Physiology and Pharmacology, 13 (1), 37 - 47
Spring 2009 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Effects of hypoinsulinemia on leptin secretion, blood and urine metabolites, feeding pattern and internal organs indices in sheep

Farid Moslemipur [1*], Noormohammad Torbatinejad [1], Homayun Khazali [2], Saeed Hasani [1], Taghi Ghoorchi [1]

1. Dept. Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Dept. Biology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 19 Nov 2008 **Revised: 11 Jan 2009** **Accepted: 9 Feb 2009**

Abstract

Introduction: The role of insulin and its importance in ruminants are different form monogastrics. In this study, permanent hypoinsulinemia with different severities was induced by low, intermediate and high doses of streptozotocin in sheep (25, 50 and 75 mg/kg body weight, respectively).

Methods: Twenty male lambs were divided into 4 treatment groups and were maintained individually. Three intravenous injections of streptozotocin were given. The whole experiment lasted 8 weeks, and injections were administered by the end of the third week. Blood samples were collected weekly by venipuncture at fasting state and 2.5 h post-prandial. Food and water intake, as well as weight changes were measured weekly. After slaughter, internal organs were weighed and urine samples were collected from the bladder.

Results: Animals receiving the high dose of streptozotocin could not continue the experiment because of abnormalities. The intermediate dose caused significant decrease in fasted and post-prandial insulin concentrations as well as fasted leptin levels compared to control ($P<0.05$). This dose also induced a significant increase in blood glucose, triglycerides, cholesterol, total protein, blood urea nitrogen and keton bodies compared to control ($P<0.05$). These animals also showed diabetic hyperphagia and enhanced water intake in weeks after injection in comparison with the control group ($P<0.05$) but in spite of increased food intake, they could not gain more weight than controls. Urine sugar and protein levels were increased dose-dependently but these changes did not reach significance ($P>0.05$). Weights and indices of internal organs showed no difference among groups, but only carcass weight in the group of intermediate dose was significantly higher than other groups.

Conclusion: Our results suggest a pivotal regulatory role for insulin in energy metabolism of ruminants by exerting two opposing effects; central catabolic and peripheral anabolic. These data are consistent with the findings in monogastric animals.

Keywords: Hypoinsulinemia, Leptin, Streptozotocin, Blood Metabolites, Sheep.

* Corresponding author e- mail: moslemipurf@gau.ac.ir
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۳ (۱)، ۳۷ – ۴۷
بهار ۱۳۸۸

فیزیولوژی و فارماکولوژی

القای هایپواینسولینمیا و تاثیر آن بر ترشح لپتین، متابولیت‌های خون و ادرار، الگوی تغذیه‌ای و شاخص اندام‌های داخلی در گوسفند

فرید مسلمی‌پور[۱*]، نورمحمد تربتی‌نژاد[۱]، همایون خزعلی[۲]، سعید حسنی[۱]، تقی قورچی[۱]
۱. گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۲. دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

دریافت: ۲۸ آبان ۸۷ بازبینی: ۲۱ دی ۸۷ پذیرش: ۲۰ بهمن ۸۷

چکیده

مقدمه: نقش و اهمیت انسولین در نشخوارکنندگان متفاوت از تک‌معده‌ایهاست. در این تحقیق هایپواینسولینمیا دائمی با شدت‌های متفاوت توسط دوزهای ۲۵ (کم)، ۵۰ (متوسط) و ۷۵ (بالا) استرپتوزوتوسین (mg/kg BW) در گوسفند ایجاد شد.

روش‌ها: بیست بره پرواری به چهار گروه تیماری تقسیم و بصورت انفرادی نگهداری شدند. تیمارها شامل شاهد و تزریق منفرد و درون‌رگی سه دوز استرپتوزوتوسین بود. دوره تحقیق شامل هشت هفته متوالی بود که تزریق استرپتوزوتوسین در پایان هفته سوم انجام گرفت. نمونه‌های خون از رگ وداج به طور هفتگی و در حالت‌های ناشتا و ۲/۵ ساعت بعد تغذیه جمع‌آوری و آنالیز شد. مصرف خوراک و آب و همچنین تغییرات وزن حیوانات اندازه‌گیری گردید. بعد از کشتار، اندام‌های درونی توزین شد و نمونه ادرار از مثانه جمع‌آوری گردید.

یافته‌ها: با تزریق دوز بالا، حیوانات دچار شرایط غیرعادی شده و نتوانستند آزمایش را ادامه دهند. نتایج حاکی از بروز هایپواینسولینمیا با تزریق دوز متوسط بود که با کاهش معنی‌دار غلظت انسولین ناشتا و بعد تغذیه و همچنین غلظت لپتین ناشتا نسبت به شاهد همراه بود ($P<0.05$). دوز متوسط باعث افزایش معنی‌داری در سطح گلوکز، تری‌گلیسریدها، کلسترول، پروتئین تام، ازت اوره‌ای و همچنین اجسام کتونی خون نسبت به شاهد شد ($P<0.05$). حیوانات با تزریق دوز متوسط، پرخوری دیابتی و افزایش مصرف آب را در هفته‌های بعد تزریق نسبت به شاهد نشان دادند ($P<0.05$) ولی علیرغم مصرف غذای بیشتر نتوانستند وزن بیشتری نسبت به شاهد کسب کنند. غلظت قند و پروتئین ادرار به طور وابسته به دوز افزایش داشت ولی معنی‌دار نبود ($P>0.05$). وزن و شاخص اندام‌های داخلی بدن بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نشان نداد فقط وزن لاشه در گروه دوز متوسط نسبت به دو گروه دیگر بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر نقش حیاتی تنظیمی انسولین در متابولیزم انرژی نشخوارکنندگان بوده که با اعمال دو اثر متضاد کاتابولیک مغزی و آنابولیک محیطی می‌باشد که موافق با یافته‌ها در تک‌معده‌ایها بود.

واژه‌های کلیدی: هایپواینسولینمیا، لپتین، استرپتوزوتوسین، متابولیت‌های خون، گوسفند.

مقدمه

عوامل متعددی درونی و بیرونی بر متابولیزم انرژی در بدن پستانداران نقش دارند که یکی از مهمترین آنها اشتها می‌باشد. اشتها به نوبه خود تحت تاثیر دو دسته سیگنال با اثرات متضاد بوده؛ سیگنال‌های orexigenic مانند NPY[1]، AgRP[2]،

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: moslemipurf@gau.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

1. Neuropeptide Y
2. Agouti gene-Related Peptide

ghrelin و orexin که اشتها را تحریک می‌کنند در حالی که سیگنال‌های anorexigenic مانند انسولین، لپتین، POMC[1] اشتها را سرکوب می‌کنند و نتیجتاً برایند اثر این دو دسته سیگنال سطح اشتها را مشخص می‌کند [۱۰، ۳۴، ۴۱].

انسولین و لپتین با همکاری یکدیگر اشتها را مهار می‌کنند. در پیرامون بدن، هر دو هورمون متناسب با توده چربی بدن ترشح می‌شوند و به عنوان سیگنال چاقی وارد مغز می‌شوند [۲۲، ۳۹] که با دو گروه متمایز از نورون‌ها در ارتباطند؛ نورون‌های NPY/AgRP که توسط آنها مهارشده [۳۳، ۳۵، ۳۷] و گروه دیگر، نورون‌های POMC که توسط آنها تحریک می‌شوند [۶، ۹، ۳۷].

انسولین بیشتر به خاطر نقش تنظیمی قند خون و به عنوان یک هورمون آنابولیک مطرح است در حالیکه در مغز، انسولین اثر کاتابولیک دارد که به خاطر کاهش اشتهاست و در گونه‌های مختلف مشاهده شده است [۱، ۱۱، ۳۳]. از سوی دیگر، انسولین یک محرک قوی ترشح لپتین از سلول‌های بافت چربی است [۴، ۲۴].

مطالعات بسیار کمی درباره نقش هورمون‌های انسولین و لپتین در متابولیزم انرژی در حیوانات نشخوارکننده صورت گرفته است. اغلب مطالعات در این باره در حیوانات تک‌معده‌ای بوده است حال آنکه تفاوت‌های چشمگیری در مسیرهای نورواندوکرین، سوخت‌های متابولیک [۷، ۱۲]، الگوهای تغذیه‌ای و حساسیت به انسولین [۲۵، ۲۹، ۳۱] در نشخوارکنندگان با تک‌معده‌ایها وجود دارد. پس، انجام مطالعاتی که تعیین کننده نقش این هورمون‌ها در متابولیزم و رشد نشخوارکنندگان باشد، ضروری به نظر می‌رسد. کاهش سطح انسولین خون (هایپواینسولینمیا[2]) یک شرایط مناسب برای بررسی نقش انسولین در کنترل ترشح هورمون‌ها، اشتها و همچنین شاخص‌های رشد حیوان است. بدین منظور در تحقیق حاضر اثر القای هایپواینسولینمیا به وسیله استرپتوزوتوسین (STZ[3]) بر ترشح لپتین، متابولیت‌های خون و ادرار، مصرف خوراک و آب و همچنین شاخص‌های رشد فیزیکی و شاخص وزن برخی اندام‌های داخلی در بره‌های پرواری بررسی گردید.

1. Proopiomelanocortin
2. Hypoinsulinemia
3. Streptozotocin

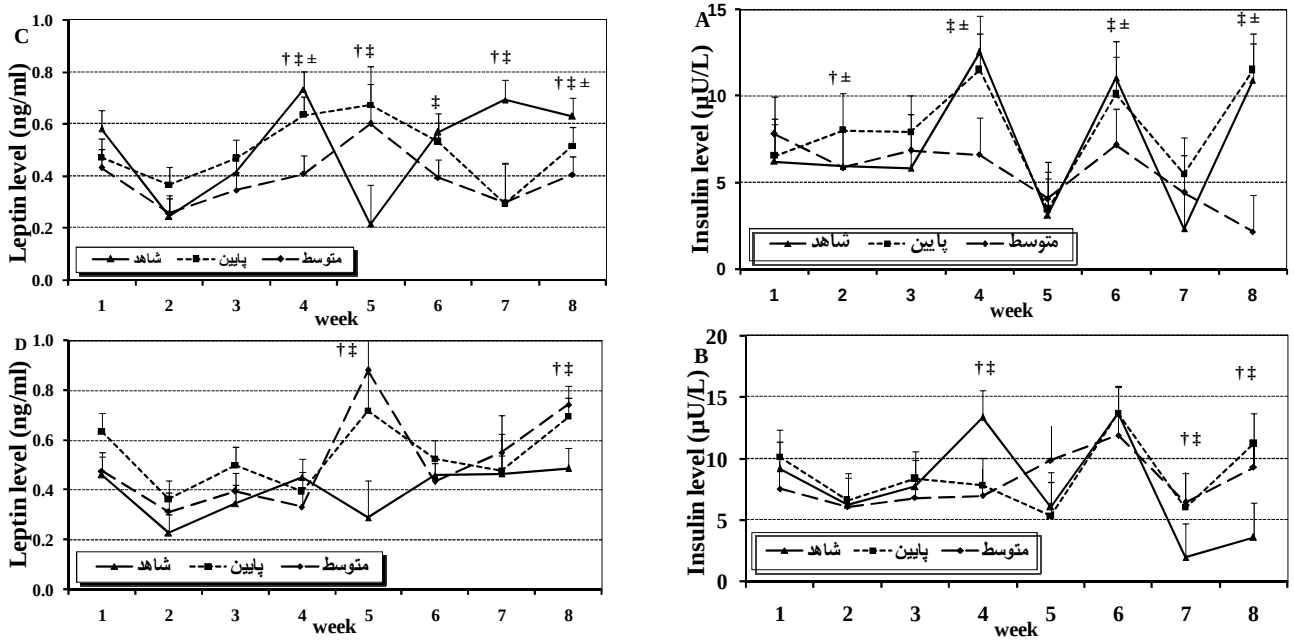
مواد و روش‌ها

حیونات آزمایشی: بیست بره نر از نژاد زِل (حدوداً سه ماهه) با میانگین وزن ۱±۱۹/۴ کیلوگرم مورد انتخاب و بوسیله شماره گوش پلاستیکی مشخص شدند. دو هفته قبل از شروع آزمایش، حیوانات به طور تصادفی به چهار گروه تیماری تقسیم شده و هر یک در قفس انفرادی (۲/۲۵ متر مکعب) و دارای سایبان تحت شرایط نوری و دمایی محیطی قرار گرفتند. نیازها غذایی گوسفندان و جیره آنها بر اساس جداول استاندار NRC[4] [۲۳] مشخص گردید. حیوانات به صورت آزاد با جیره‌ای متشکل از ۶۰ درصد یونجه خشک و ۴۰ درصد کنسانتره به صورت جیره کاملاً مخلوط تغذیه شدند (ماده خشک حدوداً ۹۰ درصد) که حاوی ۲/۶ مگاکالری انرژی متابولیزمی و ۱۴ درصد پروتئین خام در کیلوگرم ماده خشک بود. آجر معدنی و آب تازه و بهداشتی به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار داشت. بعد از دو هفته عادت‌دهی به شرایط و جیره آزمایشی، مرحله اصلی آزمایش آغاز گردید که شامل هشت هفته متوالی بود؛ سه هفته به عنوان مرحله قبل تزریق و پنج هفته بعدی به عنوان مرحله بعد تزریق. بدین منظور، تزریق STZ در پایان هفته سوم صورت گرفت و بعد آن حیوانات وارد مرحله بعد تزریق شدند.

القای هایپواینسولینمیا: هایپواینسولینمیا از طریق تزریق منفرد و درون‌رگی STZ (شرکت سیگما، آمریکا) و بر اساس مطالعات قبلی [۱۶، ۲۶] ایجاد شد. به طور خلاصه،STZ در بافر سیترات (pH=۴/۵) برای سه غلظت نهایی مختلف حل شده و سریعاً به کمک سرنگ استریل از طریق سیاهرگ وداج و در کمتر از پنج دقیقه تزریق گردید. بنابراین تیمارها شامل تزریق دوزهای پایین (کم)، ۵۰ (متوسط) و ۷۵ (بالا) STZ به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بود. گروه شاهد فقط بافر سیترات را به تنهایی دریافت کرد.

چهل و هشت ساعت بعد از تزریق، حیوانات گروه دوز بالا علایم دیابتی شدید مانند بیحالی، تکرر ادرار و بی‌اشتهایی را نشان دادند که نتیجتاً برای بقا نیاز به انسولین‌درمانی و الکترولیت‌درمانی پیدا کرده و در واقع در شرایط غیرعادی قرار گرفتند. بنابراین با توجه به به تزریق انسولین، داده‌های مربوط به

4. National Research Council



شکل ۱- تغییر در غلظت انسولین (A: ناشتا و B: بعد تغذیه) و لپتین (C: ناشتا و D: بعد تغذیه). * †† ‡ ± به ترتیب به معنی وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه شاهد و گروه دوز پایین، بین گروه شاهد و گروه دوز متوسط، بین گروه دوز پایین و متوسط.

این گروه قابل استفاده نبوده و از اینجا به بعد آزمایش با سه گروه دیگر ادامه یافت.

گردآوری داده‌ها: در هر هفته، مصرف غذا و آب در یک روز خاص اندازه‌گیری شد و به کل هفته مربوطه تعمیم داده شد. برای این موضوع، آب و غذا را وزن کرده و طی دو وعده در روز (در ساعات ۸ و۱۳) و به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار گرفت و باقیمانده آب و غذا در حدفاصل ساعت ۷ تا ۸ روز بعد وقتی که حیوانات از خوردن و آشامیدن امتناع می‌کردند، اندازه‌گیری می‌شد. توزین حیوانات به طور هفتگی در ساعت ۷ و در حالت ناشتا انجام گرفت و تغییرات وزن هفتگی نیز محاسبه گردید.

نمونه‌های خون در یک روز خاص هفته در دو نوبت (ناشتا و ۲/۵ ساعت بعد ار تغذیه) توسط لوله‌های استریل حاوی خلا (شرکت پارس خاور، ایران) و از طریق رگ وداج صورت گرفت. روزهای خونگیری مجزا از روزهایی اندازه‌گیری مصرف خوراک، آب و وزن بود تا استرس خونگیری بر فاکتورهای یاد شده تاثیر نگذارند. نمونه‌های خون به سرعت سانتریفیوژ شده (۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه) و سرم آنها جمع‌آوری و تا زمان اندازه‌گیری هورمون‌ها و متابولیت‌های خونی در داخل لوله‌های استریل در دمای ۲۵°C- منجمد گردید.

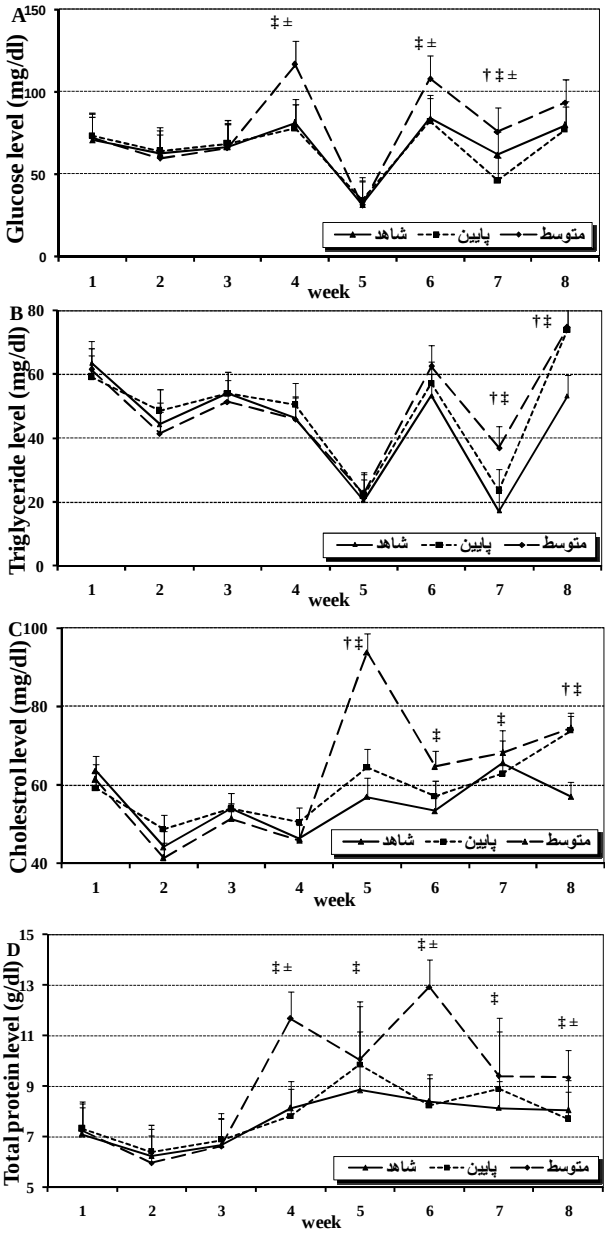
متابولیت‌های خونی و ادرار به روش‌های اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد [۳۸]. به طور خلاصه، گلوکز به روش گلوکز اکسیداز، تری‌گلیسریدها به روش گلیسرول ۳-فسفات، کلسترول به روش کلسترول اکسیداز، ازت اوره‌ای خون به روش بِرتولِت، آلبومین به روش بروموکرزول گرین، اجسام کتونی به روش نوار نیتروپروساید (شرکت پارس آزمون، ایران) و پروتئین تام به روش تغییر یافته بیورت (شرکت زیست‌کم، ایران) اندازه‌گیری شد.

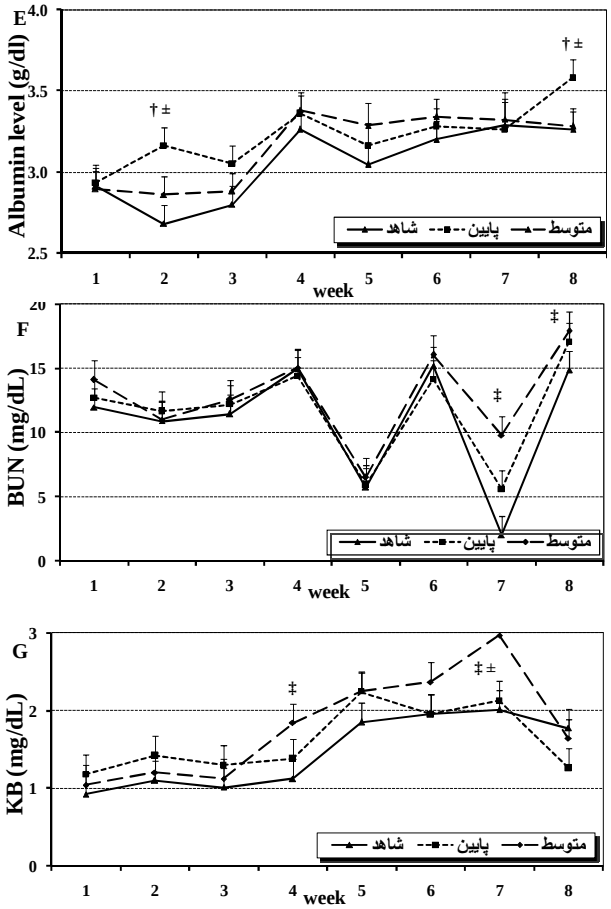
غلظت انسولین و لپتین سرم به روش رادیوایمیونواسی[1] به کمک کیت‌های تجاری شرکت TYN (بلژیک) که حاوی آنتی‌بادی مخصوص علیه انسولین و لپتین گوسفندی[2] بودند، اندازه‌گیری شد. ضریب تغییرات اندازه‌گیری داخلی و خارجی این کیت‌ها به ترتیب کمتر از ۵ درصد و ۹ درصد برای انسولین و کمتر از ۵ درصد و ۶ درصد برای لپتین ذکر شده است.

در پایان آزمایش، حیوانات ذبح شده و اندام‌های دورنی شامل کبد، پانکراس، قلب، کلیه‌ها، شش‌ها و چربی احشایی به دقت از بدن آنها جداسازی و توزین گردید. نمونه ادرار جهت تعیین قند آن به طور مستقیم و توسط سرنگ از داخل مثانه جمع‌آوری شد.

آنالیز داده‌ها: داده‌هایی مربوط به هورمون‌ها، متابولیت‌های خون و شاخص‌های تغذیه‌ای به روش اندازه‌گیری‌های مکرر[3] و

1. Radioimmunoassay
2. Ovine
3. Repeated measures





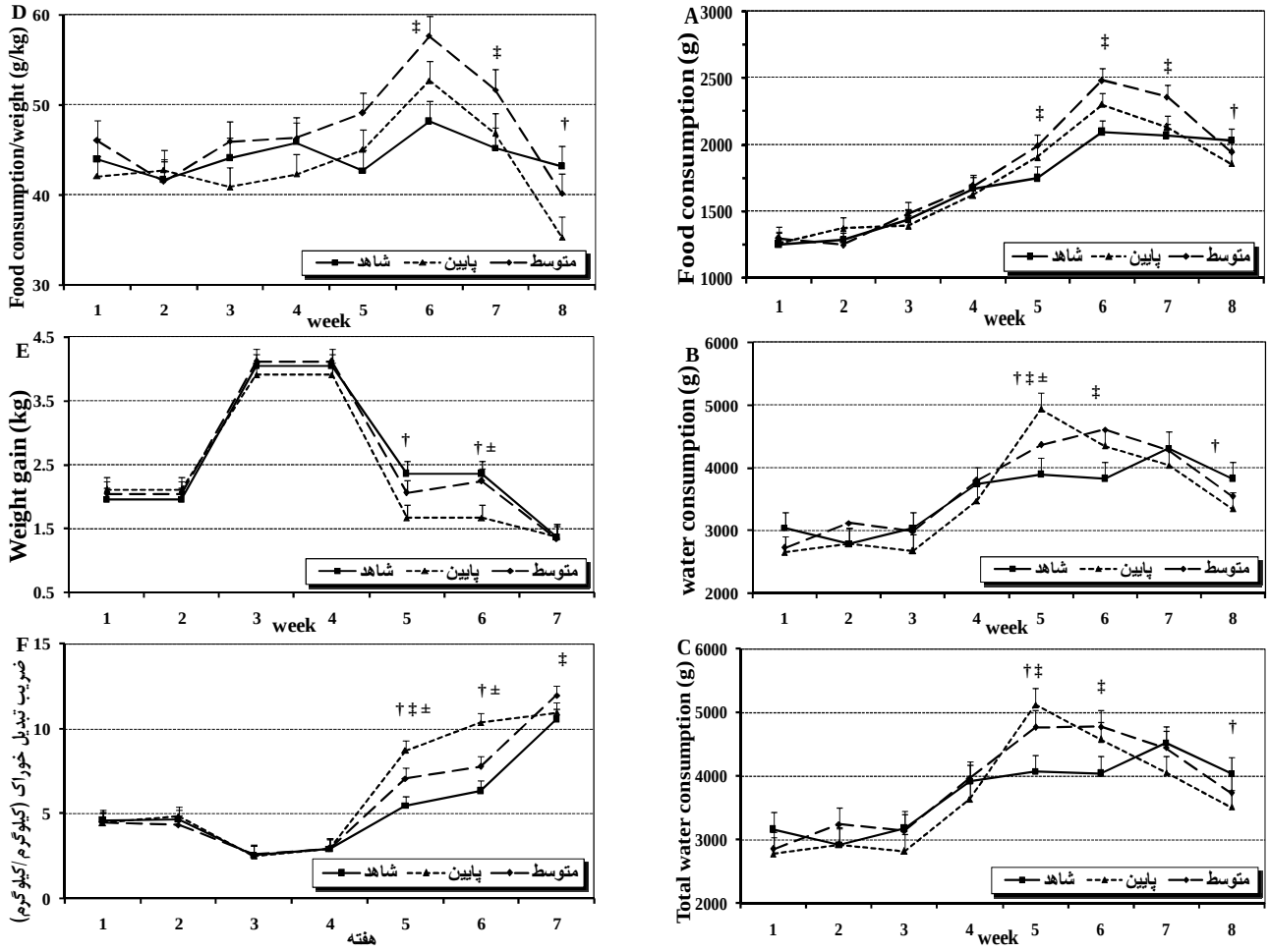
شکل ۲- میانگین غلظت متابولیت‌های خون طی آزمایش (A: غلظت گلوکز، B: غلظت تری‌گلیسریدها، C: غلظت کلسترول، D: غلظت پروتئین تام (TP)، E: غلظت آلبومین، F: غلظت ازت اوره‌ای (BUN) و غلظت اجسام کتونی (KB). † ‡ ± به ترتیب به معنی وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه شاهد و گروه دوز پایین، بین گروه شاهد و گروه دوز متوسط، بین گروه دوز پایین و متوسط.

یافته‌ها

در بررسی اثرات اصلی برخی متغیرها، اثر هفته معنی‌دار شد که قابل پیش‌بینی بود و مربوط به ماهیت این متغیرها و اثرات محیطی است. بنابراین، مقایسات بین تیمارها در هر هفته به عنوان مقایسه مناسب مورد استفاده قرار گرفت.

بعد تزریق دوز متوسط، سطح انسولین ناشتا کاهش چشمگیری در هفته‌های چهار، شش و هشت نشان داد (شکل ۱-A). در این گروه، سطح انسولین ناشتا به میزان ۵۲، ۶۵ و ۲۰ درصد گروه شاهد به ترتیب در هفته‌های چهار، شش و هشت کاهش یافت ($P<0.05$). روند مشابهی برای سطح انسولین بعد تغذیه در هفته‌های چهار و هشت مشاهده شد

با استفاده از روش Mixed نرم‌افزار آماری SAS [۳۰] پردازش شدند. اثرات آزموده شده شامل اثر تیمار (بافر سیترات یا STZ)، اثر هفته (زمان) و اثر متقابل آنها بود. میانگین‌ها به صورت میانگین حداقل مربعات (LSMEAN) به همراه خطای استاندارد نمایش و مقایسات میانگین به روش توکی- کرامر انجام گرفت. سایر داده‌ها (قند و پروتئین ادرار و اندام‌های درونی) به روش کاملاً تصادفی و روش ANOVA پردازش شد. مقایسه میانگین آنها به روش دانکن انجام گرفت. مقایساتی که P value آنها کمتر از ۰/۰۵ بود، از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.



شکل ۳- مقایسه میانگین بین شاخص‌های مصرف و رشد طی آزمایش (A: مصرف خوراک، B: مصرف آب، C: مصرف کل آب، D: مصرف خوراک/وزن، E: افزایش وزن، F: ضریب تبدیل خوراک). † ‡ ± به ترتیب به معنی وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه شاهد و گروه دوز پایین، بین گروه شاهد و گروه دوز متوسط، بین گروه دوز پایین و متوسط.

(شکل ۱-B). غلظت لپتین خون در حالت ناشتا نیز بعد از تزریق دوزهای پایین و متوسط طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش داشت ($P<0/05$) بجز در هفته پنجم (شکل ۱-C) اگرچه این روند برای غلظت لپتین بعد از تغذیه مشاهده نشد (شکل ۱-D).

همانطور که انتظار می‌رفت، غلظت گلوکز خون با تزریق STZ یک افزایش وابسته به دوز نشان داد بویژه در هفته‌های چهار، شش و هفت (شکل ۲-A). غلظت گلوکز بعد از تزریق دوز متوسط، به میزان ۱۱۶/۶ میلی‌گرم در دسی‌لیتر در هفته چهارم رسید در حالی که در گروه شاهد ۸۱/۲ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود ($P<0/05$). افزایش در سطح تری‌گلیسریدهای خون در هفته‌های هفت و هشت با تزریق دوزهای پایین و متوسط نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (شکل ۲-B). سطح کلسترول خون نیز با تزریق دوز متوسط نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری در هفته‌های پنج تا هشت بالاتر بود (شکل ۲-C). دوز متوسط، غلظت پروتئین تام خون را نیز نسبت به گروه شاهد در هفته‌های چهار تا هشت افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۲-D). غلظت آلبومین خون اگرچه با تزریق دوزهای پایین و متوسط افزایش یافت ولی بجز در هفته هشتم، معنی‌دار نبود (شکل ۲-E). غلظت ازت اوره‌ای خون (شکل ۲-F) با تزریق دوز متوسط به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد در دو هفته پایانی افزایش یافت (۹/۷۸ در مقابل ۲ و ۱۷/۹۲ در مقابل ۱۴/۸۹ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به ترتیب برای هفته‌های هفت و هشت). غلظت اجسام کتونی خون نیز در این گروه نسبت به گروه شاهد در هفته‌های چهار و هفت افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۲-G).

نتایج نشان داد که القای هایپوانسولینمیا باعث یک افزایش وابسته به دوز در مصرف خوراک شد به طوری که تزریق دوز متوسط به میزان ۲۴۲، ۳۸۸/۸ و ۲۹۰ گرم در

جدول ۱- مقایسه میانگین غلظت قند و پروتئین ادرار، وزن لاشه، ضربان قلب و دمای رکتوم حیوانات آزمایشی

متغیر	P value	میانگین*		
		شاهد	دوز پایین	دوز متوسط
قند ادرار (mg/dl)	۰/۳۵۱	۹/۶۶ a	۱۱/۰۰ a	۱۸/۶۶ b
پروتئین ادرار (mg/dl)	۰/۳۳۹	۴۹/۴۰ a	۵۳/۵۷ a	۶۶/۶۰ b
وزن لاشه (kg)	۰/۴۳۵	۱۹/۸۶ a	۲۱/۱۳ a	۲۱/۸۶ a
ضربان قلب (بار در دقیقه)	۰/۸۶۹	۷۶/۲ a	۷۵/۰ a	۷۸/۲ a
دمای رکتوم (°C)	۰/۷۶۷	۳۵/۹ a	۳۶/۳ a	۳۶/۷ a

* مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. در هر ردیف، میانگین‌های با حروف غیریکسان از لحاظ آماری معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

مصرف خوراک را نسبت به گروه شاهد به ترتیب در هفته‌های پنج، شش و هفت افزایش مشاهده شد. (شکل ۳-A). اگرچه این اثر افزایشی با تزریق دوز پایین نیز مشاهده شد ولی این تفاوت معنی‌دار نگردید (P<۰/۰۵). مصرف آب با تزریق دوزهای پایین و متوسط در هفته‌های پنج و شش نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۳-B). بعلاوه، مصرف کل آب (مجموع مصرف آب آشامیدنی بعلاوه ۱۰ درصد مصرف خوراک) در گروهی که دوز متوسط دریافت کردند نسبت به گروه شاهد در هفته‌های پنج و شش بیشتر بود (شکل ۳-C). نسبت مصرف خوراک به وزن بدن با تزریق دوز متوسط نسبت به گروه شاهد در هفته‌های شش و هفت افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۳-D). جالب اینکه حیواناتی که دوزهای پایین و متوسط دریافت کردند نسبت به گروه شاهد افزایش وزن کمتری داشتند (شکل ۳-E). ضریب تبدیل خوراک (کیلوگرم غذای مصرفی بر کیلوگرم افزایش وزن در یک زمان مشخص) نیز با تزریق دوز متوسط نسبت به گروه شاهد در هفته‌های پنج و هفت افزایش معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۵) که البته با تزریق دوز پایین نیز افزایش بارزی در این ضریب نسبت به دو گروه دیگر در هفته‌های پنج و شش مشاهده شد (شکل ۳-F).

غلظت قند و همچنین پروتئین تام ادرار یک افزایش وابسته به دوز بین گروه‌ها نشان داد که این افزایش نسبت به دو گروه دیگر معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) به طوری که غلظت قند ادرار با تزریق دوز متوسط حدوداً به دو برابر گره شاهد رسید. نرخ ضربان قلب و دمای رکتوم تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیماری نشان نداد. (جدول ۱).

بین وزن و شاخص (درصد از وزن بدن) اندام‌های داخلی بدن (جدول ۲) بین گروه‌های تیماری، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). شایان ذکر است که بین داده‌های مربوط به این متغیرها تفاوت‌های فردی درون‌گروهی زیادی مشاهده شد که منجر به بالا رفتن خطای استاندارد شد و احتمالاً به علت پراکنش ژنتیکی این صفات در بین افراد گله بود.

جدول ۲- مقایسه وزن و شاخص (به صورت نسبتی از وزن بدن) اندام‌های داخلی بدن بین سه گروه تیماری

	متغیر	P value	میانگین*		
			شاهد	دوز پایین	دوز متوسط
کبد	وزن (گرم)	۰/۱۰۲	۵۹۰/۰ a	۶۸۳/۳ a	۷۲۳/۳ a
	شاخص (%BW)	۰/۱۹۵	۱/۲۹ a	۱/۴۷ a	۱/۵۹ a
قلب	وزن (گرم)	۰/۲۹۶	۱۶۱/۶ a	۱۵۶/۶ a	۱۵۹/۶ a
	شاخص (%BW)	۰/۸۰۹	۰/۳۵ a	۰/۳۳ a	۰/۳۴ a
کلیه	وزن (گرم)	۰/۱۲۵	۱۱۰/۳ a	۱۱۰/۰ a	۱۱۰/۷ a
	شاخص (%BW)	۰/۶۳۶	۰/۲۴ a	۰/۲۳ a	۰/۲۲ a
شش‌ها	وزن (گرم)	۰/۲۷۱	۳۷۳/۳ a	۴۰۶/۶ a	۴۲۶/۶ a
	شاخص (%BW)	۰/۲۹۶	۰/۸۲ a	۰/۸۷ a	۰/۹۳ a
چربی احشایی	وزن (گرم)	۰/۹۴۵	۳۹۰/۰ a	۳۱۶/۷ a	۳۳۶/۷ a
	شاخص (%BW)	۰/۹۴۳	۰/۸۶ a	۰/۷۰ a	۰/۷۳ a

* مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. در هر ردیف، میانگین‌های با حروف غیریکسان از لحاظ آماری معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

بحث

در تحقیقی حاضر، حیوانات دیابتی، بویژه با گروهی که دوز متوسط دریافت کردند، پرخوری دیابتی را در هفته‌های پنجم به بعد نشان دادند که مشابه با مشاهدات موجود در جوندگان است [۲، ۳، ۲۱، ۳۶]. البته این حیوانات، پرخوری دیابتی را با شدتی کمتر از آنچه در جوندگان مشاهده شده، نشان دادند. سیری فیزیکی می‌تواند یک دلیل منطقی برای این تفاوت باشد چراکه بخاطر نوع غذای مصرفی نشخوارکنندگان، که خشبی و حاوی فیبر زیادی است، دچار پرشدگی دستگاه گوارش و بالتبع جلوگیری از مصرف غذای بیشتر می‌شود. همچنین اگر مصرف خوراک را به صورت نسبتی از وزن بدن بیان کنیم (شکل ۳-D)، باز هم مصرف خوراک در حیوانات گروه دوز متوسط در هفته‌های ابتدایی بعد تزریق به طور نامحسوس و در هفته‌هایی پایانی به طور محسوس و معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بیشتر بود.

همان طوریکه در انسان و جوندگان مشخص شده [۴، ۸]، نقش تنظیمی انسولین در ترشح لپتین در نشخوارکنندگان در این تحقیق نیز ظاهر گردید به طوری که ایجاد هایپوانسولینمیا مصادف با ایجاد هایپولپتینمیا بود اگرچه این بیشتر در حالت ناشتا مشخص است. بنابراین، کاهش سطح انسولین و لپتین در اثر تزریق دوز متوسط را می‌توان به عنوان عامل مهمی در پرخوری این حیوانات دانست. مطالعات پیشین اثر مهاری لپتین بر اشتها در گوسفند را نشان داده است [۱۴، ۳۷].

به رغم افزایش مصرف خوراک، حیوانات دیابتی نتوانستند وزنی حتی در سطح حیوانات گروه شاهد کسب کنند در واقع حیوانات دیابتی در مقایسه با گروه شاهد وزن از دست داده‌اند که مشابه با نتایج مطالعات پیشین در جوندگان [۱۵، ۲۱] و گاو [۱۶] است. جالب اینکه ضریب تبدیل خوراک در گروه دوز متوسط در هفته‌های پایانی به طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود. البته دلیل آن مشخص است چراکه حیوانات دیابتی به رغم مصرف غذای بیشتر (شکل ۳-A)، افزایش وزن به نسبت کمتری نسبت به گروه شاهد داشتند (شکل ۳-E) بنابراین ضریب تبدیل غذایی آنها بالاتر و در واقع ابقای انرژی و ازت به صورت افزایش وزن، در حیوانات گروه دوز متوسط کمتر بوده است. البته شاخص ضریب تبدیل خوراک بیشتر در دام‌ها محاسبه می‌شود ولی نتایج مشابهی در جوندگان مشاهد شده که حیوانات دیابتی به رغم مصرف غذای بیشتر، افزایش وزن کمتری کسب نموده‌اند [۲، ۳، ۱۵].

یک هفته پس از القای هایپوانسولینمیا، مصرف آب و مصرف آب کل، بویژه با تزریق دوز متوسط، افزایش یافت که موافق با نتایج موجود در جوندگان است که بیان شده که بیشتر بخاطر افزایش حجم ادرار و بخشی بخاطر افزایش سطح نورآدرنالین (محرک مصرف آب) در هیپوتالاموس است [۳، ۲۱، ۳۶]. متاسفانه در تحقیق حاضر به رغم تلاش، حجم ادرار تولیدی اندازه‌گیری نشد ولی حجم ادرار دفعی حیوانات در گروه دوز متوسط به صورت چشمی به وضوح از سایر گروه‌ها بیشتر بود و نیاز به تعویض بستر آنها بیشتر بود.

همانطور که در انسان و جوندگان نیز مشاهده شده، حیواناتی که دوز متوسط را دریافت کردند، دارای سطوح بالایی از قند، تری‌گلیسریدها و پروتئین خون بوده که می‌توان آن را نتیجه‌ای از پرخوری و همچنین بخاطر فقدان ورود این مواد از خون به داخل بافت‌ها دانست. در حقیقت این بیانگر کاهش اثر آنابولیک محیطی انسولین است و افزایش سطح قند و پروتئین ادرار این حیوانات، شاهد این مدعاست. القای دیابت در مطالعات پیشین در جوندگان [۱۷، ۲۱، ۲۸] و گوسفند [۱۸] نیز با افزایش سطح تری‌گلیسریدهای خون همراه بوده است. همچنین در گوسفند افزایش سطح پروتئین ادرار منعکس کننده افزایش سطح پروتئین تام خون بوده است.

سطح بالای اجسام کتونی که در حیوانات دیابتی مشاهده شد (بویژه در گروه دوز متوسط) الزاماً مشابه با کتواسیدوزیس دیابتی در انسان و جوندگان نیست چون ممکن است سطح بالای کتواسیدها در خون به علت تولید بیشتر اسیدهای چرب فرار (که غالباً کتواسید هستند) ناشی از پرخوری باشد [۷، ۱۲]. با این حال تفکیک این دو اثر و تعیین نقش هریک مشکل به نظر می‌رسد. مطالعات پیشین در جوندگان وقوع کتواسیدوزیس را با استفاده از دوزهای بالای STZ (بالاتر از ۱۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) نشان داده است [۱۷]. نتایج مشابهی در گوسفند [۲۶] و گاو [۲۵] نیز حاصل شده است.

غلظت ازت اوره‌ای خون با تزریق دوز متوسط افزایشی را در دو هفته پایانی نسبت به گروه شاهد نشان داد که مشابه با نتایج مطالعه پیشین در گاوهای دیابتی است [۲۵]. سطوح بالای

پروتئین تام و ازت اوره‌ای خون حیوانات دیابتی در تحقیق حاضر قویاً بیانگر آسیب در متابولیزم نیتروژن در حالت دیابت است که عمدتاً مربوط به عدم جذب پروتئین‌ها از خون به داخل بافت‌های محیطی و نتیجتاً تجزیه آنهاست.

نرخ ضربان قلب و دمای داخل بدن به عنوان دو شاخص از میزان متابولیزم پایه در بدن می‌باشند. در این تحقیق، تفاوت معنی‌داری در میزان این دو متغییر در حیوانات گروه دوز متوسط با دو گروه دیگر مشاهد نشد. در تحقیقی، القای دیابت در گوسفند با دو تزریق متوالی دوز ۶۰ (mg/kg BW) نیز اثر معنی‌داری بر نرخ ضربان قلب و دمای رکتوم نداشت [۲۶].

تغییر در وزن اندام‌های داخلی و یا شاخص وزن آنها در برخی بیمارها مشاهده می‌شود. در تحقیق حاضر، تفاوت معنی‌داری در وزن و شاخص اندام‌های داخلی (به صورت درصدی از وزن بدن) و همچنین وزن لاشه در سه گروه آزمایشی مشاهده نمی‌شود. در مطالعات محدودی و آن هم به صورت ماکروسکوپیک به بررسی تغییرات فیزیکی این اندام‌ها در حیوانات پرداخته شده است که تفاوت معنی‌داری را برای وزن قلب [۲۶]، کلیه [۱۶]، معده [۱۹] و کبد [۳۲] گزارش نکرده‌اند. البته در تحقیق حاضر وزن کبد و شاخص آن در گروه دوز متوسط نسبت به گروه شاهد و با شدت کمتر نسبت به گروه دوز پایین بیشتر است که احتمالاً دلیل عدم معنی‌داری آن وجود تفاوت‌های فردی درون گروهی است که خطای داخل تیمار و خطای استاندارد را زیاد کرده است و تفاوت‌ها در سطح بالاتری از ۱۰ درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). افزایش نسبی وزن کبد در حیوانات دیابتی ممکن است ناشی از هایپرتروفی هپاتوسایت‌ها باشد چراکه افزایش سطح چربی‌ها و پروتئین‌های خون در این حیوانات قاعدتاً این سلول‌ها را ناچار به پرکاری می‌کند. شایان ذکر است که قلب دو تا از گوسفندان کشتار شده در گروه دوز بالا (آنالیز آماری نجام نگرفت) به وضوح دچار دیستروفی عضلانی بوده و وزن قلب آنها نیز کاهش چشمگیر داشت.

نشخوارکنندگان در مقاسیه با تک‌معده‌ای‌ها نسبت انسولین کمتر حساسند [۳۱]. از سوی دیگر، ترشح انسولین در این حیوانات توسط اسیدهای چرب فرار تولیدی شکمبه خصوصاً n-بوتیرات و پروپیونات تحریک می‌شود به طوری که تزریق درون‌رگی این ترکیبات محرک قوی برای ترشح انسولین در گوسفند و بز بیان شده است [۲۰]. در نشخوارکنندگان، بخش زیادی از نیازهای انرژی توسط اسیدهای چرب فرار حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌ها در شکمبه است [۱۲] بنابراین مقدار کمی گلوکز از روده کوچک این حیوانات جذب می‌شود و در نتیجه مصرف گلوکز در کل بدن به طور نسبی به تولید گلوکز از طریق گلوکونئوژنز در کبد و سایر بافت‌ها وابسته است [۲۹]. علیرغم تفاوت‌های عمیق بین متابولیزم انرژی، الگوهای تغذیه‌ای (مانند مدت زمان خوردن و تعداد وعده‌های غذا) و همچنین ترکیب غذا (عمدتاً مربوط به تراکم انرژی و محتوای فیبر جیره) در نشخوارکنندگان با جوندگان، به نظر می‌رسد که تشابهات زیادی در متابولیزم انرژی در حالت دیابتی بین آنها وجود دارد.

در تحقیق حاضر، تزریق STZ باعث ایجاد هایپواینسولینمیا با گستره زیادی از حالات غیرطبیعی شد؛ در گروهی که دوز بالا را دریافت کردند، شدت دیابت به حدی بود این حیوانات برای بقا با چالش روبرو بودند که این حالت در مطالعه‌ای در گاو نیز مشاهده شده است [۱۶] که مجموعاً بیانگر نقش حیاتی انسولین در تعادل و متابولیزم انرژی در نشخوارکنندگان است. پرخوری دیابتی و در عین حال ناتوانی در افزایش وزن طبیعی در این تحقیق موکد اثرات متضاد مغزی و محیطی انسولین در این حیوانات است. همچنین مشخص شد که گوسفندان دیابتی می‌توانند مدل آزمایشی مناسبی برای مطالعه نقش انسولین در متابولیزم انرژی باشند.

پیش از این تحقیق، مطالعه‌ای که در آن هایپواینسولینمیا در گوسفند با شدت‌های گسترده و با دوزهای متنوع STZ ایجاد شود، صورت نگرفته است. مطالعات بیشتری برای تعیین نقش انسولین در متابولیزم انرژی و شاخص‌های رشد در نشخوارکنندگان نیاز است. به نظر می‌رسد که نقش انسولین در این زمینه بارزتر از آنچه که برای آن مفروض است، باشد و سطح پایین گلوکز خون این حیوانات نمی‌تواند نقش انسولین را در آنها کمرنگ کند.

References

[1] Air EL, Benoit SC, Blake Smith KA, Clegg DJ, Woods SC, Acute third ventricular administration of insulin decreases food intake in two paradigms. ***Pharmacol Biochem and Behav*** 72 (2002) 423-429.

[2] Akirav EM, Chan O, Inouye K, Riddell MC, Matthews SG, Vranic M, Partial leptin restoration increases hypothalamic-pituitary-adrenal activity while diminishing weight loss and hyperphagia in streptozotocin diabetic rats. ***Metabolism*** 53 (2004)1558-1564.

[3] Barber M, Kasturi BS, Austin ME, Patel KP, MohanKumar SMJ, MohanKumar PS, Diabetes-induced neuroendocrine changes in rats: Role of brain monoamines, insulin and leptin. ***Brain Res*** 964 (2003)128-135.

[4] Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW, 1997. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. ***Endocrinology*** 138 (1997) 4463-4472.

[5] Baskin DG, Woods SC, Figlewicz D, Porte Jr, Inhibition of hypothalamic NPY gene expression by insulin. ***Endocrinology*** 130 (1992) 3608-3616.

[6] Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DG, Seeley RJ, Woods SC, The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. ***J Neurosci*** 22 (2002) 9048-9052.

[7] Bergman E.N, Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. ***Physio. Rev*** 70 (1990) 567-575.

[8] Boden G, Chen X, Kplaczynski JW, Polansky M, Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. ***J Clin Invest*** 100 (1997) 1107-1113.

[9] Breen LT, Conwell IM, Wardlaw SL, 2005. Effects of fasting, leptin and insulin on AGRP and POMC peptide release in the hypothalamus. ***Brain Res*** 1032 (2005) 1414-1418.

[10] Broberger C, Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. ***J Intern Med*** 258 (2005) 301-307.

[11] Foster LA, Ames NK, Emery RS, Food intake and serum insulin responses to intraventricular infusions of insulin and IGF-I. ***Physiol and Behav*** 50 (1991) 745-749.

[12] Gabel G, Sehested J, SCFA transport in the forestomach of ruminants. ***Comp Biochem Physiol*** 118 (1997) 367-374.

[13] Gerozissis K, Brain insulin and feeding: a bi-directional communication. ***Eur J Pharmacol*** 490 (2004) 59-70.

[14] Henry BA, Goding JW, Alexander WS, Tilbrook AJ, Canny BJ, Dunshea F, Rao A, Mansell A, Clarke IJ, Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from pituitary gland: evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. ***Endocrinology*** 140 (1999) 1175-1182.

[15] Hidaka S, Yoshimatsu H, Kondou S, Oka K, Tsuruta Y, Sakino H, Itateyama E, Noguchi H, Himeno K, Okamoto K, Teshima Y, Okeda T, Sakata T. Hypoleptinemia, but not hypoinsulinemia, induced hyperphagia is streptozotocin-induced diabetic rat. ***J Neurochem*** 77(2001) 993-1000.

[16] Higdon III HL, Parnel PG, Spitzer JC, Streptozotocin-induced pancreatic islet destruction in beef cows. ***Vet Pathol*** 38 (2001) 715-720.

[17] Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE, 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. ***J Clin Invest*** 48 (1969) 2129-2139.

[18] Mamo JC, Snowell AM, Topping DL, Plasma triacylglycerol secretion in sheep. Paradoxical effects of fasting and alloxan diabetes. ***Biochem Biophys Acta*** 753 (1983) 272-275.

[19] Masaoka T, Suzuki H, Hosoda H, Ota T, Minegishi Y, Nagata H, Kangawa K, Ishiji H, Enhanced plasma ghrelin levels in rats with streptozotocin-induced diabetes. ***FEBS Letters*** 541 (2003) 64-68.

[20] Matsunaga N, Arakawa NT, Goda T, Nam KT, Ohneda A, Sasaki Y, Katoh K, 1999. Effects of ruminal infusion of volatile fatty acids on plasma concentration of growth hormone and insulin in sheep. ***Domest Anim Endocrinol*** 17 (1999) 17-27. Morris MJ, Pavia JM, Increased endogenous noradrenaline and neuropeptide Y release from the hypothalamus of streptozotocin diabetic rats. ***Brain Res*** 1006 (2004) 100-106.

[21] Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW, Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. ***Trend in Endocrinol and Metab*** 15 (2004) 362-369.

[22] NRC, ***Nutrient requirement of sheep***. 6th Rev. Ed. National Academy of Science, Washington, DC, 1985.

[23] Patel BK, Koenig JI, Kaplan LM, Hooi SC, Increase in plasma leptin and Lep mRNA concentrations by food intake is dependent on insulin. ***Metabolism*** 47 (1998) 603-607.

[24] Prior RL, Smith ST, Role of insulin in regulating amino acid metabolism in normal and alloxan-diabetic cattle. ***J Nutr*** 113 (1983)1016-1031.

[25] Prior RL, Smith ST, Role of insulin in regulating amino acid metabolism in normal and alloxan-diabetic cattle. ***J Nutr*** 113 (1983)1016-1031.

[26] Ramanathan T, Morita S, Huang Y, Shirota K, Nishimura T, Zheng X, Hunyor SN, Glucose-insulin-potassium solution improves left ventricular energetics in chronic ovine diabetes. ***Ann Thorac Surg*** 77 (2004)1408-1414.

[27] Saltiel AR, Kahn CR, Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. ***Nature*** 414 (2001) 799-806.

[28] Sambandam N, Abrahani MA, Craig S, Al-Atar O, Jeon E, Rodrigues B, Metabolism of VLDL is increased in streptozotocin-induced diabetic rat hearts. ***Am J Physiol Heart*** 278 (2000) 1874-1882.

[29] Sano H, Takahashi K, Ambo K, Tsuda T, Rates of blood glucose appearance and disappearance during hyperglycemia induced by alloxan in sheep. ***Tohoko J of Agri Res*** 36 (1985) 9-15.

[30] SAS, SAS/STAT ® software; ***Changes and Enhancements through Release 6.11***. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 1996.

[31] Sasaki Y, Takahashi H, Insulin response to secretagogues in sheep exposed to cold. ***J Physiol (London)*** 334 (1983)155-167.

[32] Satav GJ, Katyare S, Effect of streptozotocin-induced diabetes on oxidative energy metabolism in rat liver mitochondria- A comparative study of early and late effects. ***Indian J Clinic Biochem*** 19 (2004) 23-31.

[33] Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Schurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz D, Porte Jr, Inhibition of hypothalamic NPY gene expression by insulin. ***Endocrinology*** 130 (1992) 3608-3616.

[34] Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG, Central nervous system control of food intake. ***Nature*** 404 (2000) 661-671.

[35] Sipols AJ, Baskin DG, Schwartz MW, Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. ***Diabetes*** 44 (1995) 147-151.

[36] Smith JC, Gannon KS, Ingestion patterns of food, water, saccharin and sucrose in streptozotocin-induced diabetic rats. ***Physiol and Behav*** 49 (1991) 189-199.

[37] Sorensen A, Adam AL, Findlay PA, Marie M, Thomas L, Travers MT, Vernon RG, Leptin secretion and hypothalamic neuropeptide and receptor gene expression in sheep. ***Am. J Physiol Reg Integ and Comp Physiol*** 282 (2002) R1227-R1235.

[38] Thomas L, ***Clinical laboratory diagnostics***. 1st Ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft. 1998.

[39] Woods SC, Porte DJ, Relationship between plasma and cerebrospinal fluid levels of dogs. ***Am J Physiol*** 233 (1977) 331-334.

[40] Woods SC, Seeley RJ, Porte DJ, Schwartz MW, Signals that regulate food intake and energy homeostasis. ***Science*** 280 (1998) 1378-1383.

[41] Woods SC, Signals that influence food intake and body weight. ***Physiol and Behav*** 86 (2005) 709-716.