١٣١٧٦٣

دانشکده علوم زیستی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد زیست شناسی

فیزیولوژی جانوری

عنوان

اثر تزریق درون‌رگی گالانین بر میانگین غلظت پلاسمایی LH و FSH در بزهای ماده نژاد سانن با رژیم‌های غذایی متفاوت

استاد راهنما

دکتر همایون خزعلی

استاد مشاور

دکتر محمدعلی امامی

۱۳۸۸/۳۱/۲

نگارش

فاطمه ابوطالبی

خرداد۸۸

۱۳۱۷۶۳

تاریخ .....
شماره .....
پیوست.....

دانشگاه شهید بهشتی

بسمه تعالی

« صورتجلسه دفاع پایان نامه دانشجویان دوره کارشناسی ارشد»

تهران ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین
تلفن: ۲۹۹۰۱

بازگشت به مجوز دفاع ۲۰۰/۷۸۵/د مورخ ۱۳۸۸/۳/۱۶ جلسه هیأت داوران ارزیابی پایان نامهٔ خانم فاطمه ابوطالبی آدرگانی به شماره شناسنامه ۲۲ صادره از لنجان متولد ۱۳۶۲ دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته رشته زیست شناسی- علوم جانوری – فیزیولوژی جانوری

با عنوان :

بررسی اثر تزریق درون رگی گالانین بر میانگین غلظت پلاسمایی LH و FSH در بزهای ماده نژاد سانن با رژیم های غذایی متفاوت

به راهنمائی:

۱-آقای دکتر همایون خزعلی

طبق دعوت قبلی در تاریخ ۱۳۸۸/۳/۳۰ تشکیل گردید و براساس رأی هیأت داوری و با عنایت به ماده ۲۰ آئین نامه کارشناسی ارشد مورخ ۷۵/۱۰/۲۵ پایان نامه مزبور با نمره ۱۹٫۷۰ و درجه عالی مورد تصویب قرار گرفت.

۱- استاد راهنما: آقای دکتر همایون خزعلی

۲- استاد مشاور : آقای دکتر محمد علی امامی

۳- استاد داور : آقای دکتر سید علی حایری روحانی

۴- استاد داور و نماینده تحصیلات تکمیلی: آقای دکتر محمدرضا بیگدلی

تقدیم به

آنان که از ذره‌های وجودشان مرا پروراندند و به من آموختند

چگونه زیستن را

پدر و مادرم اسطوره‌های مهر و ایثار

و تقدیم به برادر مهربان و عزیزم

با سپاس فراوان از آقای دکتر همایون خزعلی

بخاطر آنچه که از علم و معرفت به من آموخت

و بخاطر راهنمایی‌های ارزشمندش

با تشکر و سپاس فراوان از آقای دکتر محمدعلی امامی

بخاطر راهنمایی‌ها و مساعدت ایشان

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

علایم اختصاری ..... ه

فهرست جداول ..... و

فهرست شکل‌ها ..... ز

فهرست نمودارها ..... ح

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه ۲

فصل دوم: مروری بر منابع علمی

۲-۱- گالانین ۵

۲-۱-۱- ساختار گالانین ۵

۲-۱-۲- غلظت گالانین ۶

۲-۱-۳- توزیع نورون‌های گالانین ۶

۲-۱-۴- رسپتورهای گالانین ۷

۲-۱-۴-۱- رسپتور شماره ۱ گالانین (GALR1) ۸

۲-۱-۴-۲- رسپتور شماره ۲ گالانین (GALR2) ۹

۲-۱-۴-۳- رسپتور شماره ۳ گالانین (GALR3) ۹

۲-۱-۵- اعمال فیزیولوژیک گالانین ۱۰

۲-۱-۵-۱- ترشح هورمون رشد ۱۱

۲-۱-۵-۲- ترشح پرولاکتین ۱۱
۲-۱-۵-۳- ترشح انسولین ۱۲
۲-۱-۵-۴- غذاخوردن و متابولیسم ۱۲
۲-۱-۵-۵- کنترل درد ۱۳
۲-۱-۵-۶- حافظه ویادگیری ۱۳
۲-۱-۵-۷- تولیدمثل ۱۳
۲=۱=۶= تنظیم بیان گالانین ۱۴
۲-۱-۶-۱- استروئیدهای گنادی ۱۴
۲-۱-۶-۲- هورمون‌ها و مواد متابولیک ۱۵
۲-۱-۶-۳- خودکنترلی ۱۵
۲-۱-۶-۴- هورمون های تیروئیدی ۱۵
۲-۲- تولید مثل ۱۶
۲-۲-۱- هورمون آزادکننده گونادوتروپین‌ها (GnRH) ۱۶
۲-۲-۲- هورمون‌های گونادوتروپین: LH و FSH ۱۷
۲-۲-۲-۱- اثرات فیزیولوژیک گونادوتروپین‌ها ۱۷
۲-۲-۲-۱- ۱- اثرات فیزیولوژیک هورمون لوتئینی ۱۷
۲-۲-۲-۱-۲- اثرات فیزیولوژیک هورمون محرک فولیکولی ۱۸
۲-۲-۲-۲- الگوی ترشح گونادوتروپین‌ها ۱۸
۲-۲-۲-۳- تنظیم ترشح گونادوتروپین‌ها ۱۹
۲-۲-۲-۳-۱- استروئیدهای گنادی ۱۹
۲-۲-۲-۳-۲- تغذیه و مواد متابولیک ۲۰
۲-۲-۲-۳-۳- اپیوئیدها ۲۱

۲-۲-۲-۳-۴- نوروترانسمیتر گابا (GABA) ۲۱
۲-۲-۲-۳-۵- لپتین ۲۱
۲-۲-۲-۳-۶- Kisspeptin ۲۲
۲-۲-۲-۳-۷- نورومدین U ۲۳
۲-۲-۲-۳-۸- فتوپرید ۲۳
۲-۲-۳- سیکل فحلی ۲۴

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- وسایل و دستگاه‌های استفاده شده ۲۶
۳-۲- مواد استفاده شده ۲۶
۳-۳- محل انجام آزمایش ۲۶
۳-۴- واحدهای آزمایشی ۲۷
۳-۵- تیمارهای آزمایش ۲۷
۳-۶- خون‌گیری ۲۷
۳-۷- رژیم‌های غذایی ۲۸
۳-۸- سنجش هورمونی نمونه‌های خونی ۳۰
۳-۸-۱- اجزا کیت LH ۳۰
۳-۸- ۲- اجزا کیت FSH ۳۱
۳-۹- طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها ۳۱

فصل چهارم: نتایج

۴-۱- غلظت هورمون‌ها در پلاسمای خون ۳۳
۴-۱-۱- هورمون لوتئینی..... ۳۳
۴-۱-۱-۱- تیماراول ۳۴
۴-۱-۱-۲- تیماردوم ۳۴
۴-۱-۲- هورمون محرک فولیکولی ۳۸
۴-۱-۲-۱- تیماراول ۳۸
۴-۱-۲-۲- تیماردوم ۳۹

فصل پنجم: بحث و پیشنهادات

۵-۱- بحث ۴۴
۵-۱-۱- نتیجه‌گیری کلی ۴۹
۵-۲- پیشنهادات ۵۰

منابع

منابع ۵۲

علایم اختصاری

D.M	Dry Matter
C.F	Crude Fiber
NFE	Nitrogen free Extract
C.Pr	Crude Protein
NEM	Net Energy for Maintenance
Ca	Calcium

فهرست جداول

جدول ۳-۱..... ۲۹
جدول ۳-۲..... ۲۹
جدول ۳-۳..... ۳۰
جدول ۴-۱..... ۳۳
جدول ۴-۲ ..... ۳۸

فهرست شکل‌ها

شکل ۲-۱..... ۶
شکل ۲-۲..... ۷
شکل ۲-۳..... ۸
شکل ۲-۴..... ۱۰
شکل ۲-۵..... ۱۹
شکل ۲-۶..... ۲۴

فهرست نمودارها

نمودار ۴-۱..... ۳۵

نمودار ۴-۲..... ۳۶

نمودار ۴-۳..... ۳۷

نمودار ۴-۴..... ۴۰

نمودار ۴-۵..... ۴۱

نمودار ۴-۶..... ۴۲

چکیده

وجود ارتباط بین وضعیت انرژی و عملکرد تولیدمثل ثابت شده‌است اما تاکنون مکانیسم‌های اصلی آن مشخص نشده‌اند. گالانین پپتید ارکسیژنیک می‌باشد که در تنظیم ترشح گونادوتروپین‌ها در رت نقش دارد. از آنجاکه تاکنون میان‌کنش وضعیت انرژی و تیمار با گالانین، بر ترشح گونادوتروپین‌ها در نشخوارکنندگان بررسی نشده‌است، هدف از این مطالعه تعیین اثر گالانین در رژیم‌های باسطوح متفاوت انرژی، بر میانگین غلظت هورمون لوتئینی و هورمون محرک فولیکولی در بزهای ماده نژاد سانن بود. بدین منظور ۷ راس بز سانن ماده بطور تصادفی انتخاب و به سه گروه تقسیم شدند. حیوانات در گروه۱ (n=۲) با۵۰ درصد انرژی، در گروه ۲ (n=۲) با۱۰۰ درصد انرژی و در گروه ۳ (n=۳) با ۱۵۰ درصد انرژی به‌مدت یکماه تغذیه شدند. بعد از یکماه، دام‌ها در روزهای جداگانه، ۱و ۲ میکروگرم گالانین به ازای هرکیلوگرم وزن بدن ازطریق رگ وداج دریافت نمودند. نمونه‌های خونی از تمام دام‌ها ۳/۵ ساعت قبل و ۳/۵ ساعت بعد از تزریق، هر ۳۰ دقیقه از رگ وداج جمع‌آوری گردید. پلاسمای خونی، جهت تعیین غلظت هورمون های لوتئینی و محرک فولیکولی با روش رادیوایمیونواسی (RIA) مورد آزمایش قرارگرفت. تزریق ۱ µg/kg BW گالانین تنها در رژیم ۱۵۰ درصد انرژی باعث کاهش معنادار میانگین غلظت LH و FSH شد. درحالیکه در دو رژیم دیگر تاثیر معناداری نداشت. تزریق دوز بالاتر گالانین، (۲میکروگرم) نتوانست تغییر معناداری بر میانگین غلظت FSH و LH در رژیم‌های غذایی موردبررسی ایجادکند. نتایج این بررسی نشان می‌دهند، گالانین در شرایط طبیعی تنظیم‌کننده هیپوفیزی اصلی ترشح گونادوتروپین‌ها در بزها نمی‌باشد و تنها بعد از دریافت انرژی بالا اثر کاهشی بر میانگین غلظت گونادوتروپین‌ها دارد.

واژه های کلیدی: گالانین، هورمون محرک فولیکولی(FSH)، هورمون لوتئینی(LH)، بزسانن

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

تنظیم دقیق LH و FSH برای عملکرد کامل تولیدمثل مورد نیاز است. ترشح گونادوتروپین‌ها درماده باید در زمان مناسب و هماهنگ با سایرتغییرات فیزیولوژیک که درمحور تولیدمثلی رخ می‌دهد باشد. تنظیم کننده اصلی GnRH می‌باشد، ولی فاکتورهای متعددی در این تنظیم نقش دارند. درواقع نورونـهای GnRH قادراند به نوروترانسمیترهای متعددی پاسخ دهند. هرچند به‌نظر می‌رسد این پیچیدگی‌ها زاید باشد، ولی هر سیگنال ورودی، مکانیسم ویژه و مخصوص به‌خود برای انتقال اطلاعات به نورون-های GnRH دارد. امروزه شمار پپتیدهایی که درکنترل اعمال تولیدمثلی نقش دارند روزبه‌روز افزایش می‌یابد. شاید جالب نباشد که این تنظیم در اثر برهم‌کنش چندین ترکیب انجام شود. ولی این برهم‌کنش‌ها، باعث تنظیم دقیق سیگنال‌ها و خنثی‌سازی در مقابل محرک‌های نامناسب می‌شود (۲۶).

درسال۱۹۸۳، Tatemoto و همکارانش گالانین را از روده کوچک خوک استخراج کردند (۶۵). در اغلب پستانداران، گالانین ۲۹ اسیدآمیته دارد که در انتهای کربوکسیل آمیدی شده است. (۴۱) این پپتید در لوله گوارش، هیپوفیز، دستگاه عصبی مرکزی و محیطی بیان می‌شود و بیشترین غلظت آن در هیپوتالاموس و برجستگی میانی می‌باشد. این پپتید در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیکی مانند غذاخوردن، حفظ وزن بدن، رشد و تولیدمثل نقش دارد. اعمال گالانین ازطریق سه رسپتورGALR۱، GALR۲ و GALR۳ وساطت می‌شود (۵۹)

مطالعات زیادی درزمینه اثرات فیزیولوژیک گالانین درتنظیم ترشح گونادوتروپین‌ها، به‌ویژه دررت صورت گرفته‌است. گالانین باعث افزایش اتصال GnRH به غشای سلول‌های هیپوفیزمی‌شود (۲۶). تزریق گالانین در مغز رت‌ها ترشح هورمون لوتئینی را افزایش می‌دهد (۵۶). و تزریق آنتاگونیست گالانین (گالانتاید) ترشح آن را مهار می‌کند (۵۷). برخی بررسی‌ها حاکی از نقش مهاری گالانین در تنظیم ترشح گونادوتروپین‌ها می‌باشند. ازجمله این‌که این پپتید آزادسازی زیرواحد آلفا در سلولهای α T۳-۱ (سلولهای مشتق شده ازگونادوتروپ‌ها) را مهار(۶۷) و در رت ماده ترشح هورمون لوتئینی که با GnRH تحریک شده‌است را مهار می‌کند (۶۶). در مطالعه‌ای *in vitro*، تزریق گالانین تنها ترشح پایه هورمون لوتئینی را از هیپوفیز قدامی خوک افزایش داد (۲۴).

تزریق درون‌رگی گالانین در انسان (۳،۳۰) و تزریق داخل‌مغزی آن در میمون (۲۷) برغلظت پلاسمایی هورمون لوتئینی و هورمون محرک فولیکولی تاثیر معناداری نداشت.

مشخص شده‌است که میان وضعیت انرژی و عملکرد تولیدمثلی ارتباط وجود دارد، ولی مکانیسم‌های اصلی دخیل در این ارتباط به‌طورکامل شناسایی نشده‌اند. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که سیگنال‌های اندوکرینی کنترل‌کننده هموستازی انرژی مانند لپتین، گرلین، ارکسین و نروپپتید Y درکنترل اعمال تولیدمثل موثراند (۶۳).

گالانین درکنترل تعادل انرژی نقش دارد، چراکه بعد از تزریق آن به هیپوتالاموس، غذاخوردن را تحریک کرده و باعث کاهش مصرف انرژی می‌شود. به‌علاوه موادغذایی و هورمون‌های مختلف در تنظیم تولید این پپتید در هیپوتالاموس نقش دارند. به‌عنوان نمونه، انسولین و لپتین بیان گالانین در هیپوتالاموس را مهار می‌کنند (۷۱). پس احتمالا گالانین می‌تواند به‌عنوان یک پپتید واسطه درکنترل اعمال تولیدمثلی توسط وضعیت انرژی نقش داشته‌باشد.

وجود نورون‌های گالانین در هسته‌های پره‌اپتیک و پاراونتریکولار (مراکز مهم کنترل تولیدمثل) و برجستگی میانی درگوسفندان ماده(۱۶) همچنین بیان رسپتور شماره ۱ گالانین (GALR۱) در نورون‌های GnRH گوسفند (۲۳) حاکی از نقش گالانین در تنظیم ترشح گونادوتروپین‌ها در نشخوارکنندگان می‌باشد.

هرچند اثر گالانین بر ترشح هورمون لوتئینی و GnRH در رت به‌طور گسترده بررسی شده، اما تاکنون اطلاعات کمی در زمینه نقش گالانین در تنظیم اعمال تولیدمثلی در نشخوارکنندگان وجود دارد. به‌علاوه، تاکنون میان‌کنش وضعیت انرژی و تیمار با گالانین بر ترشح گونادوتروپین‌ها در نشخوارکنندگان بررسی نشده‌است. بنابراین هدف از این تحقیق، تعیین اثر تزریق درون‌رگی گالانین بر میانگین غلظت پلاسمایی هورمون لوتئینی و هورمون محرک فولیکولی در بزهای ماده نژاد سانن که با رژیم‌های متفاوت ازلحاظ سطح انرژی تغذیه شده‌اند می‌باشد.

فصل دوم

مروری برمنابع علمی

۲-۱- گالانین

گالانین[۱] نروپپتیدی است که اولین‌بار توسط Tatemoto و همکارانش در سال ۱۹۸۳ از روده کوچک خوک استخراج شد (۶۵). تا چند سال اخیر گالانین عضو هیچ یک از خانواده‌های نروپپتیدی شناخته‌شده نبود ولی اخیرا پپتید شبه گالانین[۲] (GALP) به‌عنوان دومین عضو خانواده گالانین قرارگرفته‌است. این پپتید با داشتن ۶۰ اسیدآمینه، اولین‌بار از هیپوتالاموس خوک استخراج شد. GALP میل ترکیبی بالایی برای رسپتورهای شماره ۱و۲ گالانین دارد (۴۱).

۲-۱-۱- ساختار گالانین

در انسان ، ژن گالانین بر روی کروموزوم شماره ۱۱ جای دارد و شامل ۶ اگزون و ۵ اینترون می‌باشد که با توجه به گونه، mRNA ای شامل ۹۸۹ – ۳۹۸ جفت باز را کد می‌کند. در اغلب مهره‌داران، گالانین از انتهای کربوکسیل پری‌پروگالانین[۳]، مولکول پیش ساز با ۱۲۳ اسیدآمینه، جدا شده و ۲۹ اسیدآمینه دارد که در آخرین اسیدآمینه (آلانین یا ترئونین) با گلیسین آمیدی می‌شود. توالی گالانین انسانی با داشتن یک بنیان سرین اضافی و انتهای کربوکسیلی که آمیدی نشده‌است باتوالی‌های شناخته‌شده در سایرگونه‌ها تفاوت دارد، ولی توالی اسیدآمینه‌ای آن در بین گونه‌های مختلف حفظ شده‌است (۴۱) (شکل ۲-۱).

این پپتید به‌دلیل وجود دو اسیدآمینه گلیسن و آلانین در دو انتهای آمین و کربوکسیل خود، گالانین نامیده شده است (۵۰). وزن مولکولی گالانین g/mol ۵/ ۳۲۱۰ و نیمه‌عمر بیولوژیکی‌اش[۴] در رت، ۶۰ دقیقه است که تقریبا ده برابر طولانی‌تر از VIP[۵] (پپتید با تعداد اسیدآمینه برابر) می‌باشد (۶).

---

۱ Galanin
۲ Galanin- Like Peptide
۳ preprogalanin
۴ Biological half-life
۵ Vasoactive Intestinal Peptide

Man	GWTLNSAGYLLGPHA	VGNHRSFSDK	NGLTS
Pig	GWTLNSAGYLLGPHA	IDNHRSFHDK	YGLA
Cow	GWTLNSAGYLLGPHA	LDSHRSFQDK	HGLA
Rat	GWTLNSAGYLLGPHA	IDNHRSFSDK	HGLT
Mouse	GWTLNSAGYLLGPHA	IDNHRSFSDK	HGLT
Sheep	GWTLNSAGYLLGPHA	IDNHRSFHDK	HGLA
Chicken	GWTLNSAGYLLGPHA	VDNHRSFNDK	HGFT

شکل۲ -۱. توالی گالانین در تعدادی از مهره‌داران

۲-۱-۲- غلظت گالانین

در رت، غلظت گالانین در گردش خون پورت ۴۰ ng/ml می‌باشد که نسبت به غلظت گالانین در گردش خون محیطی بیشتر است (۲۶). به‌علاوه گالانین به‌صورت ضربانی به گردش خون پورت ترشح می‌شود. تاکنون غلظت گالانین در گردش خون پورت گوسفند اندازه‌گیری نشده‌است (۴). ولی توجه به این نکته ضروری است که مکانیسم یا ظرفیت ترشح از برجستگی‌میانی خاص گونه می‌باشد. البته به‌نظر نمی‌رسد که در گوسفند غلظت گالانین در گردش خون پورت بیشتر از گردش خون محیطی باشد (۲۶).

۲-۱-۳- توزیع نورون‌های گالانین

گالانین تقریبا در تمامی دستگاه عصبی مرکزی و محیطی یافت شده‌است. در رت، بیشترین تراکم آن در هیپوتالاموس، برجستگی میانی[۱]، ساقه مغز و کمپلکس آمیگدالوییید و کمترین تعداد فیبرهای گالانین در مخچه و نواحی نئوکورتکس یافت شده‌است. هیپوتالاموس شامل تعداد زیادی جسم سلولی گالانین در هسته های پره‌اپتیک[۲]، قوسی[۳]، پری‌ونتریکولار و پشتی- میانی[۴] می‌باشد

[۱] Median eminence
[۲] Preoptic nucleus
[۳] Arcuate nucleus
[۴] Dorsomedial nucleus