

## مقایسه سطوح متابولیت‌ها و هورمون‌های استروژن، پروژسترون، انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ در سرم خون و مایع فولیکولی فولیکول‌های بالغ و کیستی در گاوهای شیری

فیروز صمدی<sup>\*</sup>، کلثوم زنگانه<sup>۲</sup>، سعید حسنی<sup>۱</sup> و یوسف جعفری آهنگری<sup>۱</sup>

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱/۲۰

<sup>۱</sup> دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

<sup>۲</sup> دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

\*مسئول مکاتبه: Email: Samadi542@yahoo.com; F.Samadi@gau.ac.ir

### چکیده

این مطالعه به منظور بررسی ارتباط تغییرات غلظت متابولیت‌ها و هورمون‌های استروژن، پروژسترون، انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ با تشکیل کیست فولیکولی تخمدان در گاوهای شیری هلشتاین انجام شد. بدین منظور، نمونه‌های خون از سیاهرگ دمی ۲۰ راس گاو شیری (۱۰ راس سالم و ۱۰ راس مظنون به داشتن کیست تخمدانی) قبل از کشتار اخذ شدند. پس از کشتار، مایع فولیکولی فولیکول‌های بالغ و کیستی به طور جداگانه آسیپره شدند. غلظت متابولیت‌های گلوکز، اوره، تری‌گلیسیرید و کلسترول کل همراه با هورمون‌های استروژن، پروژسترون، انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ در سرم خون و مایع فولیکولی فولیکول‌های بالغ و کیستی با استفاده از کیت‌های تجاری مربوطه تعیین گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت متابولیت‌ها در سرم خون بر خلاف مایع فولیکولی دام‌های سالم و کیستی مشابه بود. غلظت گلوکز در مایع فولیکولی فولیکول‌های کیستی ۱۴۸/۱۵ درصد بیش از غلظت آن در مایع فولیکولی فولیکول‌های بالغ بود ( $P < 0.05$ ). غلظت تری‌گلیسیرید در مایع فولیکولی فولیکول‌های کیستی ۱۴۲/۱۲ درصد بیش از فولیکول‌های بالغ بود ( $P < 0.05$ ). مقادیر اوره و کلسترول کل در مایع فولیکولی فولیکول‌های بالغ و کیستی مشابه بود. مقادیر هورمون‌های استروژن، پروژسترون، انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ در سرم خون دام‌های کیستی و سالم تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. در مقایسه بین غلظت‌های استروژن و پروژسترون، استروژن در حدود ۱۴۱/۸۳ درصد و پروژسترون در حدود ۲۴۱/۴۴ درصد به ترتیب در مایع فولیکولی سالم و کیستی بیشتر بودند ( $P < 0.05$ ). هرچند مقادیر انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ در مایع فولیکولی فولیکول‌های کیستی و بالغ از نظر آماری مشابه بود، اما میزان انسولین در مایع فولیکولی فولیکول‌های بالغ در حدود ۱۸۴/۶۲ درصد بیشتر بود. ضرایب همبستگی پیرسون بین استروژن با گلوکز، کلسترول کل، پروژسترون، انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ مایع فولیکول کیستی مثبت برآورد شد، در حالی که این ضرایب بین استروژن با اوره و تری‌گلیسیرید منفی بود. همچنین، ضرایب همبستگی میان استروژن سرم خون با مقادیر تری‌گلیسیرید، کلسترول کل، فاکتور رشد شبه انسولین-۱ و پروژسترون مثبت، ولی با گلوکز، اوره، و انسولین منفی تعیین شد. به طور کلی، این مطالعه نشان داد که سرنوشت فولیکول‌ها بیشتر تحت تاثیر ترکیبات مایع فولیکولی بخصوص گلوکز و تری‌گلیسیرید می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کیست فولیکولی، متابولیت‌ها، هورمون‌ها، هلشتاین

## مقدمه

در صورتی که فولیکول بالغ تخم‌ریزی ننموده و به رشد نابهنجار خود ادامه دهد، به کیست فولیکولی تبدیل می‌شود (لوسی ۲۰۰۷ و اورتگا و همکاران ۲۰۰۸). بنابراین، کیست‌های فولیکولی تخمدان همان ساختارهای فولیکولی هستند که اولاً حداقل ۲-۲/۵ سانتی‌متر قطر داشته و ثانیاً به مدت حداقل ۱۰ روز و در غیاب جسم زرد روی یک یا هر دو تخمدان باقی می‌مانند (لوسی ۲۰۰۷ و پیتر ۲۰۰۴). امروزه ثابت شده است که کیست‌های فولیکولی تخمدان، یکی از مهمترین علل کم باروری<sup>۱</sup> و ناباروری<sup>۲</sup> در گاوهای شیری می‌باشند. کیست‌های فولیکولی تخمدان با افزایش تعداد روزهای باز<sup>۳</sup> باعث افزایش فاصله زایش و منجر به خسارت‌های اقتصادی همچون کاهش تولد گوساله و تولید شیر در طول حیات اقتصادی گاو می‌شوند (پیتر ۲۰۰۴). نقص در عملکرد محور تولیدمثلی (هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان) مهمترین دلیل بروز این عارضه گزارش شده است (اورتگا و همکاران ۲۰۰۸). در این ارتباط، عدم ترشح سرژ LH ممکن است دلیل اصلی باشد (لوسی ۲۰۰۷). سرژ LH، خود تحت تاثیر استروژن ترشح شده توسط فولیکول بالغ می‌باشد. گزارش شده است که بیشتر گاوهای کیستیک فاقد توانایی لازم در آزاد سازی سرژ LH در پاسخ به تاثیر مثبت استرادیول می‌باشند (رفسال و همکاران ۱۹۸۸). به نظر می‌رسد عدم پاسخ به استرادیول، در سطح هیپوتالاموس اعمال شود، چون نشان داده شده است که استفاده از GnRH<sup>۴</sup> سبب ترشح سرژ LH از هیپوفیز می‌شود (زئید و همکاران ۱۹۸۰). بر این اساس، درمان کیست‌های فولیکولی تخمدان بر پایه هورمون‌های استروئیدی، گنادوتروپین‌ها و هورمون آزاد کننده

گنادوتروپین می‌باشد، که نتایج ضد و نقیضی نیز به دنبال دارد (هاتلر و همکاران ۲۰۰۳). در دهه‌های اخیر به نقش هورمون‌ها و فاکتورهای متابولیکی در فعالیت تخمدان توجه بسیار شده است. هورمون‌ها و متابولیت‌های تغذیه‌ای به عنوان میانجی شرایط تغذیه‌ای و سیستم تولیدمثلی عمل می‌کنند. شرایط متابولیکی فولیکول در رشد نهایی و نیز در انتخاب فولیکول برتر نقش ویژه‌ای دارد. انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین-۱<sup>۵</sup> از جمله هورمون‌های متابولیکی مهم هستند که تاثیر به سزایی بر فعالیت فولیکولی تخمدان دارند (دیسکین و همکاران ۲۰۰۳ و کاواشیما و همکاران ۲۰۰۷). انسولین در ترشح LH از هیپوفیز و نیز در تنظیم حساسیت تخمدان در برابر گنادوتروپین‌ها نقش دارد (مونگت و مارتین ۱۹۹۷). سینکدر و همکاران (۲۰۰۲) غلظت‌های پائین انسولین را در آنستروس بعد از زایش گزارش کردند. هر نوع نقص در عملکرد سیستم انسولین/فاکتور رشد شبه انسولین-۱ در تخمدان منجر به تحلیل فولیکول و یا تشکیل فولیکول کیستی می‌شود (کاواشیما و همکاران ۲۰۰۷). غلظت‌های بالای انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ خون با فاصله کوتاه زایش تا اولین تخم‌ریزی ارتباط دارد (باتلر ۲۰۰۰). مطالعات *in vivo* و *in vitro* نیز نشان داده‌اند که استفاده از انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ محرک سنتز هورمون‌های استروئیدی در سلول‌های گرانولوزا و نیز آندروژن در سلول‌های تیکا می‌باشند (آرمسترونگ و همکاران ۲۰۰۲ و باتلر و همکاران ۲۰۰۴). فاکتور رشد شبه انسولین-۱ بیشتر از منشاء کبد ترشح می‌شود و کبد نیز به عنوان دروازه‌بان متابولیکی در انعکاس وضعیت متابولیکی حیوان نقش دارد. فاکتور رشد شبه انسولین-۱ در رشد و بلوغ نهایی فولیکول در اولین موج فولیکولی پس از زایش نقش دارد (سیلویا و همکاران ۲۰۰۲)، به طوری که غلظت آن در سرم خون گاوهای تخم‌ریزی کرده در

<sup>1</sup> Subfertility<sup>2</sup> Infertility<sup>3</sup> Open days<sup>4</sup> Gonadotrophin releasing hormone<sup>5</sup> Insulin like growth factor-1

فاقد ماده ضد انعقاد در قبل از کشتار اخذ شد. در آزمایشگاه، سرم مربوطه از طریق سانتریفوژ کردن (۳۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه) استخراج و تا زمان تعیین فاکتورهای مورد نظر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

پس از کشتار دام‌های سالم و مظنون به داشتن کیست فولیکولی، تخمدان‌ها استخراج و در کیسه‌های پلاستیکی حاوی سرم فیزیولوژی قرار داده شدند. سپس کیسه‌های پلاستیکی حاوی تخمدان‌ها، در فلاسک حاوی یخ قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. فولیکول‌های کیستی و بالغ با اندازه‌گیری قطرشان بکمک کولیس دیجیتال شناسایی شدند. فولیکول‌هایی بعنوان فولیکول کیستی انتخاب شدند که اولا حداقل ۲۰ میلی‌متر قطر داشته باشند و ثانياً تخمدان‌ها در حضور آن فولیکول فاقد جسم زرد باشند (کالدر و همکاران ۱۹۹۹ و پیتز ۲۰۰۴). فولیکول‌های با قطر ۱۵-۱۰ میلی‌متر نیز به عنوان فولیکول‌های سالم بالغ انتخاب شدند. مایع فولیکولی فولیکول‌های سالم و کیستی به طور جداگانه و بوسیله‌ی سرنگ انسولین آسپیره گردید. جهت پاک کردن مایع فولیکولی از سلول‌های گرانولوزا، مایع فولیکولی سانتریفوژ (۱۰۰۰۰ دور به مدت ۷ دقیقه) گردید. مایع فولیکولی بدست آمده تا زمان تعیین فاکتورهای مورد نظر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

غلظت هورمون‌های استروژن، پروژسترون، انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ نمونه‌های سرم خون و مایع فولیکولی با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی ((استروژن با کیت (DE2693) از شرکت DEMEDITEC آلمان، پروژسترون با کیت (RE52231) از شرکت IBL آمریکا، انسولین با استفاده از کیت شرکت DIAPLUS آمریکا و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ با کیت شرکت Immunodiagnostic Systems Ltd انگلیس) با روش (ایزا در آزمایشگاه)) تعیین شدند. حساسیت آنالیز

اولین موج فولیکولی پس از زایش بیشتر از گاوهای آنستروس بوده است (ونهلدر و همکاران ۲۰۰۵). گلوکز، اوره، کلسترول و تری‌گلیسرید از جمله متابولیت‌های مهم خون هستند که بر باروری حیوان تأثیر دارند (دیسکین و همکاران ۲۰۰۳). گلوکز با تأثیر بر ترشح LH می‌تواند بر فعالیت فولیکولی تخمدان موثر باشد (موراهاشی و همکاران ۱۹۹۶). اوره نیز با باروری حیوان مرتبط است. به طوری که، ازدیاد غلظت اوره خون با تأثیر بر pH رحم و ایجاد شرایط نامناسب سبب کاهش رشد و نمو رویان و در نتیجه کاهش باروری در گاوهای شیری می‌شود (دی ویت و همکاران ۲۰۰۱). کلسترول به عنوان پیش‌ساز هورمون‌های استروئیدی نقش مهمی در فعالیت فولیکولی تخمدان دارد. هر گونه اختلال در فرآیند متابولیسم تری‌گلیسیریدها و کاهش تولید کلسترول، سنتز هورمون‌های استروئیدی را مختل می‌سازد (لری و همکاران ۲۰۰۴a,b).

با توجه به اینکه مکانیسم دقیق تشکیل کیست‌های فولیکولی تخمدان و نقش احتمالی متابولیت‌ها و هورمون‌های متابولیکی همچنان ناشناخته است، لذا هدف از این تحقیق بررسی ارتباط تغییرات متابولیت‌ها، هورمون‌های تغذیه‌ای و نیز هورمون‌های استروئیدی با تشکیل کیست فولیکولی تخمدان در گاوهای شیری بود.

#### مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در دانشکده علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. در این مطالعه از ۲۰ راس گاوهای شیری هلشتاین، که از نظر عدم آبستنی و بیماری‌های تولیدمثلی مورد معاینه قرار گرفته بودند، استفاده شد. گاوهای مورد استفاده در زایش‌های دوم تا پنجم و حداقل ۹۰ روز پس از زایش بودند. در حدود ۱۰ سی‌سی نمونه‌ی خون از سیاهرگ دمی گاوهای سالم (۱۰ راس) و مظنون (۱۰ راس) به داشتن کیست فولیکولی به وسیله‌ی لوله‌های ونوجکت

معنی‌دار با هم نداشتند، اما از نظر عددی مقدار فاکتور رشد شبه انسولین-۱ در سرم خون گاوهای کیستی در حدود ۱۵۴/۲۱ درصد بیشتر بود. در مقایسه غلظت هورمون‌های استروئیدی استروژن و پروژسترون مشخص شد که غلظت استروژن در مایع فولیکولی فولیکول‌های بالغ به طور معنی‌داری (۱۴۰/۸۳ درصد) بیشتر از مایع فولیکولی فولیکول کیستی می‌باشد ( $P < 0.05$ ). غلظت پروژسترون مایع فولیکول کیستی، بطور قابل توجهی (۲۴۱/۴۴ درصد) بیش از غلظت آن در مایع فولیکول بالغ بود ( $P < 0.05$ ). مقادیر هورمون‌های انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ در مایع فولیکولی فولیکول‌های بالغ و کیستی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. با این وجود، مقادیر انسولین در مایع فولیکولی فولیکول‌های بالغ در حدود ۱۸۴/۶۲ درصد بیشتر از فولیکول‌های کیستی بود. میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) غلظت متابولیت‌های گلوکز، اوره، تری‌گلیسیرید و کلسترول کل سرم خون و مایع فولیکولی در جدول ۲ آمده است. از نظر آماری مقادیر متابولیت‌های فوق در سرم خون گاوهای سالم و کیستی مشابه بود. میزان گلوکز و تری‌گلیسیرید هر دو در مایع فولیکولی فولیکول‌های کیستی بیشتر از فولیکول‌های سالم بود ( $P < 0.05$ ). در خصوص اوره و کلسترول، تفاوت آماری بین مقادیر آنها در مایع فولیکولی فولیکول‌های سالم و کیستی مشاهده نشد.

برای استروژن: ۹/۷۱۴ pg/ml، پروژسترون: ۰/۰۴۵ ng/ml، انسولین: ۰/۰۵  $\mu$ IU/ml، فاکتور رشد شبه انسولین-۱: ۳/۱  $\mu$ g/ml بود.

مقادیر گلوکز، اوره، تری‌گلیسیرید و کلسترول در نمونه‌های مایع فولیکولی و سرم خون با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی شرکت پارس آزمون و به روش فتومتریک تعیین شدند.

داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS (۲۰۰۲) تجزیه و تحلیل شدند. مقادیر میانگین حداقل مربعات ( $\pm$  خطای استاندارد) برای هر یک از مقادیر متابولیت‌ها و هورمون‌های سرم خون و مایع فولیکولی در فولیکول‌های بالغ و کیستی محاسبه شدند. بررسی غلظت‌ها بین تیمارها بوسیله مدل خطی مختلط انجام شد. در این روش، اثر نوع فولیکول به عنوان اثر ثابت و اثر دام به عنوان اثر تصادفی در نظر گرفته شد. تفاوت بین میانگین‌ها توسط آزمون توکی-کرامر در سطح ۵ درصد بررسی شد. همبستگی میان هورمون‌ها و متابولیت‌ها، با استفاده از رویه CORR نرم‌افزار SAS 9.0 محاسبه شد.

## نتایج

میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) غلظت هورمون‌های مورد بررسی سرم خون و مایع فولیکولی در جدول ۱ آمده است. مقادیر استروژن، پروژسترون و انسولین سرم خون گاوهای سالم و کیستی از نظر آماری اختلاف

جدول ۱- میانگین حداقل مربعات غلظت‌های استروژن، پروژسترون، انسولین و IGF-1 در سرم خون و مایع فولیکولی

تیمار	استروژن (pg/ml)	پروژسترون (ng/ml)	انسولین ( $\mu$ IU/ml)	IGF-1 ( $\mu$ g/ml)
سرم خون دام سالم	۳۴۳/۶±۲۲۵/۱ <sup>a</sup>	۱۱/۳±۷/۳ <sup>a</sup>	۹/۷±۱/۶ <sup>a</sup>	۱۹/۰±۵/۲ <sup>a</sup>
سرم خون دام کیستی	۴۰۵/۹±۲۴۳/۵ <sup>a</sup>	۹/۱±۷/۹ <sup>a</sup>	۹/۱±۱/۶ <sup>a</sup>	۲۹/۳±۵/۵ <sup>a</sup>
مایع فولیکول بالغ	۲۹۸۷/۷±۲۲۱/۱ <sup>a</sup>	۲۲/۲±۷/۳ <sup>b</sup>	۴/۸±۱/۵ <sup>a</sup>	۱۹/۹±۶/۴ <sup>a</sup>
مایع فولیکول کیستی	۲۱۲۱/۵۰±۲۴۳/۵ <sup>b</sup>	۵۳/۶±۷/۹ <sup>a</sup>	۲/۶±۱/۶ <sup>a</sup>	۲۲/۸±۵/۵ <sup>a</sup>

حروف غیر متشابه در هر ستون نشانگر وجود تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین غلظت‌های گلوکز، اوره، تری‌گلیسیرید و کلسترول در سرم خون و مایع فولیکولی

تیما	گلوکز (mg/dl)	اوره (mg/dl)	تری‌گلیسیرید (mg/dl)	کلسترول (mg/dl)
سرم خون دام سالم	۵۵/۹±۵/۲ <sup>a</sup>	۲۰/۷±۴/۵ <sup>a</sup>	۴۳/۲±۳/۵ <sup>a</sup>	۶۶/۵±۸/۰ <sup>a</sup>
سرم خون دام کیستی	۵۸/۴±۵/۱ <sup>a</sup>	۱۳/۷±۴/۷ <sup>a</sup>	۴۹/۷±۳/۵ <sup>a</sup>	۷۱/۸±۸/۹ <sup>a</sup>
مایع فولیکول بالغ	۴۵/۹±۴/۶ <sup>b</sup>	۲۴/۳±۴/۲ <sup>a</sup>	۴۰/۶±۳/۳ <sup>b</sup>	۴۲/۳±۸/۰ <sup>a</sup>
مایع فولیکول کیستی	۶۸/۰±۵/۲ <sup>a</sup>	۲۰/۹±۴/۶ <sup>a</sup>	۵۷/۷±۳/۵ <sup>a</sup>	۵۳/۹±۹/۲ <sup>a</sup>

حروف غیرمتشابه در هر ستون نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

جدول ۳- همبستگی پیرسون بین متابولیت‌ها و هورمون‌ها در سرم خون دام کیستی

IGF-I	انسولین	پروژسترون	استروژن	کلسترول	تری‌گلیسیرید	اوره	گلوکز	
۰/۳۸	۰	۰/۳۶	-۰/۳	۰/۵۷	۰/۳۹	۰/۶	۱	گلوکز
۰/۴۵	۰/۲۶	۰/۰۹	-۰/۳۵	۰/۲۴	۰/۲۴	۱	۰/۶	اوره
۰/۲۲	-۰/۰۵	۰/۷ <sup>*</sup>	۰/۳	۰/۴۷	۱	۰/۲۴	۰/۳۹	تری‌گلیسیرید
۰/۶۱ <sup>*</sup>	-۰/۲	۰/۶۳ <sup>*</sup>	۰/۱۵	۱	۰/۴۷	۰/۲۴	-۰/۳	کلسترول
۰/۳۳	-۰/۲۵	۰/۴	۱	۰/۱۵	۰/۳	-۰/۳۵	-۰/۳	استروژن
۰/۵۳	-۰/۵۸	۱	۰/۴	۰/۶۳ <sup>*</sup>	۰/۷ <sup>*</sup>	۰/۰۹	۰/۳۶	پروژسترون
-۰/۲	۱	-۰/۵۸	-۰/۲۵	-۰/۲	-۰/۰۵	۰/۲۶	۰	انسولین
۱	-۰/۲	۰/۵۳	-۰/۳۳	۰/۶۱ <sup>*</sup>	۰/۴۹	۰/۲۲	۰/۳۸	IGF-I

\* معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد

جدول ۴- همبستگی پیرسون بین متابولیت‌ها و هورمون‌ها در مایع فولیکول کیستی

IGF-I	انسولین	پروژسترون	استروژن	کلسترول	تری‌گلیسیرید	اوره	گلوکز	
-۰/۳۷	-۰/۱۳	-۰/۰۲	۰/۰۳	-۰/۳۹	۰/۱۳	۰/۰۴	۱	گلوکز
۰/۵۶	۰/۲۲	۰/۶	-۰/۱۹	۰/۱۳	-۰/۲۹	۱	۰/۰۴	اوره
-۰/۶	-۰/۰۲	-۰/۰۱	-۰/۰۵	-۰/۱۲	۱	-۰/۲۹	۰/۱۳	تری‌گلیسیرید
۰/۴۶	-۰/۵۴	۰/۰۵	۰/۲۸	۱	-۰/۱۲	۰/۱۳	-۰/۳۹	کلسترول
۰/۱۹	۰/۴۶	۰/۲۱	۱	۰/۲۸	-۰/۰۵	-۰/۱۹	۰/۰۳	استروژن
۰/۴۹	۰/۴۶	۱	۰/۲۱	۰/۰۵	-۰/۰۱	۰/۶	-۰/۰۲	پروژسترون
۰/۱۳	۱	۰/۴۶	۰/۴۶	-۰/۵۴	-۰/۰۲	۰/۲۲	-۰/۱۳	انسولین
۱	۰/۱۳ <sup>*</sup>	۰/۴۹	۰/۱۹	۰/۴۶	-۰/۶	۰/۵۶	-۰/۳۷	IGF-I

\* معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد

گزارش کردند. اما، میزان انسولین در مایع فولیکولی فولیکول‌های بالغ در مقایسه با فولیکول‌های کیستی در حدود ۱۸۴ درصد بیشتر بود. براوتال و همکاران (۲۰۰۹) نیز کاهش معنی‌داری در میزان انسولین مایع فولیکولی فولیکول‌های کیستی گزارش کردند. در مطالعه حاضر، روند تغییرات بین استروژن و انسولین در مایع فولیکولی فولیکول‌های کیستی و بالغ مشابه بود. این موضوع در مطالعه ضرایب همبستگی بین استروژن و انسولین نیز تأیید می‌شود که با نتایج کواشیمایا و همکاران (۲۰۰۷) و آرمسترانگ و همکاران (۲۰۰۲) مطابقت دارد.

انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ به عنوان سیگنال‌های متابولیکی برای از سرگیری چرخه فلی در گاوهای شیری پس از زایش مهم می‌باشند (باتلر و همکاران ۲۰۰۴). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که فاکتور رشد شبه انسولین-۱ و انسولین هر دو در انتخاب فولیکول غالب جهت تخم‌ریزی نقش دارند (اسپایسر و همکاران ۲۰۰۴ و والترز و همکاران ۲۰۰۶). تشکیل کیست فولیکولی در گاوهای پرتولید با سطوح کم انسولین سرم خون مرتبط است (ونالدی و همکاران ۲۰۰۵). همبستگی مثبت مشاهده شده میان انسولین و استروژن، در این تحقیق تایید می‌کند که سطوح کم انسولین می‌تواند با سطوح کم استروژن مشاهده شده در کیست‌ها مرتبط باشد. بنابراین هر نوع تغییر در غلظت انسولین ممکن است رشد فولیکولی، بلوغ و پاسخ‌دهی به تحریک LH را تحت تاثیر قرار داده و منجر به عدم تخم‌ریزی و تشکیل کیست شود (ونالدی و همکاران ۲۰۰۵). اینسپاینر و همکاران (۱۹۹۳) گزارش کردند که فاکتور رشد شبه انسولین-۱ در تنظیم سنتز پروژسترون نقش دارد. در این مطالعه با توجه به نتایج بدست آمده و وجود همبستگی مثبت مشاهده شده میان پروژسترون و فاکتور رشد شبه انسولین-۱ و نیز بیشتر بودن میزان فاکتور رشد شبه انسولین-۱ در مایع فولیکولی کیستی نسبت به فولیکول

ضرایب همبستگی بین هورمون‌ها و متابولیت‌های سرم خون و مایع فولیکولی فولیکول کیستی در جداول ۳ و ۴ آمده است. در این مطالعه، ضرایب همبستگی بین استروژن مایع فولیکولی کیستی با مقادیر گلوکز، کلسترول، پروژسترون، انسولین و IGF-1 مایع فولیکولی کیستی مثبت برآورد شد، اما این ضرایب بین استروژن با اوره و تری‌گلیسیرید منفی تعیین شد. همچنین ضرایب همبستگی پیرسون میان استروژن سرم خون با مقادیر تری‌گلیسیرید، کلسترول، IGF-1 و پروژسترون مثبت برآورد شد، اما این ضرایب بین استروژن با گلوکز، اوره، و انسولین منفی تعیین شد.

## بحث

در این مطالعه، غلظت استروژن مایع فولیکول‌های کیستی به طور معنی‌داری کمتر از فولیکول‌های بالغ بود، اما غلظت پروژسترون در مایع فولیکول‌های کیستی بیشتر بود. بنابراین کیست‌های مورد مطالعه در این بررسی از نوع لوتال می‌باشند. کیست‌های لوتال، در واقع همان کیست‌های فولیکولار هستند که در مراحل پیشرفته، سلول‌های گرانولوزای آن لوتینه شده و در نتیجه بجای استروژن، پروژسترون ترشح می‌کنند (سیلیویا و همکاران ۲۰۰۲ و ایزوب و همکاران ۲۰۰۵). همسو با نتایج این مطالعه، رویینسون و همکاران (۲۰۰۶) نیز اختلافی در سطوح استروژن سرم خون دام‌های سالم و کیستی مشاهده نکردند. نتایج این مطالعه با نتایج دیگران (اورتگا و همکاران ۲۰۰۸) در خصوص عدم اختلاف معنی‌دار بین فاکتور رشد شبه انسولین-۱ در سرم خون دام‌های کیستی و سالم مطابقت دارد. همچنین، هماهنگ با اینسپاینر و همکاران (۱۹۹۳) و اورتگا و همکاران (۲۰۰۸) اختلاف معنی‌داری در سطوح فاکتور رشد شبه انسولین-۱ در مایع فولیکول‌های بالغ و کیستی مشاهده نشد. غلظت انسولین در سرم دام‌های کیستی و سالم مشابه بود. کواشیمایا و همکاران (۲۰۰۷) نیز نتیجه مشابهی

بالغ، می‌توان نتیجه گرفت که فاکتور رشد شبه انسولین-۱ در تنظیم سنتز پروژسترون نقش دارد. گلوکز یکی از متابولیت‌های مهم در متابولیسم تخمدان می‌باشد. گلوکز منبع اصلی انرژی بوده و از طریق مسیرهای بی‌هوازی تولید انرژی می‌کند (ایواتا و همکاران ۲۰۰۴). مطالعات در گونه‌های مختلف نشان داده است که میزان گلوکز در مایع فولیکولی با افزایش اندازه فولیکول، افزایش می‌یابد (لری و همکاران ۲۰۰۴b). اما برخی بررسی‌ها نیز نشان داده است که غلظت گلوکز در مایع فولیکولی فولیکول‌های کیستی بسیار کمتر از فولیکول‌های آماده برای تخم‌کری است (تاتچر و همکاران ۲۰۰۴؛ لری و همکاران ۲۰۰۴a و لندوآ و همکاران ۲۰۰۰). بر خلاف نتایج این محققین، در مطالعه حاضر، میزان گلوکز در مایع فولیکول کیستی به طور معنی‌داری بیش از فولیکول بالغ بود ( $P < 0.05$ ). ازدیاد غلظت گلوکز در مایع فولیکول‌های کیستی در این مطالعه می‌تواند مربوط به کاهش سطوح انسولین باشد. در این ارتباط، براوتل و همکاران (۲۰۰۹) نیز سطوح پائین انسولین را در مایع فولیکولی فولیکول‌های کیستی گزارش کردند و این کاهش می‌تواند به دلیل شرایط متابولیسی حیوان باشد. همچنین بالا بودن غلظت تری‌گلیسیرید در مایع فولیکولی فولیکول‌های کیستی در این مطالعه همسو با نتایج سامورتال و همکاران (۲۰۰۸) است که گزارش کردند افزایش تری‌گلیسیرید می‌تواند تاثیر سوء بر فعالیت فولیکولی تخمدان داشته باشد.

#### منابع مورد استفاده

یوسف دوست ی، صمدی ف، مقدم غ، حسنی س و جعفری آهنگری ی، ۱۳۹۰. ارزیابی هورمون‌های استرادیول- 17 بتا، پروژسترون و نیتروژن اورهای خون در گاوهای هلشتاین شیرده یک شکم زائیده و چند شکم زائیده مبتلا به کیست تخمدانی. نشریه پژوهش‌های علوم دامی ۵۶-۴۹: ۲۱.

در مطالعه حاضر تفاوتی در غلظت‌های اوره و کلسترول سرم خون گاوهای سالم و کیستی و نیز مایع فولیکولی فولیکول‌های بالغ و کیستی مشاهده نشد. نتایج این مطالعه از نظر اوره مغایر با نتایج یوسف دوست (۱۳۹۰) مبنی بر افزایش نیتروژن اورهای در سرم خون دام‌های کیستی بود. از طرفی در این مطالعه مشخص شد که همبستگی بالایی بین اوره سرم خون با اوره مایع فولیکولی کیستی وجود دارد. هرچند کلسترول به عنوان پیش‌ساز هورمون‌های استروئیدی تخمدان می‌باشد، اما نتایج مطالعه حاضر و مطالعه کواشیمایا و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که تفاوتی در غلظت‌های کلسترول سرم خون گاوهای سالم و کیستی و نیز مایع فولیکولی فولیکول‌های بالغ و کیستی وجود ندارد. به علاوه، همبستگی مثبت بین سطوح کلسترول مایع فولیکولی کیستی و سرم خون دام‌های کیستی در مطالعه حاضر، بیانگر این موضوع است که سطوح کلسترول مایع فولیکولی کیستی مستقیماً تحت تاثیر سطوح کلسترول سرم خون و در نتیجه جیره غذایی دام می‌باشد. به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که تشکیل کیست فولیکولی تخمدان بیشتر تحت تاثیر ترکیبات مایع فولیکولی بخصوص گلوکز، تری‌گلیسیرید و انسولین می‌باشد.

#### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان قدردانی می‌شود.

Armstrong DG, Gong JG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO and Webb R, 2002. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction* 123:371-378.

- Braw-Tal R, Pen S, and Roth Z, 2009. Ovarian cysts in high-yielding dairy cows. *Theriogenology* 72:690-698.
- Butler WR, 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 60-61:449-457.
- Butler ST, Pelton SH and Butler WR, 2004. Insulin increases 17 $\beta$ -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction* 127:537-545.
- Calder MD, Salfen BE, Bao B, Youngquist RS and Garverick HA, 1999. Administration of progesterone to cows with ovarian follicular cysts results in a reduction in mean LH and LH pulse frequency and initiates ovulatory follicular growth. *J Anim Sci* 77:3037-3042.
- De Wit AAC, Cesar MLF and Kruip TAM, 2001. Effect of urea during in vitro maturation on nuclear maturation and embryo development of bovine cumulus-oocyte-complexes. *J Dairy Sci* 84:1800-4.
- Diskin MG, Mackey DR, Roche JF and Sreenan JM, 2003. Effect of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci* 78:345-370.
- Einspanier R, Schuster H and Schams D, 1993. A comparison of hormone levels in follicle-lutein-cysts and in normal bovine ovarian follicles. *Theriogenology* 40:181-188.
- Hatler TB, Hayes SH, Laranja da Fonseca LF and Silvia WJ, 2003. Relationship between endogenous progesterone and follicular dynamics in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts. *J Biol Reprod* 69:218-223.
- Kawashima C, Fukihara S, Maeda M, Kaneko E, Montoya CA, Matsui M, Shimizu T, Matsunaga N, Kida K, Miyake Y, Schams D and Miyamoto A, 2007. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction* 133:155-163.
- Isobe N, Kitabayashi M and Yoshimura Y, 2005. Microvascular distribution and vascular endothelial growth factor expression in bovine cystic follicles. *Dom Anim Endo* 29:634-645.
- Iwata H, Hashimoto S, Ohota M, Kimura K, Shibano K and Mivake M, 2004. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocyte. *Reproduction* 127:159-164.
- Landau S, Braw-Tal R, Kaim M, Bor A and Bruckental I, 2000. Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cow. *Anim Reprod Sci* 64:139-292.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, Dwulf J and De Kruif A, 2004a. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicular and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *J Anim Reprod Sci* 80:201-211.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PEJ, Dwulf J and De Kruif A, 2004b. Metabolic change in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early postpartum. *Theriogenology* 62:1131-1143.
- Lucy MC, 2007. The Bovine dominant ovarian follicle. *J Anim Sci* 85:89-99.
- Monget P and Martin GB, 1997. Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Hum Reprod* 12 (Suppl. 1):33-52.
- Murahashi K, Bucholtz DC, Nagatani S, Tsukahara S, Tsukamura H, Foster DL and Maeda KI, 1996. Suppression of Latinizing hormone pulses by restriction of glucose availability is mediated by sensors in the brain stem. *Endocrinology* 137:1171-1176.
- Ortega HH, Palomar MM, Acosta JC, Salvetti NR, Dallard BE, Lorente JA, Barbeito CG and Gimeno EJ, 2008. Insulin-like growth factor I in sera, ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous or induced cystic ovarian disease. *Res Vet Sci* 84:419-427.
- Peter AT, 2004. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod Dom Anim* 39:1-7.
- Refsal KR, Jarrin-Maldonado JH and Nachreiner RF, 1988. Basal and estradiol-induced release of gonadotropins in dairy cows and naturally occurring ovarian cysts. *Theriogenology* 30:679-693.
- Robinson RS, Hunter MG and Mann GE, 2006. Supra-basal progesterone concentrations during the follicular phase are associated with development of cystic follicles in dairy cows. *Vet J* 172(2): 340-346.



- Samarütel J, Ling K, Waldmann A, Jaakson, H, Kaart, T and Leesmäe, A, 2008. Field trial on progesterone cycles, metabolic profiles, body condition score and their relation to fertility in Estonian Holstein Dairy cows. *Reprod Dom Anim* 43:457–463.
- SAS Institute, 2002. SAS User's Guide: Statistics. Version 9.1 SAS Institute Inc. Carey, N.C.
- Silvia WJ, Hatler TB, Nugent AM and Laranja da Fonseca LF, 2002. Ovarian follicular cysts in dairy cows: An abnormality in folliculogenesis. *Dom Anim Endocrinol* 23:167–177.
- Sinclair KD, Revilla R, Roche JF, Quintans G, Sanz A, Mackey DR and Diskin MG, 2002. Ovulation of the first dominant follicle arising after day 21 postpartum in suckling beef cows. *J Anim Sci* 75:115–126.
- Spicer LJ, 2004. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biol Reprod* 70:1223–1230.
- Thatcher WW, Bartolome JA, Sozzi A, Silverster F and Santes JEP, 2004 Manipulation of ovarian function for the reproductive management of dairy cows. *Vet Res Commun* 28:111-119.
- Vanholder T, Leroy JLMR, Dewulf L, Duchateau J, Coryn M, De Kruif A and Opsomer G, 2005. Hormonal and metabolic profiles of high-yielding dairy cows prior to ovarian cyst formation or first ovulation post partum. *Reprod Dom Anim* 40:460–467.
- Walters KA, Binnie JP, Campbell, BK, Armstrong DG and Telfer EE, 2006. The effect of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. *Reproduction* 131:515–523.
- Zaied AA, Garverick HA, Bierschwal CJ, Elmore RG, Youngquist RS and Sharp AJ, 1980. Effect of ovarian activity and endogenous reproductive hormones on GnRH induced ovarian cycles in postpartum dairy cows. *J Anim Sci* 50:508–513.

## Comparison of metabolites levels and hormones of estrogen, progesterone, insulin and insulin-like growth factor-1 in blood serum and follicular fluid of mature and cystic follicles in dairy cows

F Samadi<sup>1\*</sup>, K Zanganeh<sup>2</sup>, S Hasani<sup>1</sup> and Y Jafari Ahangari<sup>1</sup>

Received: June 30, 2012 Accepted: April 9, 2013

<sup>1</sup>Associate professor, Department of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

<sup>2</sup>MSc Graduated student, Department of Animal Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

\*Corresponding authors: E-mail: samadi542@yahoo.com

### Abstract

This study was performed to investigate the relationship between concentration changes of metabolites and estrogen, progesterone, insulin and insulin-like growth factor-1 hormones with ovarian follicular cyst formation in dairy Holstein cows. For this purpose, blood samples of 20 dairy cows (10 healthy and 10 suspicious cows to having ovarian follicular cyst) were collected before slaughtering. After slaughtering, ovarian follicular fluid of healthy and cystic follicles were aspirated. The blood and follicular fluid concentrations of glucose, urea, triglyceride, and total cholesterol and also the amounts of estrogen, progesterone, insulin and insulin-like growth factor-1 were determined, using related commercial kits. This study showed that unlike of follicular fluids, the amounts of metabolites were similar in blood serum of healthy and suspicious cows. Glucose concentration was around 148.15 percent higher in cystic follicular fluid than large healthy follicle ( $P<0.05$ ). The amount of triglyceride in cystic follicle fluid was 142.12 percent greater than healthy follicular fluid ( $P<0.05$ ). The amounts of urea and total cholesterol did not differ between cystic and healthy follicular fluids. Estrogen, progesterone, insulin and insulin-like growth factor-1 concentrations did not differ significantly between blood serum of cystic and healthy cows. In comparison between estrogen and progesterone concentrations of follicular fluids, the levels of estrogen around 141.83 percent and progesterone around 241.44 percent were greater in healthy follicular fluid and cystic, respectively ( $P<0.05$ ). Although, the amounts of insulin and insulin-like growth factor-1 did not differ statistically between healthy and cystic follicular fluids, the levels of insulin were 184.62 percent greater in healthy follicular fluid than cystic follicular fluid. Pearson's correlation coefficients between estrogen and glucose, total cholesterol, progesterone, insulin and insulin-like growth factor-1 were positive, while these coefficients between estrogen with urea and triglyceride were negative. In addition, correlation coefficients between blood serum estrogen with triglyceride, total cholesterol, insulin-like growth factor-1 and progesterone were positive, but with glucose, urea and insulin were negative. In general, this study showed that the follicle fate is mainly dependent on the follicular fluid compositions, in particular glucose and triglyceride.

**Key words:** Follicular cyst, Metabolites, Hormones, Holstein