Recherche Agronomique
Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie

تأثير المعاملة بهرمون البروجسترون على نشاط أنزيم *Tyrosine Hydroxylase* في منطقة تحت الميهاد عند الدجاج البياض

الصديق خنوف

* قسم البيولوجيا، جامعة فرحات عباس - سطيف - الجزائر

ملخص : من المؤكد حاليا أن المعاملة بهرمون البروجسترون ترفع من نسبة هرمون الإباضة (LH) في بلازما الدجاج البياض، وذلك من خلال التأثير على النواقل العصبية الكيميائية الكاتيكو لامينات. في هذه الدراسة أختبر تأثير البروجسترون على التراكيز البلازمية لهرمون (LH) وكذلك على نشاط إنزيم *Tyrosine Hydroxylase* في منطقة تحت الميهاد عند الدجاج الواضع للبيض. أدت المعاملة بالبروجسترون إلى رفع مستويات هرمون (LH) في البلازما وذلك 65 و 90 دقيقة بعد المعاملة. إن نشاط إنزيم *Tyrosine Hydroxylase* في منطقة تحت الميهاد الخلفية كان أعظم من نشاط هذا الإنزيم في المنطقة الأمامية لتحت الميهاد ، بينما لم تؤد المعاملة بالبروجسترون إلى أي تغير في نشاط الإنزيم بتحت الميهاد الخلفية، كما أدت المعاملة بهذا الهرمون إلى انخفاض معنوي (40٪) في نشاط إنزيم *Tyrosine Hydroxylase* بمنطقة تحت الميهاد الأمامية وذلك 90 دقيقة بعد المعاملة.

الكلمات الدالة : البروجسترون ، تاروزين هيدروكسيلاز ، تحت الميهاد ، الدجاج ، الكاتيكو لامينات.

Abstract *: It is well established that progesterone treatment increases plasma LH in laying hens. Throught the involvement of catecholamine neurotransmitters. In this study, the effect of exogenous progesterone on p1asma Luteinizing hormone and tyrosine hydroxylase (TH) activity in the hypothalamus of laying hens was investigated. Exogenous progesterone significantly increased plasma LH concentration at 65 and 90 minutes after administration. The mean Tyrosine hydroxylase activity in the posterior hypothalamus was significantly greater than that measured in the anterior hypothalamus. Progesterone treatment did not alter TH activity in the posterior hypothalamus.*

However, a significant (40%) reduction in the TH activity in the anterior hypothalamus was observed 90 minutes after progesterone administration.

Key words *: Progesterone, Tyrosine hydroxylase, Hypotholamus, Laying hen (Gallus domesticus), Catecholamines.*

مقدمة :

إن عملية الإباضة عند الدجاج تسبق دائما بارتفاع حاد في تركيز الهرمون المنبه للجسم الأصفر Luteinizing Hormone (LH) ، ويكون هذا الارتفاع في مستوى الهرمون 4 إلى 6 ساعات قبل حدوث الإباضة (PETERSON و COMMON ، SENIOR, 1971 وCUNNINGHAM و JOHNSON,1980و TIENHOVEN)، يكون هذا الارتفاع في تركيز هرمون (LH) متزامنا مع ارتفاع ملحوظ في تراكيز هرمون البروجسترون في البلازما و(ETCHES, 1976و CUNNINGHAM) ، إلا أنه لم يحدد ما إذا كان تركيز هرمون (LH) أو هرمون البروجسترون يرتفع أولا قبل حدوث الإباضة FOLLETT 1976و DAVIES ، كما أن حقن البروجسترون يعمل على رفع نشاط العصبونات المحتوية على هرمون GnRH (الهرمون المحرر للهرمونات المغذية للمناسل) والموجودة في تحت الميهاد (Tanka et al, 1974)، وقد أثبت دور هرمون البروجسترون في تحفيز إفراز هرمون (LH) قبل الإباضة، وبالتالي تحفيز العملية نفسها، حيث أن حقن المصل المضاد للبرجسترون 6 إلى 12 ساعة قبل الإباضة يؤدي إلى منع حدوثها (1975، FURR و SMITH) إن هذا التحفيز الذي يقوم به هرمون البروجسترون على إفراز هرمون (LH) يكون على بتحت الميهاد، إذا حقن البروجسترون في المنطقة قبل بصرية بتحت الميهاد Preoptic region ينتج عنه إباضة مبكرة غير مكتملة، بينما يكون حقن الهرمون بمنطقة الغدة النخامية بدون فعالية(FRAPS و RALPH, 1959)، كما أن حقن الهرمون في البطين الثالث للمخ أدى إلى حدوث إباضة قبل الأوان (JOHNSON,1980 و TIENHOVEN)

وإضافة إلى ماسبق فإن مستقبلات هرمون البروجسترون بمنطقتي تحت الميهاد والغدة النخامية يكون عددها أكبر بكثير عند الدجاج البياض عما هي عليه عند الدجاج غير البياض، ويزداد عددها في هذين المنطقتين عند الدجاج الواضع للبيض 8 ساعات قبل حدوث الإباضة المرتقبة (Kawashima et al, 1979) .

ومما يدعم تأثير إفراز هرمون البروجسترون تواجد مستقبلات البروجسترون على بعض عصبونات منطقة تحت الميهاد بجوار الخلايا المحتوية على هرمون GnRH ، وباعتبار أن للنواقل لعصبية الكيميائية الكاتيكو لامينات دورا كبيرا في تنظيم إفراز هرمون (LH) عند الدجاج،(Knight et al, 1982)، (SPIES , 1997 و PAU) ، لذا يمكن أن يكون لهذه النواقل العصبية دورا في توسط تأثير البروجسترون على إفراز هرمون(LH)، اقتراح هذا الدور من طرف (Knight et al, 1982) عندما تبين أن حقن الهرمون للدجاج ينتج عنه ارتفاعا في تراكيز كلا من الدوبامين والنورأدرينالين في منطقة تحت الميهاد الأمامية وزيادة في مستوى الأدرينالين في منطقة تحت الميهاد الخلفية.

إن الهدف من هذه الدراسة هو الكشف عن تأثير هرمون البروجسترون على نشاط إنزيم *Tyrosine Hydroxylase* (لعامل المحدد لتخليق الكاتيكو لامينات) في منطقة تحت الميهاد عند الدجاج البياض.

المواد وطرق العمل :

- الحيوانات : استعمل في هذه الدراسة دجاج بياض من سلالة ROSS في سنته الأولى من الوضع يزن حوالي 2 كغ، ربيت هذه الطيور في أقفاص منفردة تحت نظام ضوئي 16 ساعة ضوء و 8 ساعات ظلام(16L:8D)، وكان حضور الطعام والماء دائم.

المواد الكيميائية : جلب هرمون البروجسترون (Δ-4- Pregne-3.20 dione) من شركة Sigma تمت إذابته في زيت الذرة بتركيز (1 مليغرام في 0.5 ميليلتر). أما المواد الكيميائية اللازمة لاختبار نشاطية أنزيم Tyrosine Hydroxylase : Aluminium oxide من Aldrich. و (6R) -5 ,6 ,7 , 8-Tetrahydro-L -Bioprotein (BH4) العامل المساعد لإنزيم TH فجلب من شركة (USA Research Biochemical Inc) و Tyl-Sodium-Sulfate من شركة Kodak (USA Rochester) ، أما مركب (Benzylhydrazine NSD_{1015} dihydrochloride m-hydro) و(L-DOPA) و(L- Alpha-methyl-DOPA) و(Catalase) (11 ألف وحدة دولية في كل مليغرام) فقد جلبت من شركة Sigma.

طريقة العمل :

تم اختيار 16 دجاجة من مجموعة كبيرة، حيث وضع هذا الفوج البيض بين الساعة التاسعة وثلاثون دقيقة والعاشرة وثلاثون دقيقة صباحا. وعلى الساعة الحادية عشرة، عوملت هذه الطيور، إما بحقن 0,25 مل زيت الذرة (8) أو 0.5 ملغ/كلغ بروجسترون (8)، وذلك عن طريق العضل، وقبل عملية الحقن، تم الحصول على عينة من الدم (2 مل) من الوريد الجناحي ووضعها في أنبوب مهبرن، أما العينة الثانية (2 مل)، فقد أخذت من الطيور مباشرة قبل قتلها. وتم الحصول على منطقة تحت الميهاد المخية وتجميدها مباشرة على الجليد الجاف Dry ice ثم نقلها وخزنها في درجة حرارة 80م تحت الصفر.

- قتل 4 طيور معاملة بالبروجسترون و4 أخرى شواهد بعد 65 دقيقة من الحقن وبقية الطيور قتلت بعد 90 دقيقة.

- حدد نشاط إنزيم TH باستعمال جهاز الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي High Performance Liquid Chromatography (HPLC)، وذلك تبعا للطريقة المذكورة من طرف Mogi et al, 1986 .

توضع عينات الدم المتحصل عليها على الجليد حتى يتم نقلها إلى المخبر وتوضع في جهاز النبذ المركزي 2000g لمدة 10 دقائق وتخزن البلازما في درجة -20°م حتى يتم اختبارها وتحديد تركيز هرمون (LH) حسب الطريقة المذكورة من طرف Follett وScanes (Cunningham ,1972)، وذلك باستعمال الطريقة الإشعاعية المناعية (Radioimmuno-Assay) وعولجت النتائج إحصائيا بالتحليل بالتغاير، وقورنت نتائج المعاملات مع الشواهد باستعمال T-test.

النتائج :

بلغت تراكيز هرمون(LH) بعد 30 إلى 90 دقيقة من وضع البيض 1.51 ± 0.17 نانوغرام/مل (المتوسط+ SEM) (جدول رقم I).

لم يحدث أي تغيير في هذه التراكيز بعد 65 و 90 دقيقة في الحيوانات الشواهد (المحقونة بزيت الذرة)، لكن أدى حقن البروجسترون إلى رفع مستوى هرمون LH ($P < 0,05$) إلى 6,19 ± 1,88 نانو غرام/مل بعد 65 من الحقن و 4,18 ± 1,06 نانو غرام/مل 90 دقيقة بعد المعاملة (جدول I).

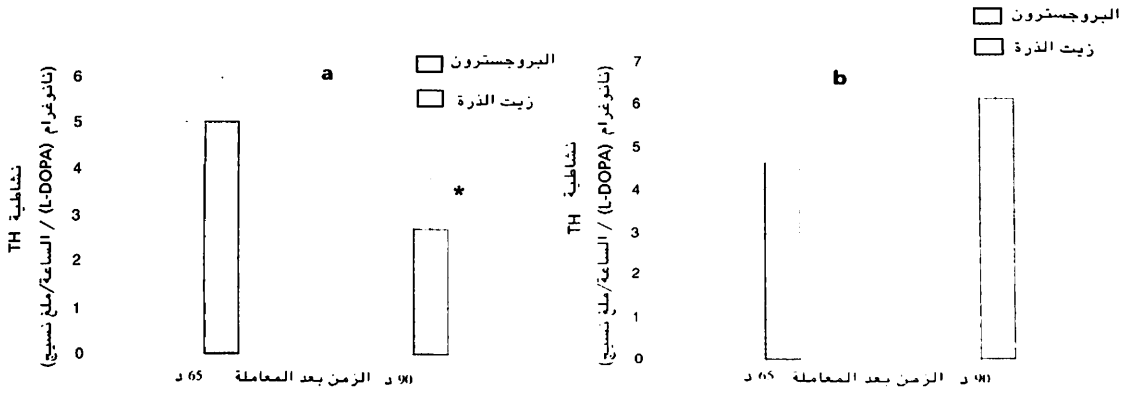
حدد نشاط إنزيم (TH) في منطقة الميهاد الأمامية وتحت الميهاد الخلفية، ففي الحيوانات المحقونة بزيت الذرة كان معدل نشاط هذا الإنزيم في تحت الميهاد الخلفية (6,25 ± 0,61 نانو غرام (L-DOPA) / ساعة/ملغ نسيج رطب)، وهذه القيمة كانت أعظم ($P < 0,02$) من قيمة نشاط هذا الإنزيم في منطقة تحت الميهاد الداخلية والتي بلغت (4,21 ± 0,51 نانو غرام (L-DOPA) / ساعة /ملغ نسيج رطب).

لم يتغير نشاط إنزيم (TH) في منطقة تحت الميهاد الخلفية سواء عند الطيور المعاملة بالبروجسترون أو الشواهد بعد 65 أو 90 دقيقة من المعاملة (Anova $F_{3,12} = 0,58$)، بينما وفي مستخلصات منطقة تحت الميهاد الأمامية فقد لوحظ انخفاض في مستوى نشاط الإنزيم يقدر بحوالي (P<0,05<40%)، وذلك عند الطيور المعاملة بالبروجسترون 90 دقيقة بعد المعاملة، بينما لم يحدث أي تغيير في نشاط هذا الانزيم 65 دقيقة بعد المعاملة (شكل1).

جدول I : تركيز هرمون (LH) في بلازما الدجاج البياض 65 و 90 دقيقة بعد حقن زيت الذرة أو البروجسترون (0,5ملغ/كغ وزن).

*P<0,05 , **P<0,01 فرق معنوي مقارنة بقيمة الشاهد

الوقت بعد المعاملة	0 دقيقة	65 دقيقة	90 دقيقة
المعاملة بزيت الذرة	0.17 ± 1.51	0.58 ± 2.00	0.15 ± 2.54
المعاملة بالبروجسترون		1.88 ± 6.19**	*1.06 ± 4.18



شكل 1 : نشاطية نشاط إنزيم (TH) (نانو غرام (L-DOPA) / ساعة / ملغ من وزن النسيج الرطب) 65 و 90 دقيقة بعد حقن زيت الذرة أو البروجسترون عند الدجاج البياض ($P < 0,02$).

a تحت الميهاد الأمامية

b تحت الميهاد الخلفية

المناقشة :

من المؤكد أن المعاملة بالبروجسترون عند الدجاج تعمل على رفع تراكيز هرمون (LH) في البلازما خلال أي مرحلة من مراحل دورة الإباضة ماعدا الوقت الذي تتناقص فيه تراكيز البروجسترون والتي ترتفع عادة قبل حدوث الإباضة (CHARP et WILSON, 1975).

في هذه الدراسة فإن المعاملة بهرمون البروجسترون أجريت بعد ساعة على الأقل من زمن وضع البيض وذلك لتجنب المرحلة السالفة الذكر. والتي يكون فيها الحيوان غير حساس للارتفاع في تراكيز هرمون البروجسترون، حيث لوحظ ارتفاع في تركيز هرمون (LH) 65 و 90 دقيقة بعد المعاملة بالبروجسترون (جدول I).

إن نشاط إنزيم TH مرتفعا في منطقة تحت الميهاد الخلفية عند الطيور غير المعاملة وهي أكبر بنسبة 50٪ من نشاط هذا الإنزيم تحت الميهاد الداخلية، كما أن المعاملة بزيت الذرة لم تؤثر على نشاط هذا الإنزيم في المنطقتين (تحت الميهاد الأمامية و الخلفية)، بينما عملت المعاملة بهرمون البروجسترون تكون على مستوى منطقة تحت الميهاد، حيث بينت الدراسات أن الخلايا المحتوية على مستقبلات هرمون البروجسترون تكون موجودة على مستوى منطقة تحت الميهاد الداخلية عند الدجاج (Kawashima et al, 1979)، كما تؤثر الهرمونات الستيرويدية على توزع وكثافة العصبونات المحتوية على الإنزيم (Kritzer et al, 1999). فإذا كان البروجسترون يؤثر على إفراز هرمون (LH) على هذا المستوى كما اقترح. فإنه من الممكن أن تعمل هذه المستقبلات البروجسترونية على تحفيز تخليق هرمون LHRH(GnRH) في منطقة النتوء المتوسط (Baulieu et al, 1990) (Wilson et al, 1990)، أو من خلال التأثير على مستوى الكاتيكو لامينات بهذه المنطقة (Alonso-Solis et al, 1996)، وحيث أن حقن البروجسترون عند الدجاج ينتج عنه ارتفاعا في تراكيز كلا من النور أدرينالين والدوبامين (Knight et al, 1982)، فإن انخفاض نشاط إنزيم(TH) والملاحظ في هذه الدراسة 90 دقيقة بعد المعاملة وليس عند 65 دقيقة قد يفسر بآلية التثبيط التي يحدثها الناتج النهائي للتفاعل، حيث أن ارتفاع كلا من الدوبامين والنورأدرينالين أدى إلى تثبط نشاط هذا الإنزيم والذي يعد العامل المحدد لتخليق هذه المركبات.

المراجع :

• **ALONSO-SOLIS R , ABREU P, LOPEZ-COVIELLA I, HERNANDEZ G , FAJARDO N , HERNANDEZ-DIAZ F , DIAZ-CRUZ A, HERNANDEZ A (1996).** Gonadal steroid modulation of neuroendocrine transduction : a transynaptic view. Cell. Mol. Neurobiol. 16 (3) : 357-382

• **BAULIEU, E.E , BINART, N. , CADEPOND, F. , CATELLI, M.G. , GARNIER, J. , GASC, J.M. and SABAH. M. (1990).** Are recptor-associated, Nuclear proteins associated with the earliest effects of steroid hormone? Symposia of Society for Experimental Biology N°VLIV, 1 , 3-20 .

• **ETHES R.J. , and CUNNINGHAM F.J. , (1976).** The Interrelation-ship between progesterone and Luteinizing hormone during the ovulation cycle of the hen (*Gallus domesticus*). J. Endocr. 71, 51-85

• **FOLLETT B.K. , SCANES C.G. and CUNNINGHAM, F.J. (1972).** A radio immuno-assay for avian luteinizing hormone. J. Endocr. 52 , 259-378.

• **FOLLETT B.K. and DAVIES D.T. ; (1979).** The endocrine control of ovulation in birds. In: "Beltsville Symposia in agriculture research". III. Animal reproduction. pp : 323-344. wiley, New York.

• **FURR , B.J.A. and SMITH , G.K. ; (1975).** Effects of antisera against gonadal steroids on ovulation in the hen. Gallus domesticus.J. Endocr. 66 303-304.

• **JOHNSON , A.L. and VAN TIENHOVEN , A. (1979).** Plasma concentrations of LH in response to central and peripheral injections of progesterone. Poult. Sci. 58,1071.

• **JOHNSON , A.L. and VAN TIENHOVEN , A. (1980).** Hypothalamo-hrypophysial sensitivity to hormones in the hen.I.Plasma concentration of LH, Progesterone and testosterone in response to central injection of progesterone and R5020. Biol. Reprod. 23, 910-917

• **KAWASHIMA M. , KAWIYOSHI M. and TANAKA,K. (1979).** Cytoplasmic progesterone receptor concentrations in the hen hypothalamus and pituitary : Difference between Laying and nonlaying hens and changes during the ovulatory cycle. Biol. Reprod.20, SS1-555.

• **KNIGHT P.G., FRANCIS P.T., HOLMAN R.B. and GLADWELL R.T, (1982).** Changes in hypothalamic monoamine concentrations accompany to progesterone induced release of Luteinizing hormone in the domestic hen. Neuroendocrinology 35, 359-362

• **KRITZER MF, KOHAMA SG (1999).** Ovarian hormones influence the morphology, distribution, and density of tyrosine hydroxylase immunoreactive axons in the dorsolateral prefrontal cortex of adult rhesus monkeys. J. Comp. Neurol. 409 (3) : 438-451

• **MOGI M., KOJIMA HARADA and NAGATSU T. (1986)** Purification and Immunochemical proprieties of tyrosine hydroxylase in humain Brain. Neurochem. Int. 8, 423-42S9

• **PAU K.Y. and SPIES H.G. (1997).** Neuroendocrine signals in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. Chin. J. Physiol. 40 (4) : 181-196

• **Peterson A.J. and Common R.H. (1971).** Progesterone concentrations in peripheral plasma of laying hens as determined by competitive protein-binding Assay. Cand.J. Zool. 49, 599-604.

• **RALPH, C.L and FRAPS, R.M. (1959).** Long-term effects of diencephalic lesions on the ovary of the hen. Amer. J. Physiol. 197, 1279-1253

• **SENIOR B.E. and CUNNINGHAM F.J. (1974).** Oestradiol and Luteinizing hormone during the ovulatory cycle of the hen. J, Endocr. 60, 201-202.

• **TANAKA K., SAKAIDA M. and KAMIYOSHI M. (1974).** Release of gonadotrophins from chicken pituitary by synthetic LHRH/FSHRH. Poult. Sci. 53, 74-77

• **WILSON S.C. and SHARP P.J. (1975).** Episodic release of Luteinizing hormone in the domestic fowl. J. Endocr. 64. 77-86

• **WILSON C.S., CHAIRIL RA, CUNNINGHAM F.J. and GLADWELL R.T. (1990).** Changes in the hypothalamic contents of LHRH-I and LHRH-II and in pituitary responsiveness to synthetic chiken LHRH-I and II during the progesterone-induced surge of LH in the laying hen. J. Endocrinol. 127(3) : 487-496