مقاله پژوهشی

مطالعه‌ی فوق ریزبینی سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی موش صحرایی متعاقب ایجاد دیابت تجربی و درمان با متفورمین

دکتر پویا پورنقی [۱]، دکتر شاپور حسن زاده [۲]*، دکتر رجبعلی صدرخانلو [۳]، دکتر امیرعبّاس فرشید [٤]

تاریخ دریافت: 91/04/25 تاریخ پذیرش: 91/06/12

چکیده

پیش زمینه و هدف: دیابت یک بیماری متابولیکی است که بر تمام بدن از جمله دستگاه تناسلی ماده تأثیر می‌گذارد و از عوامل مؤثر در ناباروری می‌باشد. متفورمین از داروهای رایج کنترل قند خون بیماران دیابتی است. هدف این مطالعه بررسی تغییرات فوق ریزبینی فولیکول‌های تخمدانی رت‌های دیابتی و سنجش میزان اثربخشی داروی متفورمین در این زمینه بود.

مواد و روش کار: ۳۶ سر رت ماده بالغ نژاد Sprague-Dawley (۲۱۰-۱۷۰گرم) در ۳ گروه (کنترل، دیابتی و دیابتی درمان شده با متفورمین) مطالعه شدند. در گروه‌های دوم و سوم، رت‌ها با تزریق ۴۵mg/kg استرپتوزوتوسین دیابتی و در گروه سوم با ۱۰۰mg/kg/day متفورمین منوهیدروکلراید تیمار شدند. در پایان دوره آزمایش، رت‌ها تشریح و تخمدان راست آن‌ها پس از آماده‌سازی، با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مطالعه گردیدند.

یافته‌ها: تغییرات ایجادشده در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی رت‌های گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل شامل کوچک و چروکیده شدن سلول گرانولوزا، کوچک شدن، بی‌نظمی شکلی و کاهش فعالیت هسته سلول (متراکم‌تر شدن کروماتین)، کاهش تعداد و ظهور اشکال غیرطبیعی اندامک‌های سیتوپلاسم سلول، تجمع قطرات لیپیدی در سیتوپلاسم، ازهم‌گسیختگی سلول‌های تاج شعاعی و فاصله گرفتن آن‌ها از پرده شفاف است. کاهش تعداد و هموژن شدن میتوکندری‌ها، بالونی شدن کریستاهای برخی از میتوکندری‌ها، تورم شبکه‌های آندوپلاسمی صاف و دانه‌دار از بارزترین تغییرات اندامکی در گروه دیابتی بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: دیابت باعث ایجاد تغییرات فرا ساختاری آپوپتوزی در سلول‌های گرانولوزا شده و منجر به آترزی فولیکول‌های در حال رشد خواهد. درمان با متفورمین می‌تواند در ایجاد شرایط بهتر در موارد ذکرشده در بیماران دیابتی مؤثر باشد.

کلیدواژه‌ها: تخمدان، سلول‌های گرانولوزا، دیابت، متفورمین، میکروسکوپ الکترونی، موش صحرایی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره پنجم، ص ٤٨٤-٤٧٦، آذر و دی ۱۳۹۱

آدرس مکاتبه: کرمانشاه- بزرگراه امام خمینی (ره)- دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه تلفن: ۸۲۵۱۰۱۸- ۰۸۳۱ و ۰۹۱۸۳۳۹۲۸۰۵

Email: p.pournaghi@gmail.com

مقدمه

دیابت قندی (Diabetes mellitus) از پراهمیت‌ترین بیماری‌های غدد و متابولیک است. بر اساس آمار اعلام شده از سوي وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی در ۱۰ سال پیش، حدود یک میلیون و هشتصد هزار بیمار دیابتي شناخته شده در کشور وجود داشته (حدود ۳ درصد افراد جامعه) و حدود ۲/۲ میلیون نفر نیز در مراحل اولیه دیابت یا اختلال سوخت و ساز هستند، اما خود از آن بي‌خبر بودند (۱). سازمان بهداشت جهاني (WHO) تخمین زده است که تعداد مبتلایان به دیابت در جهان تا سال ۲۰۳۰ به ۳۶۶ میلیون نفر یا بیشتر افزایش مي‌یابد (۲). با توسعه شهرنشینی و گرایش افراد جامعه به استفاده از غذاهای پرکربوهیدرات، کم‌تحرکی و وجود فاکتورهای خطر نظیر استعمال دخانیات، امروزه شاهد افزایش بروز بیماری‌های متابولیکی و قلبی- عروقی نظیر چاقی و دیابت هستیم (۱).

[۱] استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نور (نویسنده مسئول)

[۲] دانشیار بخش بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[۳] استاد بخش بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[٤] دانشیار بخش آسیب شناسی دانشکده دامپزشکی و سرپرست مرکز میکروسکوپ الکترونی دانشگاه ارومیه

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]

دیابت قندی با ایجاد عوارض عروقی کوچک و بزرگ، تقریباً بر تمام ارگان‌ها و سیستم‌های بدن تأثیرگذار است (۳).

شایع‌ترین عوارض دیابت عبارتند از: رتینوپاتی، نفروپاتی، بیماری‌های نورولوژیک، بیماری‌های قلبی- عروقی، بیماری‌های پوستی و زخم در اندام‌های تحتانی (۱). دیابت قندی اثرات مضری بر عملکرد جنسی زنان گذارده و از آن به عنوان یکی از علل ناباروری زنان نام برده می‌شود (۴). دیابت موجب اختلال در عملکرد تخمدان از جمله تغییر در رفتار استروس، رشد فولیکولی، بلوغ اووسیت و کاهش یا عدم تخمک‌گذاری می‌گردد (۶-۴).

استرپتوزوتوسین (STZ)، مشتق متیل نیتروزورآ از ۲- اکسی گلوکز، یک داروی ارزشمند آزمایشگاهی است که جهت ایجاد دیابت وابسته به انسولین در تعدادی از گونه‌های حیوانی از جمله موش صحرایی استفاده می‌شود. این دارو، معروف‌ترین ماده برای ایجاد دیابت تجربی به‌حساب می‌آید (۷). متفورمین یک ترکیب بی‌گوانیدی کاهش دهنده‌ی گلوکز خون است که در درمان دیابت مصرف می‌شود. اثر این دارو توسط مجموعه‌ای از واکنش‌ها در اندام‌ها و بافت‌های مختلف حاصل می‌شود که عبارتند از: کاهش گلوکونئوژنز در هپاتوسیت‌ها و افزایش گلیکوژنز و لیپوژنز، کاهش جذب گلوکز توسط سلول‌های پوششی روده و افزایش جذب گلوکز توسط سلول‌های عضلانی و چربی. تجویز خوراکی متفورمین نسبت به تجویز داخل وریدی آن از کارایی بهتری برخوردار است (۸،۹).

بین سال‌های ۱۹۹۷ تا ۲۰۰۲، ۱۹۸۳ مقاله در زمینه دیابت و نقص عملکرد جنسی در جنس نر به چاپ رسیده است؛ درحالی‌که در این مدت، فقط ۱۳ مقاله چاپ شده به بررسی دیابت و نقص عملکرد در جنس ماده پرداخته‌اند. این مطلب نشان دهنده‌ی ضرورت تحقیقات بیشتر در این زمینه است (۳). هدف از مطالعه حاضر، بررسی فوق ریزبینی اثرات دیابت تجربی و درمان آن با متفورمین روی سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی است که نقش بسیار مهمی را در تولید هورمون‌های جنسی و در ارتباط با فولیکولوژنز بازی می‌کنند. ایجاد تغییرات در ساختار و در نهایت عملکرد آن‌ها می‌تواند نقش بارزی را در کاهش توان باروری جنس ماده، به خود اختصاص دهد. این مطالعه در کنار مطالعات دیگر می‌تواند در درک چگونگی تأثیر دیابت بر ناباروری جنس ماده و میزان توانایی داروهایی همچون متفورمین در ایجاد شرایط بهتر در بیماران، به ما کمک کند.

مواد و روش کار

در این مطالعه، از تعداد ۳۶ سر موش رت ماده بالغ نژاد Sprague-Dawley (با وزن ۲۱۰-۱۷۰گرم)، استفاده شد. حیوانات از مرکز نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه و تا رسیدن به وزن مطلوب در قفس‌هایی از جنس پروپیلن در گروه‌های چهار تا شش‌تایی پرورش داده شدند. در تمام طول این مطالعه، حیوانات مذکور در حیوان خانه‌ی مجهز به سیستم تهویه با دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵% و چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. آب و غذا بدون محدودیت، در اختیار رت‌ها قرار گرفت. رت‌ها به سه گروه ۱۲ سری تقسیم شدند. گروه C: رت‌های کنترل، گروه D: رت‌های دیابتی و گروه M: رت‌های دیابتی درمان شده با متفورمین. برای القاء دیابت، در رت‌های ناشتای گروه‌های D و M، با تزریق یک‌بار محلول استرپتوزوتوسین (Sigma, St. Louis, MO, USA) حل شده در سیترات بافر ۰/۱M با pH ۴/۵ به میزان ۴۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به شکل داخل صفاقی، دیابت ایجاد گردید و به رت‌های ناشتای گروه C، مقدار ۱ سی‌سی سیترات بافر مذکور به همان روش تزریق شد. پس از تزریقات، حیوانات به قفس‌های خود برگردانده شده و آب و غذا به صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار گرفت. ۴۸ ساعت پس از تزریق استرپتوزوتوسین، از رت‌ها خون گیری به عمل آمده و میزان قند خون آن‌ها اندازه‌گیری شد. رت‌هایی که میزان قند خون ناشتای آن‌ها بیشتر از ۲۰۰ mg/dl بود، دیابتی محسوب شده و در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند (۱۰). رت‌های گروه M از روز چهاردهم پس از ایجاد دیابت، به مدت ۵۶ روز (دو دوره‌ی چهار هفته‌ای) گلوکوفاژ (متفورمین منوهیدرات مرک فرانسه) با دز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن را روزانه به صورت خوراکی (گاواژ معدی) دریافت کردند.

پس از اتمام دوره‌ی آزمایش (۷۰ روز بعد از ایجاد دیابت)، رت‌های هر سه گروه به وسیله‌ی دی اتیل اتر آسان کشی شدند. سپس تخمدان سمت راست رت‌هایی که در فاز فولیکولار سیکل جنسی قرار داشتند، جدا و در محلول فیکساتیو گلوتارآلدهید ۳% تهیه شده با فسفات بافر ۰/۱M با pH ۷/۴ به مدت چند روز ثابت گردیدند. نمونه‌های اخذشده در داخل محلول تترااکسیداسمیوم ۱% به مدت ۴-۳ ساعت قرار گرفتند. پس از انجام مراحل آبگیری با استفاده از استون، نمونه‌ها در اسپار (TAAB, England) قالب‌گیری شدند. برش‌های نیمه‌نازک ۱-۰/۵ میکرومتری، به‌وسیله‌ی اولترامیکروتوم (Zeiss, Germany) تهیه و با تولوئیدن بلو رنگ‌آمیزی گردیدند. برش‌های فوق‌نازک ۷۰-۶۰ نانومتری به روی گریدها منتقل و پس از رنگ‌آمیزی با اورانیل‌استات و سیترات‌سرب، با میکروسکوپ الکترونی عبوری (Philips, The Netherlands) در ۸۰KV بررسی شدند.

یافته‌ها

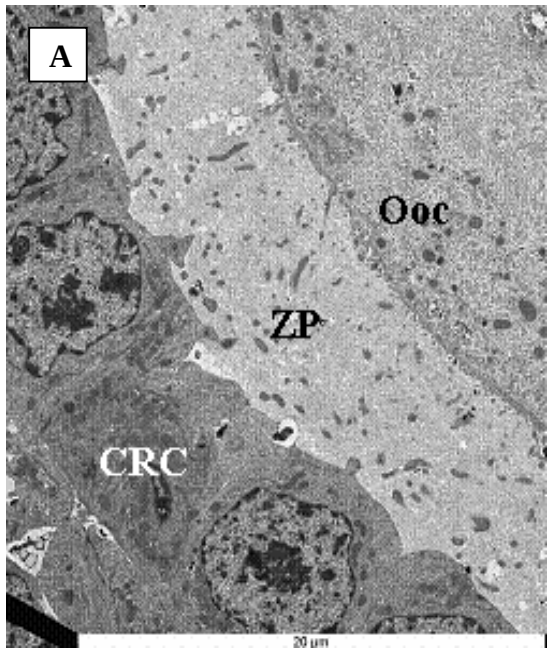
[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]

گروه کنترل: بررسی فوق‌ریزبینی سلول‌های گرانولوزای (granulosa cells) فولیکول‌های در حال رشد نشان داد که اووسیت محصورشده با پرده‌ی شفاف (zona plucida) در هر فولیکول، توسط سلول‌های تاج شعاعی (corona radiata) احاطه شده بود. سلول‌های تاج شعاعی اطراف اووسیت به طور منظم و چسبیده به پرده‌ی شفاف دیده می‌شدند و اتصالات بین‌سلولی در بین آن‌ها به وضوح قابل مشاهده بود. در درون پرده‌ی شفاف، مقاطع میکروویلی‌هایی که از سلول‌های تاج شعاعی نفوذ کرده بودند، به وضوح دیده می‌شد (تصویر A). هسته‌ی سلول‌های گرانولوزا، بزرگ، کروی یا بیضی شکل، در مرکز سلول و کروماتین شدیدا" روشن بود. در سیتوپلاسم اکثر سلول‌های گرانولوزا، میتوکندری‌ها به صورت اندامک‌های کروی یا بیضوی و با کریستاهای مشخص دیده شدند (تصویر B). در برخی از این سلول‌ها، شبکه‌ی آندوپلاسمی دانه‌دار نیز در کنار میتوکندری‌ها دیده می‌شد (تصویر B). شبکه‌ی آندوپلاسمی صاف فعال هم به راحتی قابل مشاهده بود. در سیتوپلاسم برخی از سلول‌های گرانولوزا، تعدادی قطره‌ی لیپیدی دیده شد.

گروه دیابتی: بررسی فوق‌ریزبینی سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی رت‌هایی که با تزریق STZ به دیابت مبتلا شده بودند، نشان داد که سلول‌های تاج شعاعی مجاور پرده‌ی شفاف، ضمن از دست دادن اتصالی‌های بین‌سلولی و در نتیجه ازهم‌گسیختگی، از پرده‌ی شفاف نیز فاصله گرفته بودند (تصویر C). سلول‌های گرانولوزا درجاتی از کوچک‌شدگی و چروکیده شدن را نشان می‌دادند. هسته‌ی سلول‌های گرانولوزا، با اندازه‌ها و اشکال مختلف و تیره‌تر از گروه کنترل یعنی دارای کروماتین فشرده‌تر بود. اندامک‌های سیتوپلاسم سلول‌های گرانولوزا در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به تعداد کمتر و نیز پراکنده‌تر بودند. میتوکندری‌ها به صورت اندامک‌های کوچک کروی یا بیضوی متراکم و با کریستاهای مبهم دیده شدند (تصویر D).

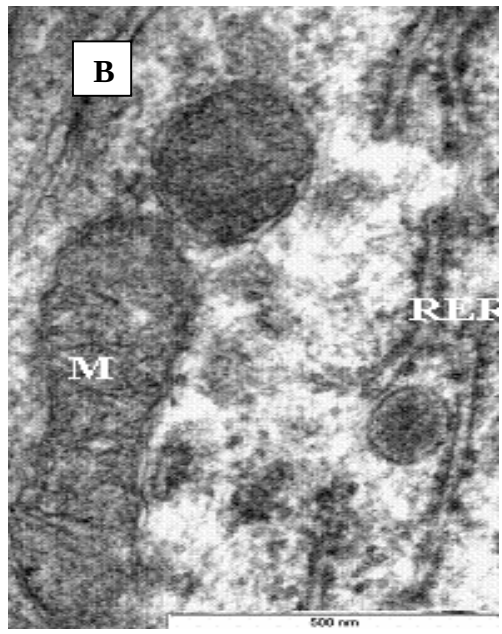
علاوه بر این، تعداد کمی از این میتوکندری‌ها حالت بالونی شدن کریستاها (ballooning of cristae) یا به عبارت دیگر تورم داخل کریستایی (intracristal swelling) را نشان می‌دادند. فضای داخلی شبکه‌ی آندوپلاسمی دانه‌دار سیتوپلاسم سلول‌های گرانولوزا در مقاطع زیادی اتساع یافته و دارای حالت وزیکوله‌شدگی بود (تصویر D). فضای داخلی شبکه‌ی آندوپلاسمی صاف سیتوپلاسم سلول‌های گرانولوزا نیز بیانگر عدم وجود وضعیت طبیعی بود به‌طوری‌که در مقاطع زیادی اتساع یافته و حجیم شده بود. در سیتوپلاسم سلول‌های گرانولوزا، قطرات لیپیدی دیده شدند که از حیث تعداد و اندازه نسبت به گروه کنترل بیشتر و بزرگ‌تر شده بودند (تصویر E).

گروه دیابتی درمان شده با متفورمین: بررسی فوق‌ریزبینی سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی رت‌هایی که از دو هفته پس از القاء دیابت، با متفورمین درمان شده بودند، نشان داد که ترتیب و نظم سلول‌های تاج شعاعی مجاور پرده‌ی شفاف بهتر و ازهم‌گسیختگی آن‌ها در مقایسه با گروه دیابتی کمتر بود. همچنین نسبت به گروه دیابتی که این سلول‌ها از پرده‌ی شفاف نیز فاصله گرفته بودند، فاصله‌ی کمتری مشاهده شد (تصویر F). هسته‌ی سلول‌های گرانولوزا، تقریبا" بزرگ، با اشکال مختلف ولی غالبا" کروی یا بیضی شکل، اغلب در مرکز سلول و با کروماتین روشن یعنی اوکروماتیک بود. اندامک‌های سیتوپلاسم سلول‌های گرانولوزا در گروه درمان شده با متفورمین نسبت به گروه دیابتی به تعداد بیشتر و با اشکال طبیعی و یا نزدیک به طبیعی ملاحظه گردیدند. میتوکندری‌ها به‌صورت اندامک‌های کروی یا بیضوی با کریستاهای محدود و مشخص و بدون حالت بالونی‌شدگی کریستاها دیده شدند. شبکه‌ی آندوپلاسمی صاف و دانه‌دار و نیز قطرات لیپیدی موجود در سیتوپلاسم سلول‌های گرانولوزا در فولیکول‌های تخمدانی این گروه، به مراتب به حالت طبیعی نزدیک‌تر بودند (تصویر G).

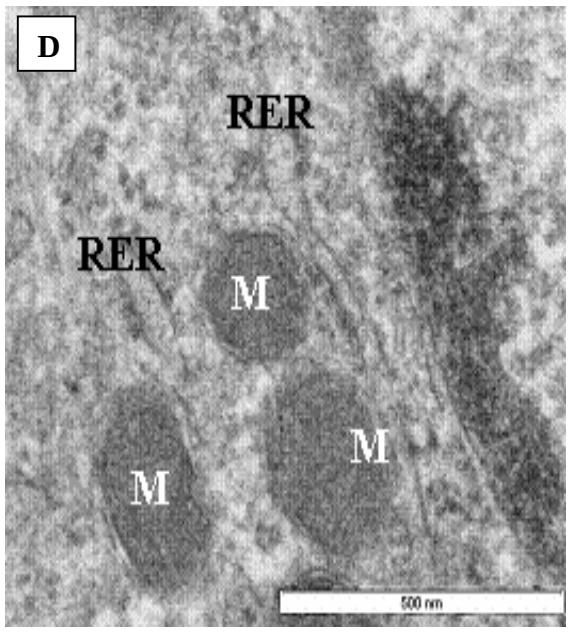


A: میکروگراف الکترونی از اووسیت (Ooc)، پرده شفاف (ZP) و سلول‌های تاج شعاعی (CRC) در یک فولیکول تخمدانی از گروه کنترل.

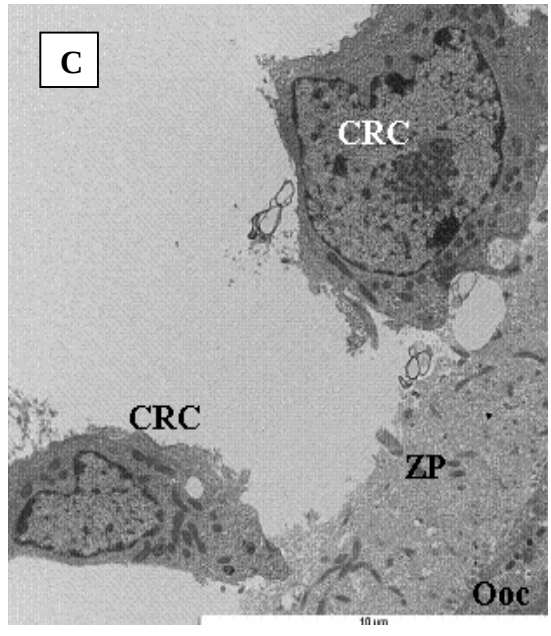
[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]



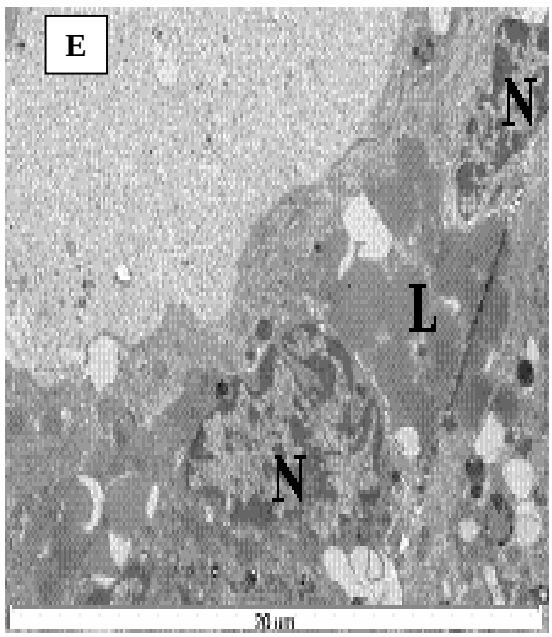
B: میکروگراف الکترونی قسمتی از سیتوپلاسم یک سلول گرانولوزای گروه کنترل. یک میتوکندری (M) و قسمت‌هایی از شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار (RER) دیده می‌شوند.



D: میکروگراف الکترونی قسمتی از سیتوپلاسم یک سلول گرانولوزا از فولیکول‌های تخمدانی گروه دیابتی. چند میتوکندری (M) و قسمت‌هایی از شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار (RER) دیده می‌شود.

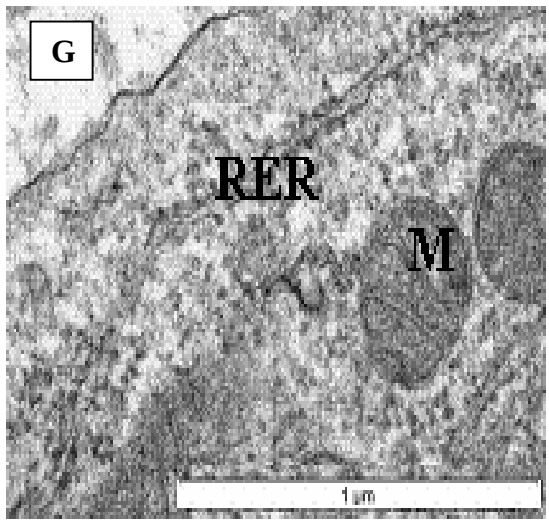


C: میکروگراف الکترونی از اووسیت (Ooc)، پرده شفاف (ZP) و سلول‌های تاج شعاعی (CRC) در گروه دیابتی. به فاصله‌ای که بین سلول‌های گرانولوزا باهم و نیز بین این سلول‌ها با پرده‌ی شفاف به‌وجود آمده، دقت نمایید.

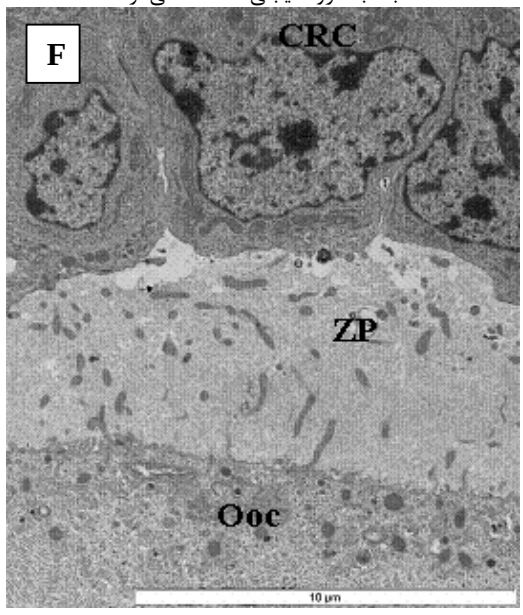


E: قطرات لیپیدی (L) بزرگ و به تعداد زیاد در سیتوپلاسم سلول گرانولوزای گروه دیابتی و N هسته سلول گرانولوزا.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]



G: میکروگراف الکترونی قسمتی از سیتوپلاسم یک سلول گرانولوزا از گروه درمان شده با متفورمین. دو میتوکندری (M) و قسمتی از شبکه آندوپلاسمی دانه‌دار (RER) با شکل و ساختمان به مراتب بهتر نسبت به گروه دیابتی ملاحظه می‌گردد.



F: میکروگراف الکترونی از اووسیت (Ooc)، پرده‌ی شفاف (ZP) و سلول‌های تاج شعاعی (CRC) در یک فولیکول تخمدانی از گروه درمان شده با متفورمین. فاصله بین سلول‌های گرانولوزا باهم و نیز بین این سلول‌ها با پرده‌ی شفاف، نسبت به گروه دیابتی کاهش یافته است.

بحث

نتایج بدست آمده از بررسی حاضر، بیانگر تغییرات دژنراتیو در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی پس از القای دیابت می‌باشد. این تغییرات در مقایسه با گروه کنترل شامل کوچک و چروکیده شدن سلول گرانولوزا، کوچک شدن، بی‌نظمی شکلی و کاهش فعالیت هسته سلول (متراکم‌تر شدن کروماتین)، کاهش تعداد و ظهور اشکال غیرطبیعی اندامک‌های سیتوپلاسم سلول، تجمع قطرات لیپیدی در سیتوپلاسم، ازهم‌گسیختگی سلول‌های تاج شعاعی و فاصله گرفتن آن‌ها از پرده‌ی شفاف است. این تغییرات می‌توانند به عنوان علائم پیش‌آپوپتوزی فرض شوند (۱۱). تغییرات ذکرشده در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی گروهی که از دو هفته پس از القای دیابت، تحت درمان با متفورمین قرار گرفته بودند، به میزان قابل توجهی کاهش یافته بود.

در حال حاضر محرز شده است که نقطه‌ی آغازین آترزی فولیکول‌های تخمدانی پستانداران، آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا می‌باشد که در نتیجه‌ی محرومیت هورمونی به وجود می‌آید (۱۱). هورمون‌های استروئیدی نقش بارزی را در تنظیم فرآیندهای رشد، نمو، هموستاز و آپوپتوز به عهده دارند (۱۱). هورمون‌های استروئیدی نقش مهمی را در تنظیم آپوپتوز در تخمدان بازی می‌کنند: استروژن‌ها از آپوپتوز سلول‌های گرانولوزای فولیکولی جلوگیری می‌کنند، درحالیکه به نظر می‌رسد آندروژن‌ها تکه‌تکه‌شدن DNAی سلول‌های تخمدانی را تسهیل می‌کنند؛ این هورمون‌ها اثرات فوق را به ترتیب با ممانعت و افزایش فعالیت اندونوکلئاز در سلول‌های گرانولوزای تخمدان بجا می‌گذارند (۱۲). در مطالعه‌ای in vitro نشان داده شد که گنادوتروپین‌های هیپوفیزی، به طور مستقیم نیز می‌توانند آپوپتوز فولیکولی را تنظیم کنند؛ FSH توانست به صورت وابسته به دز آپوپتوز فولیکولی را به میزان ۶۲-۶۰% سرکوب نماید. با توجه به نقش کلیدی گنادوتروپین های هیپوفیزی بر عملکرد سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی و تولید هورمون‌های جنسی و نیز نقش هورمون‌های جنسی – و خود گنادوتروپین ها به طور مستقیم- در تنظیم آپوپتوز تخمدانی (۱۱)، برای اینکه بتوانیم در مورد تغییرات فراساختاری سلول‌های گرانولوزا در این مطالعه، بحث جامعی ارائه دهیم، ناگزیر باید به تغییرات گنادوتروپین های هیپوفیزی و متعاقب آن تغییرات هورمون‌های جنسی در اثر ابتلا به دیابت و پس از آن درمان با متفورمین بپردازیم. دیابت موجب اختلال در عملکرد تخمدان از جمله تغییر در رفتار استروس، رشد فولیکولی، بلوغ اووسیت، کاهش جسم زرد، ایجاد فولیکول‌های آترتیک، کاهش یا عدم تخمک‌گذاری می‌گردد (۱۵-۱۳و۶-۴) و این تغییرات ناشی از ایجاد اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز- تخمدان می‌باشد که در آن میزان هورمون‌های FSH و LH کاهش یافته و به دنبال آن توانایی تخمدان برای سنتز

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]

هورمون‌های استروژن و پروژسترون کاهش می‌یابد (۴). دیابت تجربی کاهش سطح FSH و LH را در رت‌های ماده نشان می‌دهد (۱۶). در مطالعه‌ی هورمونی که توسط نویسندگان این مقاله در کنار این مطالعه انجام گرفت (۱۷)، میزان هورمون‌های FSH و LH در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری ($P<0.05$) کاهش یافته بود. این کاهش میزان هورمون‌های FSH و LH در گروه دیابتی درمان شده با متفورمین نسبت به گروه کنترل در مورد LH معنی‌دار ($P<0.05$) ولی در مورد FSH غیرمعنی‌دار بود. جالب اینکه درمان با متفورمین اگرچه میزان LH را در رت‌های گروه دیابتی درمان شده به طور معنی‌داری ($P<0.05$) نسبت به گروه دیابتی بالا برده بود، ولی کماکان اختلاف سطح آن با گروه کنترل معنی‌دار ($P<0.05$) بود. میزان استرادیول و آندروژن در جنس ماده، به دیابت قندی و تغییر مقاومت به گلوکز وابسته است (۱۸). بعضی مطالعات بر روی زنان مبتلا به دیابت تیپ۱ کاهش میزان استرادیول (۱۶) یا عدم تغییر در میزان آن (۱۹) را نشان می‌دهند. مدل دیابت تجربی به‌وسیله‌ی القاء دیابت با تزریق استرپتوزوتوسین در جوندگان، تغییر در پروفایل هورمونی به خصوص کاهش سطح استرادیول و افزایش سطح تستوسترون در حیوانات ماده را نشان داده‌اند (۲۰و۲۱). یافته‌های به‌دست آمده از مطالعه بر روی مدل‌های دیابت تجربی، معمولا" با داده‌های حاصل از مطالعات انسانی از نظر نمایان‌بودن کاهش میزان استرادیول در رت‌های Goto-Kakizaki (۲۲) و افزایش میزان تستوسترون در موش‌های db/db (۲۳) منطبق هستند. میزان تستوسترون آزاد اندوژنوس با میزان قندخون و محتوای چربی بدن، دارای ارتباط مستقیم می‌باشد. نشان داده شده که دیابت تجربی منجر به کاهش سطح پروژسترون می‌گردد (۱۶). در مطالعه‌ی هورمونی که توسط نویسندگان این مقاله در کنار این مطالعه انجام گرفت (۱۷)، میزان هورمون‌های استروژن و پروژسترون در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($P<0.05$) کاهش یافته بود. این کاهش میزان هورمون‌های استروژن و پروژسترون در گروه دیابتی درمان شده با متفورمین نیز نسبت به گروه کنترل در مورد پروژسترون معنی‌دار ($P<0.05$) ولی در مورد استرادیول غیرمعنی‌دار بود. از طرفی افزایش معنی‌داری ($P<0.05$) در میزان تستوسترون در گروه‌های دیابتی و دیابتی درمان شده با متفورمین نسبت به گروه کنترل رخ داده بود. نکته‌ی جالب این است که با وجود افزایش معنی‌دار ($P<0.05$) هورمون LH در گروه دیابتی درمان شده با متفورمین نسبت به گروه دیابتی، اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه از نظر میزان هورمون پروژسترون مشاهده نشد. Tosca و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۲۴) گزارش دادند که استفاده از متفورمین، سبب تحریک adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) شده است که جلوگیری از ترشح پروژسترون از سلول‌های گرانولوزای تخمدان رت را به دنبال دارد. با توجه به مطالب ذکرشده‌ی فوق در مورد تغییرات میزان گنادوتروپین‌های هیپوفیزی و هورمون‌های جنسی پس از القاء دیابت و درمان با متفورمین، تجمع قطرات لیپیدی قابل توضیح است. از آنجایی که سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی رت‌های دیابتی توانایی تبدیل لیپیدهای واردشده به سیتوپلاسم سلول به هورمون‌های جنسی را به میزان زیادی از دست داده‌اند، شاهد تشکیل قطرات لیپیدی به تعداد بیشتر و اندازه‌ی بزرگ‌تر در درون سیتوپلاسم این سلول‌ها هستیم. با استفاده از نتایج مطالعه‌ی حاضر و تلفیق آن با نتایج مطالعاتی که در سال‌های اخیر انجام شده‌اند، می‌توان بیان داشت که تغییرات سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های تخمدانی رت‌های دیابتی نتیجه‌ی کاهش سطح گنادوتروپین‌های هیپوفیزی و هورمون‌های استرادیول و پروژسترون، افزایش سطح تستوسترون و نیز دیگر اثرات سوء ناشی از دیابت مانند افزایش میزان رادیکال‌های آزاد (۲۷-۲۵) – که می‌توانند منجر به القاء آپوپتوز گردند- می‌باشد. ازهم‌گسیختگی سلول‌های تاج شعاعی و فاصله‌گرفتن آن‌ها از پرده‌ی شفاف، از عوامل ایجاد تغییر در ماهیت پرده‌ی شفاف است که سبب کاهش ارتباطات تغذیه‌ای اووسیت شده و از عوامل مهار مراحل بلوغ و دژنره‌شدن آن (۲۸) محسوب می‌شود.

از دیگر تغییرات فوق‌ریزبینی ایجادشده در اثر دیابت، تغییر در میتوکندری‌ها شامل کاهش تعداد آن‌ها، هموژن شدن ماتریکس و ازبین‌رفتن کریستاهای لوله‌ای و نیز بالونی‌شدن کریستاها در تعدادی از میتوکندری‌ها بود. میتوکندری هیدروپیک به دلیل ورود آب به اندامک ایجاد می‌گردد و می‌تواند توسط عوامل زیادی که سبب آسیب سلولی می‌شوند، بوجود بیاید. از آنجا که دو فضا در میتوکندی وجود دارد شامل فضای بین غشایی – که به درون کریستاها هم امتداد یافته– و فضای ماتریکسی؛ لذا بسته به اینکه ورود مواد محلول به درون کدامیک از این فضاها اتفاق بیفتد، علایم متفاوتی ظاهر می‌شود. در صورت درگیری ماتریکس یا فضای داخلی، در مراحل اولیه یا درجات خفیف، کاهش غلظت ماتریکس بوجود می‌آید که با چگالی کاهش‌یافته قابل تشخیص است. کریستاها جابجا شده و ممکن است درجات مختلفی از تغییرجهت، کوتاه‌شدگی و کاهش تعداد را نشان بدهند. ماتریکس تاحدی رنگ‌پریده است ولی خاصیت هموژن‌بودن خود را حفظ می‌کند (۲۹). در این مطالعه به نظر می‌رسد میتوکندری‌هایی که دارای ماتریکس هموژن و کاهش در تعداد و قطر کریستاها هستند، مراحل اولیه ورود آب به ماتریکس خود را نشان می‌دهند

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]

اما حالت دوم تورم میتوکندری که به دلیل ورود آب به حفره‌ی خارجی رخ می‌دهد، اغلب به بالونینگ کریستاها (تورم داخل کریستایی) ختم می‌شود. در جایی که تورم داخل کریستایی وجود دارد، افزایش اندازه میتوکندری ممکن است واضح نباشد و ماتریکس ممکن است کاملا" متراکم دیده شود. قابل ذکر است که متراکم‌شدن ماتریکس ممکن است به دلیل جابجایی آب از ماتریکس به فضای داخل کریستایی باشد. در بسیاری از مطالعات in vitro میتوکندری‌های نرمال داری شکل متعارف بوده‌اند (orthodox configuration mitochondria)؛ درحالیکه پروسه‌های آزمایشگاهی متفاوتی که سبب آسیب سلولی می‌شوند، می‌توانند میتوکندری‌ها را به اندامک‌هایی با ماتریکس فشرده‌شده و کریستاهای متورم (ballooning of cristae) تغییردهند که تحت‌عنوان میتوکندری‌های متراکم‌شده (condensed configuration mitochondria) نامیده می‌شوند. مکانیسم ایجاد این اشکال میتوکندری هنوز کاملا" مشخص نشده است (۲۹). تصور می‌شود که برخی از این تغییرات با تغییر پروتئین‌های غشای داخلی همراه هستند (۳۰). شکل متراکم معرّف یک وضعیت پایین انرژی و شکل متعارف بیانگر یک وضعیت انرژی بالا است (۳۱و۳۲). با جمع‌بندی مطالب بالا می‌توان گفت که در مطالعه‌ی حاضر، هموژن‌شدن ماتریکس و ازبین‌رفتن کریستاها و نیز بالونی‌شدن کریستاها در تعدادی از میتوکندری‌ها به علت اثرات سوء دیابت ایجاد شده‌اند و بیانگر سلول‌هایی با سطح پایین انرژی هستند. این میتوکندری‌های ناکارآمد خود می‌توانند به تغییر بیشتر در عملکرد سلول‌های گرانولوزا منجر شود. نماهای حاصل نشان‌دهنده‌ی کاهش توانایی این سلول‌ها در استفاده از اکسیژن جهت تولید انرژی و روی‌آوردن به مسیرهای بی‌هوازی تولید انرژی می‌باشد که این مسأله در روند فعالیت‌های طبیعی سلول‌های گرانولوزا اختلال جدّی ایجاد نموده و می‌تواند نقش مهمّی را در روند آپوپتوز آن ایفا نماید. اتساع‌یافتگی شبکه‌های آندوپلاسمیک صاف و دانه‌دار که در سیتوپلاسم سلول‌های گرانولوزا رت‌های گروه دیابتی مشهود است - مانند میتوکندری‌های گفته شده - ناشی از ورود آب و تورم بوجودآمده در سیسترن‌های این شبکه می‌باشد. ایجاد میتوکندری‌های هیدروپیک همراه است با تورم و وزیکوله‌شدن شبکه‌ی آندوپلاسمیک دانه‌دار (۲۹). تغییرات ساختمان میتوکندری‌ها و شبکه‌های آندوپلاسمیک صاف و دانه‌دار سیتوپلاسم سلول‌های گرانولوزای گروه درمان شده با متفورمین، شرایط به مراتب بهتری را در مقایسه با گروه دیابتی نشان می‌دهد که به نظر می‌رسد این وضعیت ناشی از کاهش میزان قندخون و درنتیجه تخفیف اثرات مخرّب دیابت در گروه درمان شده با متفورمین می‌باشد.

نتیجه گیری

می‌توان بیان داشت که القاء دیابت از راه‌های مختلف از جمله تغییر در میزان هورمون‌های محور هیپوفیز- تخمدان و اثرات سیتوتوکسیک عمومی خود، باعث ایجاد تغییرات آپوپتوتیک در ساختار و عملکرد سلول‌های گرانولوزا می‌گردد که این تغییرات که عبارتند از کوچک و چروکیده‌شدن سلول گرانولوزا، کوچک‌شدن، بی‌نظمی شکلی و کاهش فعالیت هسته سلول (متراکم‌ترشدن کروماتین)، کاهش تعداد و ظهور اشکال غیرطبیعی اندامک های سیتوپلاسم سلول، تجمع قطرات لیپیدی در سیتوپلاسم، ازهم‌گسیختگی سلول‌های تاج شعاعی و فاصله‌گرفتن آن‌ها از پرده‌ی شفاف، می‌توانند منجر به آترزی فولیکول‌ها و دژنره‌شدن اووسیت‌ها گردند. درمان با متفورمین می‌تواند در ایجاد شرایط بهتر در موارد ذکرشده در بیماران دیابتی مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر فرهاد رضایی، سرکارخانم شبنم جعفری و بخش میکروسکوپ الکترونی دانشگاه علوم پزشکی خرونینگن هلند به ویژه جناب آقای پروفسور هان که در مسیر اجرای مطالعه‌ی حاضر نهایت مساعدت و همکاری را به عمل آوردند، صمیمانه تشکّر و قدردانی می‌گردد.

References:

1. Shamekhi H, Shahverdi-Alamdari M, Javanshir M. Translation of General Urology.1st Ed. Gilan: Samat Publication; 2001. P. 747-90. (Persian)
2. Attia SM, Helal GK, Alhaider AA. Assessment of genomic instability in normal and diabetic rats treated with metformin. Chemico-Biological Interactions 2009; 180: 196-204.
3. Traish AM, Cushman T, Hoyt R, Kim NN. Diabetes attenuates female genital sexual arousal response via disruption of estrogen action. Korean J Urology 2009; 50(3): 211-23.
4. Ballester J, Munoz MC, Dominguez J, Palomo MJ, Rivera M, Rigau T. Tungstate administration

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]

improves the sexual and reproductive function in female rats with streptozotocin induced diabetes. Hum Reprod 2007; 22(8): 2128-35.

5. Colton SA, Pieper GM, Downs SM. Altered meiotic regulation in oocytes from diabetic mice. Biol Reprod 2002; 67(1): 220-31.
6. McLean Mp, Warden kJ, Sandhoff TW, Lrby RB, Hales DB. Altered ovarian sterol carrier protein expression in the pregnant streptozotocin-treated diabetic rat. Biol Reprod 1996; 55(1): 38-46.
7. Rodrigues B, McN'eil JH. Comparison of cardiac function in male and female diabetic rats. Gen Pharma 1987; 18(4): 421-3.
8. Stepensky D, Friedman M, Srour W, Raz I, Hoffman A. Preclinical evaluation of pharmacokinetic–pharmacodynamic rationale for oral CR metformin formulation. J Control Release 2001; 71:107-15.
9. Cheng J, Huang C, Liu I, Tzeng T, Chang C. Novel mechanism for plasma glucose lowering action of Metformin in streptozotocin induced diabetic rats. Diabetes 2006; 55:819-25.
10. Venkateswaran S, Pari L. Effect of Coccinia indica leaves on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol 2003; 84:163-8.
11. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. Eur J Endocrinol 1998; 138:482-91.
12. Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJW. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles. FSH as a major survival factor. Endocrinology 1996; 137:1447-56.
13. McLean MP, warden KJ, Sandhoff TW, Lrby RB, Hales DB. Altered ovarian sterol carrier protein expression in the pregnant streptozotocin-treated diabetic rat. Biol Reprod 1996; 55(1): 38-46.
14. Codner E, Soto N, Lopez P, Trejo L, Avila A, Eyzaguirre FC. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome and ovarian morphology in women with type 1 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(6): 2250-6.
15. Albrecht G, Hahn von Dorsche H. Quantitative histologic studies of the gonads of sand rats (Psammomys obesus) during the development of diabetes mellitus. Anat Anz 1991; 173(2): 101-5.
16. Salonia A, Lanzi R, Scavini M, Pontillo M, Gatti E, Petrella G, et al. Sexual function and endocrine profile in fertile women with type 1 diabetes. Diabetes Care 2006; 29: 312-16.
17. Pournaghi P, Sadrkhanlou R, Hasanzadeh Sh, Foroughi A. An investigation on body weights, blood glucose levels and pituitary-gonadal axis hormones in diabetic and metformin-treated diabetic female rats. Vet Res Forum 2012; 3(2): 79-84.
18. Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1995; 333: 550-554.
19. Sowers M, Derby C, Jannausch ML, Torrens JI, Pasternak R. Insulin resistance, hemostatic factors and hormone interactions in pre- and perimenopausal women: SWAN. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:4904-10.
20. Kim NN, Stankovic M, Cushman TT, Goldstein I, Munarriz R, Traish AM. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with changes in vaginal hemodinamics, morphology and biochemical markers. BMC Physiol 2006; 6:4.
21. Wells CC, Riazi S, Mankhey RW, Bhatti F, Ecelbrager C, Maric C. Diabetic nephropathy is associated with decreased circulating estradiol levels and imbalance in the expression of renal estrogen receptors. Gender Med 2005; 2:227-37.
22. Matsushita M, Tamura K, Osada S, Kogo H. Effect of troglitazone on the excess testosterone and LH secretion in thyroidectomized,

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]

insulinresistant, type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. Endocrine 2005; 27:301-5.

23. Chin M, Isono M, Isshiki K, Araki S, Sugimoto T, Guo B, et al. Estrogen and raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, ameliorate renal damage in db/db mice. Am J Pathol 2005; 166:1629-36.
24. Tosca L, Solnais P, Ferre P, Foufelle F, Dupont J. Metformin-induced stimulation of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) impairs progestrone secretion in rat granulosa cells. Biol Reprod 2006; 75:342-51.
25. Sinclair AJ, Lunec J. Free radicals, oxidative stress and diabetes mellitus. In: Blake D, Winyard PG eds. Immunopharmacology of Free Radical Species. London: Academic Press; 1995. P. 183-98.
26. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. Free Radical Biol Med 2011; 50(5):567-75.
27. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. Life Sci 2009; 84(21-22):705-12.
28. Solayminierad J, Rowshangar L, Karimi K. Ultrastructural study of follicologenesis affected by electromagnetic exposure. Fertil Infertil 2004;(3):300-7. (Persian)
29. Ghadially FN. Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix. 4th Ed. Boston: Butterworth-Heinemann; 1997. P. 246-9.
30. Wrigglesworth JM, Packer L. Optical rotary dispersion and circular dichroism studies on mitochondria: correlation of ultrastructure and metabolic state with molecular conformational changes. Arch Biochem. Biophys 1968; 128:790.
31. Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for methabolically linked mechanical activity in mitochondria. II Electron transport linked ultrastructural transformations in mitochondria. J Cell Biol 1968; 37:345.
32. Hackenbrock CR. Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy state. Proc Natl Acad Sci USA 1968; 61:598.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-29]