ab}±۰/۲۵	۲/۲۱^{cd}±۰/۴۰
۵۷	۴۴/۸۲^{a}±۰/۵۷	۳۷/۹۶^{c}±۰/۷۵	۳/۰۰^{a}±۰/۱۲	۱/۳۵^{d}±۰/۰۶	۵۷/۷۵^{abc}±۱/۷۵	۳۴/۶۶^{d}±۷/۰۷	۱/۰۷^{ab}±۰/۱۲	۰/۶۰^{d}±۰/۰۸	۳/۸۹^{a}±۰/۳۱	۱/۹۷^{d}±۰/۲۲
۷۱	۴۵/۰۷^{a}±۰/۶۵	۳۵/۳۱^{d}±۰/۶۲	۲/۹۸^{a}±۰/۰۷	۱/۰۴^{e}±۰/۰۴	۶۴/۹۴^{ab}±۷/۹۹	۳۱/۰۷^{d}±۳/۴۴	۱/۰۸^{ab}±۰/۱۷	۰/۱۳^{e}±۰/۰۲	۳/۷۱^{a}±۰/۳۹	۱/۱۶^{e}±۰/۵۳

هورمون T_3 پلاسما در روزهای دوم و چهارم پس از تزریق به طور معنی‌دار نسبت به زمانهای قبل از تزریق مربوطه و یک روز پس از آخرین تزریق(روز پنجم) بالاتر بود. میانگین غلظت این هورمون در گروهی که ۴μg/kg BW به جای ۱μg/kg BW لپتین دریافت کرده، در روزهای دوم و چهارم پس از تزریق، به طور معنی‌داری($p<0/01$) بیشتر از گروه دیگر بود(جدول ۲).

بحث

در آزمایش نخست، کاهش سطح انرژی مصرفی در گروه تحت محدودیت انرژی موجب کاهش وزن و امتیاز وضعیت بدن میش‌ها شد، ولی در گروه شاهد که جیره‌ای حاوی احتیاجات غذایی در حد نگهداری دریافت کرده بودند، تغییرات معنی‌دار مشاهده نشد. تغییرات وزن بدن و امتیاز وضعیت بدن دارای روند هماهنگ بود و با سایر تحقیقات مشابهت دارد(۱۳،۲۳). مشخص شده است که کاسته شدن از وزن بدن، عمدتاً ناشی از کاهش ذخایر چربی بدن است(۲۲،۲۳). گرچه تغییرات ذخایر چربی بدن در این آزمایش مستقیماً اندازه‌گیری نشد، ولی به دلیل بالا بودن ضریب همبستگی میان امتیاز وضعیت بدن و مقدار کل چربی بدن(۲۱)، کاهش امتیاز وضعیت بدن به طور عمده ناشی از کاهش مقدار چربی بدن به نظر می‌رسد.

در آزمایش اول کاهش سطح انرژی مصرفی در طی زمان در گروه تحت محدودیت انرژی موجب کاهش غلظت هورمون لپتین پلاسما همزمان با کاهش وزن و امتیاز وضعیت بدن میش‌ها شد. این نتایج مشابه با مطالعات پیشین برروی میش(۴) و گاو(۶) می‌باشد.

غلظت پلاسمایی هورمونهای تیروئیدی(T_3 و T_4) پس از یک و نیم ماه(در روز ۴۳ آزمایش) از آغاز محدودیت انرژی کاهش یافت و پس از آن تا انتهای دوره آزمایش غلظت T_4 پلاسما تغییراتی نشان نداد. اما غلظت T_3 پلاسما در اواخر دوره آزمایش مجدداً و به شدت تقلیل یافت. در مطالعات پیشین کاهش سطح انرژی مصرفی در نشخوارکنندگان موجب کاهش ترشح و غلظت پلاسمایی T_3 و T_4 شده است(۳،۷،۲۶). برخی پژوهش‌ها نیز نشان می‌دهد، T_3 نسبت به T_4 در پاسخ به تغییرات تغذیه حساستر است(۱۸،۲۴).

در آزمایش حاضر نیز غلظت T_3 پلاسما با وجود عدم تغییر در غلظت T_4 در انتهای آزمایش مجدداً به محدودیت غذایی واکنش نشان داده و به شدت کاهش یافته است. بلوم و کونز در سال ۱۹۸۱، علت کاهش غلظت هورمونهای تیروئیدی را پس از کاهش سطح خوراک، تبدیل بیشتر T_4 به T_3 و افزایش تبدیل T_3 و T_4 به متابولیت‌های غیرفعال می‌دانند(۳). روند کاهش T_3 همراه با T_4 در اوایل و اواسط دوره محدودیت انرژی در این مطالعه مشابه بود. این امر می‌تواند به دلایل مطرح شده و همچنین کاهش ترشح هورمونهای فوق از غده تیروئید باشد. اما در اواخر دوره آزمایش به نظر می‌رسد، با سخت‌تر شدن شرایط متابولیکی، محور TRH-TSH-Thyroid بیشتر تحت تأثیر قرار گرفته و در نتیجه، دلیل اصلی کاهش غلظت هورمونهای T_3 و T_4، کاهش ترشح هورمونهای محرک تیروئیدی بوده است. همچنین با توجه به نقش اصلی T_3 در مقایسه با T_4 در اعمال اثرات هورمونهای تیروئیدی بر بافتها(۱۴)، کاهش تبدیل T_4 به T_3 و یا تبدیل T_3 به متابولیتهای غیر فعال نیز ممکن است، در کاهش بیشتر غلظت T_3 در اواخر دورهٔ محدودیت انرژی مؤثر باشد. در هر حال با توجه به نقش اساسی هورمونهای تیروئیدی در متابولیسم پایه، کاهش سطح این هورمونها در میش‌های تحت محدودیت انرژی، نشانهٔ کاهش میزان متابولیسم در چنین شرایطی می‌باشد.

نتایج حاصل از تعیین تابعیت خطی بین غلظت پلاسمایی T_3 و T_4 با وزن بدن و امتیاز وضعیت بدن نشانگر همبستگی مثبت بین تغییرات غلظت پلاسمایی هورمونهای تیروئیدی با وزن و امتیاز وضعیت بدن در گوسفندان دنبه‌دار است. همچنین همبستگی بین غلظت هورمونهای T_3 و T_4 با غلظت پلاسمایی لپتین بالا و به ترتیب در حدود ۰/۶۵+ و ۰/۶۷+ بدست آمد، که با توجه به نقش یکسان هورمونهای تیروئیدی و لپتین در متابولیسم پایه(۱۹)، تغییرات یکسان این هورمونها در خون قابل انتظار بود. در هر حال، نتایج حاصله از آزمایش حاضر، اولین گزارش از نحوه ارتباط خطی بین غلظت هورمونهای تیروئیدی پلاسما با وزن، امتیاز وضعیت بدن و غلظت لپتین خون در میش‌های شال می‌باشد.

در آزمایش دوم، تزریق ۱μg/kg BW و ۴μg/kg BW لپتین به میش‌هایی که پس از یک دورهٔ محدودیت طولانی مدت در انرژی مصرفی با کاهش سطح

جدول ۳- تغییرات غلظت هورمونهای تیروکسین، تری یدو تیرونین و لپتین (ng/ml) در میش هایی که به ترتیب ۱ یا ۴ میکروگرم لپتین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. ق (قبل از تزریق)، ب (بعد از تزریق). میانگین های هر صفت که دارای حرف انگلیسی (abc) مشترک نیستند، دارای اختلاف معنی دارند ($p<۰/۰۵$). نتایج به صورت میانگین ± (خطای معیار) نمایش داده شده اند.

روز	تیروکسین	تیروکسین	تری یدو تیرونین	تری یدو تیرونین	لپتین	لپتین
	با تزریق ۱μg/Kg BW لپتین	با تزریق ۴μg/Kg BW لپتین	با تزریق ۱μg/Kg BW لپتین	با تزریق ۴μg/Kg BW لپتین	با تزریق ۱μg/Kg BW لپتین	با تزریق ۴μg/Kg BW لپتین
۰	$۳۴/۰۰^{ab}$±۱/۳۸	$۳۹/۶۴^{abc}$±۴/۴۸	$۰/۳۴^{abc}$±۰/۰۸	$۰/۲۲^{ab}$±۰/۰۴	$۰/۸۱^{a}$±۰/۰۶	$۰/۸۲^{a}$±۰/۰۵
۲-ق	$۳۷/۹۸^{abc}$±۲/۹۸	$۳۴/۱۹^{ab}$±۳/۰۴	$۰/۵۱^{abcde}$±۰/۰۷	$۰/۳۵^{abc}$±۰/۱۵	$۰/۸۲^{a}$±۰/۰۶	$۰/۸۳^{a}$±۰/۰۵
۲-ب	$۴۹/۵۰^{cd}$±۱/۰۴	$۹۴/۷۸^{f}$±۸/۰۰	$۰/۷۸^{e}$±۰/۰۶	$۱/۴۸^{f}$±۰/۳۰	$۲/۴۱^{c}$±۰/۰۷	$۷/۳۶^{e}$±۰/۳۴
۴-ق	$۴۰/۶۵^{abc}$±۷/۰۱	$۴۵/۸۴^{bc}$±۳/۶۰	$۰/۵۵^{bcde}$±۰/۰۵	$۰/۵۲^{abcde}$±۰/۰۶	$۰/۸۸^{a}$±۰/۰۵	$۰/۸۴^{a}$±۰/۱۰
۴-ب	$۶۱/۴۰^{d}$±۳/۸۲	$۸۱/۴۷^{c}$±۱/۶۴	$۰/۷۶^{de}$±۰/۰۶	$۱/۵۹^{f}$±۰/۰۸	$۲/۴۳^{c}$±۰/۰۴	$۶/۸۵^{d}$±۰/۲۳
۵	$۳۸/۹۲^{abc}$±۳/۵۴	$۴۰/۵۷^{abc}$±۱/۶۴	$۰/۴۸^{abcd}$±۰/۰۴	$۰/۵۴^{bcde}$±۰/۱۲	$۰/۸۵^{a}$±۰/۰۵	$۰/۸۶^{a}$±۰/۰۶

هورمونهای T_3 و T_4 مواجه بودند، منجر به افزایش غلظت این هورمونها شد. غلظت هورمونهای T_3 و T_4 به مقدار تزریق لپتین واکنش نشان داد، به طوری که در گروهی که ۴μg/kg BW لپتین دریافت کرده اند، غلظت هورمونهای تیروئیدی احتمالاً به دلیل افزایش ترشح این هورمونها بیشتر از گروهی بود که مقدار ۱μg/kg BW لپتین دریافت کردند. علت این امر می تواند تحریک گیرنده های بیشتری از لپتین برروی محور TRH-TSH-Thyroid و یا افزایش سنتز یا تسریع در بازیافت این گیرنده ها در مقادیر بالاتر تزریق بوده باشد.

نتایج مطالعه حاضر اولین گزارش از اثر محرک لپتین بر ترشح هورمونهای تیروئیدی در نشخوارکنندگان بوده و نشان می دهد که تزریق لپتین قادر به تقلیل اثر کاهندهٔ محدودیت انرژی بر ترشح هورمونهای تیروئیدی در میش می باشد و همچنین تأیید کنندهٔ نتایج آزمایش های قبلی بر روی غیرنشخوار کنندگان است. به طور مثال در مطالعات پیشین مشاهده شده است، تزریق هورمون لپتین به صورت ICV در موش های گرسنه از کاهش سطح هورمونهای T_3 و T_4 (۲) و کاهش ساخت پیش مولکول TRH (۱۶) جلوگیری به عمل می آورد. در یک آزمایش نیز مشخص شد، لپتین به طور همزمان موجب افزایش آزادسازی TSH و T_4 می گردد (۹). نتایج مطالعات انجام شده نشان می دهد که تأثیر لپتین بر ترشح هورمونهای تیروئیدی می تواند از طریق هورمونهای TRH یا TSH اعمال شود. هر چند برای شناسایی سازوکار دقیق تأثیر لپتین بر محور TRH-TSH-Thyroid نیاز به مطالعات بیشتری می باشد.

افزایش ترشح هورمونهای تیروئیدی موجب افزایش متابولسیم پایه و دفع بیشتر انرژی از بدن می شود (۱۴). بنابراین، با توجه به اثرات ترموژنیک (۵،۱۵،۱۹،۲۰) و لیپولیتیک (۱۰،۱۱) هورمون لپتین، به نظر می رسد حداقل بخشی از این اثرات از طریق افزایش ترشح هورمونهای تیروئیدی اعمال می گردد.

به طور کلی از نتایج این آزمایش چنین استنباط می شود که محدودیت طولانی مدت انرژی و برقراری توازن منفی انرژی در میش های دنبه دار موجب کاهش غلظت هورمونهای T_3 و T_4 و در نتیجه کاهش میزان متابولیسم پایه می گردد. در چنین شرایطی تزریق لپتین می تواند اثرات بازدارندهٔ توازن منفی انرژی را بر ترشح هورمونهای تیروئیدی کم نماید. ضمن آنکه لپتین دارای اثر محرک وابسته به دز بر ترشح هورمونهای تیروئیدی است، به طوری که هر چه دز تزریق لپتین بیشتر باشد، ترشح و غلظت هورمونهای T_3 و T_4 افزایش می یابد.

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 Ed. CAB International, Wallingford, U.K.
2. Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E. and Flier, J.S.(1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature. 382: 250-252.
3. Blum, J.W., Kunz, P.(1981) Effects of fasting on thyroid hormone levels and kinetics of reverse triiodothyronine in cattle. Acta Endocrinol. 98: 234-240.
4. Bocquier, F., Bonnet, M., Faulconnier, Y., Guerremillo, M., Martin, P. and Chilliard, Y.(1998) Effect of photoperiod and feeding level on perirenal adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe. Reprod. Nut. Develop. 38: 484-498.
5. Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R. and Burn, P.(1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. Sci. 269: 546-549.
6. Chilliard, Y., Bocquier, F., Delavaud, C., Guerre-Millo, M., Bonnet, M., Martin, P., Faulconnier, Y. and Ferlay, A.(1998) Leptin in ruminants: Effects of species, breed, adiposity, photoperiod, beta-agonists and nutritional status. Proceeding of Cornell

Nutrition Conference for Feed Manufacturers USA, 65-75.

7. Chilliard, Y., Bocquier, F., Doreau, M.(1998) Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. Reprod. Nut. Develop. 38: 131-152.
8. Christensen, R.A., Malinowski, K., Massenzio, A.M., Hafs, H.D. and Scanes, C.G.(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. J. Anim. Sci. 75: 1351-1358.
9. Flier, J.S., Maratos-Flier, E.(1998) Obesity and the hypothalamus, Novel peptides for new pathways. Cell. 92: 437-440.
10. Fruhbeck, G., Agnado, M., Gomez-Ambrosi, J. and Martinez, J.A.(1998) Lipolytic effect of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and ob/ob mice, but not db/db mice. Biochem. Biophy. Res. Com. 260: 99-102.
11. Fruhbeck, G., Agnado, M., Martinez, J.A.(1997) In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: Evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. Biochem. Biophy. Res. Com. 240: 590-594.
12. Glade, M.J., Reimers, T.J.(1985) Effects of dietary energy supply on serum thyroxine, triiodothyronine, and insulin concentrations in young horses. J. Endocrinol. 104: 93-100.
13. Gutierrez, J., Dunn, T.G., Moss, G.E.(1987) Inanition decreases episodic LH release in ovariectomized ewes. J. Anim. Sci. 65(suppl. 1): 406.
14. Guyton, A.C., Hall, J.E.(1996) Textbook of Medical Physiology. 9th edn. W.B. Saunders Company, USA.
15. Halaas, J.L., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D.A. and Freidman, J.M.(1997) Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 8878-8883.
16. Legradi, G., Emerson, C.H., Ahima, R.S., Flier, J.S. and Lechan, R.M.(1997) Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. Endocrinol. 138: 2569-2576.
17. Loucks, A.B., Verdun, M.(1998) Slow restoration of LH pulsatility by refeeding in energetically disrupted women. Am. J. Physiol. 275: R1218-R1226.
18. Messer, N.T., Johnson, P.J., Refsal, K.R., Nachreiner, R.F., Ganjman, V.K. and Krause, G.F.(1995) Effect of food deprivation on baseline triiodothyronine and cortisol concentrations in healthy adult horses. Am. J. Vet. Res. 56: 116-122.
19. Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T. and Collins, E.(1995) Effects of obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Sci. 269: 540-543.
20. Rouru, J., Cusin, I., Zakrzewska, K.E., Jeanrenaud, B. and Rohner-Jeanrenaud, F.(1999) Effects of intravenously infused leptin on insulin sensitivity and on the expression of uncoupling proteins in brown and adipose tissue. Endocrinol. 140: 3688-3692.
21. Sanson, D.W., West, T.R. and Tatman, W.R.(1993) Relationship of body composition of mature ewes with condition score and body weight. J. Anim. Sci. 71: 1112-1116.
22. Schillo, K.K.(1992) Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. J. Anim. Sci. 70: 1271-1282.
23. Tatman, W.R., Judkins, M.B., Dunn, T.G. and Moss, G.E.(1990) Luteinizing hormone in nutrient-restricted ovariectomized ewes. J. Anim. Sci. 68: 1097-1102.
24. Teleni, E., King, W.R., Rowe, J.B. and McDowell, G.H.(1989) Lupins and energy-yielding nutrients in ewes. I. Glucose and acetate biokinetics and metabolic hormones in sheep fed a supplement of lupin grain. Aust. J. Agri. Sci. 40: 913-924.
25. White, F.J., Lents, C.A., Floyd, L.N., Spicer, L.J. and Wettemann, R.P.(2000) Acute nutritional restriction alters endocrine function and causes anovulation in beef heifers. J. Anim. Sci. 87(suppl. 1): 933.
26. Wynn, P.C., Reis, P.J., Fleck, E., Ward, W., Tunks, D.A. and Munro, S.G.(1988) The influence of protein and energy supply on ovine metabolic hormone status. Proceedings of the Nutrition Society of Australia. 13: 125.