بررسی اثر انسولین و انسولین به همراه hCG بر سیکل تولید مثل وزغ نر، گونه Bufo viridis

فیروزه خیل‌تاش: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
شهربانو عریان: دانشگاه تربیت معلم

چکیده

در این پژوهش تأثیر انسولین، و انسولین و hCG بر سیکل تولید مثل، بروز رفتارهای جنسی و تغییرات بافتی در بیضه وزغ که جانداری دوزیست و دارای سیکل تولید مثل ثابت است بررسی شده است. همه آزمایش‌ها بر روی وزغ‌های نر با وزن ٣٥-٢٣گرم در ۴ گروه ١- انسولین، ٢- انسولین وhCG ٣- کنترل١، ٤- کنترل ٢، انجام گرفت. به گروه انسولین ٤بار انسولین تزریق شد در تزریق اول ٧ IU/KgB.W و در دفعات بعد ٣/٥ IU/KgBW انسولین به حیوان تزریق شد و در گروه انسولین وhCG در تزریق اول ٧ IU/KgB.W انسولین با ٥٠ IU/ml hCG و در دفعات بعد ٣/٥ IU/KgBW انسولین و ٥٠ IU/ml hCG تزریق شد. به گروه کنترل ٢ در هر تزریق ١ میلی‌لیتر رینگر دوزیست تزریق شد و به گروه کنترل ١ هیچگونه تزریقی انجام نشد. تزریقات با فاصله٣ روز در مدت ٢ هفته انجام گرفت. سپس با بهرمگیری از روش‌های‌آماری، معنی‌داری تغییرات ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که انسولین باعث افزایش معنی‌داری در سلول‌های‌اسپرماتوژنیک شده و hCG علاوه برافزایش عمل‌کرد انسولین، باعث بروز رفتارهای‌جنسی" آواز جفت‌گیری" و" دربرگیری"، و همچنین تیره شدن پوست می‌شود. انسولین یک میتوژن است و باعث تکثیر سلول‌های‌اسپرماتوژنیک می‌گردد و hCG با تأثیر بر روی ترشح تستوسترون، رفتارهای جنسی را هم پدید می‌آورد.

مقدمه

در حدود ٢٠٠٠ گونه از دوزیستان دردنیا وجود دارد که به ٣ گروه سمندرها[١]، قورباغه‌ها و وزغ‌ها[٢] و آپودا[٣] که فاقد چشم و اندام حرکتی هستند و در مناطق گرمسیر یافت می‌شوند، تقسیم می‌شوند[١]. مطالعات انجام شده بر روی چگونگی فعالیت دستگاه تولید مثل این جاندار روشن می‌سازد که این دستگاه تحت کنترل سیستم عصبی و سیستم آندوکرینی بوده که باعث بروز رفتارهای تولید مثلی در زمان و مکان مناسب می‌گردد[٢].

کلمات کلیدی: انسولین، انسولین و hCG، بیضه، اسپرماتوژنز، وزغ

١-Urodels ٢-Anura ٣-Apoda

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-04]

عوامل محیطی مثل نور، دما، رطوبت هوا، از طریق چشم‌ها و غده پینه‌آل به مراکز بالاتر مغز می‌رسد و از طریق محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - گنادی کنترل خود را بر سیکل تولید مثل اعمال می‌کند[۳]. تحقیقات در زمینه اثر روشنایی و دما بر سیکل تولید مثل قورباغه رانااسکولانتا[۱] نشان می‌دهد که افزایش نور و دما موجب افزایش وزن بیضه‌ها و قطر لوله‌های‌اسپرم‌ساز می‌گردد[۴]. رفتارهای تولید مثل شامل آواز جفت‌گیری[۲] حیوان نر، در برگیری[۳] به د نبال تمایل حیوان ماده، و بالعکس آواز جدایی[۴] حیوان ماده و دفع حیوان نر است. ساختمان ادراری - تناسلی قورباغه یا وزغ نر شامل یک زوج بیضه، مجاری آوران، مجرای ولف و کیسه اسپرمی است. بافت بیضه از لوله‌های‌سمی‌نیفر تشکیل شده که در داخل آن بلوغ هریک از سلول‌های اسپرماتوژنیک به طور مستقل صورت می‌گیرد و مراحل مختلف بلوغ را می‌توان در آن‌ها مشاهده کرد .این مراحل داخل کیست‌هایی انجام می‌شود که با کامل شدن اسپرم کیست پاره شده و اسپرم‌ها رها می‌شوند، و سر آن‌ها در سلول‌های سرتولی فرو می‌روند. سلول‌های سرتولی با ترشح IGF-I[۵] تکثیر سلول‌های اسپرماتوگنی و رسیدن به مرحله میوز و سنتز DNA را در سلول‌های زاینده تحریک می‌کند[۵]. فعالیت‌های تغذیه‌ای منجر به تغییر اندازه بیضه و تغییر اسپرم‌زایی می‌گردد که این اثرات اغلب مربوط به تغییر اندازطوله‌های سمی‌نیفر و تمایل به اسپرم‌زایی است[۶]. اثر ترکیبی از تستوسترون و FSH در مراحل آخر اسپرماتوژنز باعث افزایش غلظت IGF-I است و ممکن است بر روی این مراحل اثر تحریکی داشته باشد[۷]. انسولین همچنین می‌تواند تکثیر تعدادی سلول را درمحیط کشت تحریک کند و در تنظیم رشد سلولی در داخل بدن دخالت داشته باشد[۸].FSH باعث پیش‌برد تمایز سلول‌های‌اسپرماتوگنی ثانویه شده که این عمل تا حدی توسط مشتقات IGF-I سلول‌های سوماتیک میانجی‌گری می‌شود و بیان mRNA، IGF-1 در سلول‌های سوماتیک از خود تنظیمی بالایی برخوردار است[۹].

گنادوتروپین‌های جفتی انسان(hCG) دارای ساختمان گلیکوپروتئینی بوده و توسط سلول‌های سن‌سیتوتروفو- بلاست جفت ساخته می‌شود[۸]. احتمالاً hCG به همراه FSH باعث رشد سلول‌های‌لایدیک می‌شوند[۱۰]. تیمار نمونه‌های هیپوگنادوتروپین و هیپوگنادیسم با hCG باعث القای اسپرماتوژنز در آن‌ها و افزایش تستوسترون تا حد طبیعی و افزایش وزن و حجم بیضه‌ها می‌گردد[۱۱]. تحقیق حاضر برای بررسی اثر ترکیباتی چون انسولین و hCG بر روی سیکل تولید مثل و تغییرات بافتی بیضه‌ها در جنس نر، قبل از آغاز دورهتولید مثل در دوزیستان که دارای سیکل سالانه تولید مثل هستند، انجام شده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق در هر گروه آزمایشی، از پنج وزغ نر بالغ از گونه Bufo viridis با محدوده وزنی۳۵-۲۳

۱-Rana esculenta ۲-Mating Call ۳-Clasping ۴-Releasing Call
۵-Insulin-like Growth Factor-I

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-04]

گرم استفاده شد. حیوانات در محیطی با دمای بین۲۲-۱۹درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی نگهداری شدند.

ترکیبات مورد استفاده، انسولین گاوی بود که با آب مقطر تا ۰/۰۱ رقیق شد. به دلیل کوتاه بودن نیمه عمر انسولین، درست قبل از تزریق، عمل رقیق کردن انجام شد hCG، که محلول استریل ۵۰۰۰ IU بود، با رینگر دوزیست به رقت ۵۰ IU/ml رسانده شد. تزریق به صورت درون صفاقی انجام گرفت؛ به این صورت که در تیمار اول، ٤ بار انسولین تزریق شد. در تزریق اول ۷IU/KgWB و در دفعات بعدی ۳/۵ IU/KgWB انسولین به هر حیوان تزریق شد .در تیمار دوم نیز، ٤ بار تزریق انسولین به همراه hCG انجام گرفت. در دفعه اول ۷ IU/KgWB انسولین و ۵۰ IU/ml hCG و در دفعات بعدی ۳/۵ IU/KgWB انسولین و ۵۰ IU/ml hCG به هر حیوان تزریق شد. گروه کنترل ۲ هم در هر تزریق۱ میلی‌لیتر رینگر دریافت می‌کردند، ولی گروه کنترل۱هیچ گونه تزریقی نداشتند. فاصله بین دو تزریق ۳ روز بوده و ٤۸ ساعت بعد از آخرین تزریق برای بررسی بافت بیضه، بیضه‌ها از بدن جانور خارج شدند.

تحلیل‌های آماری با بهره گیری از روش آنالیز واریانس و با تعیین انحراف معیار و T-Test انجام گرفت و سپس درصد احتمال معنی‌دار بودن تعیین گردید.

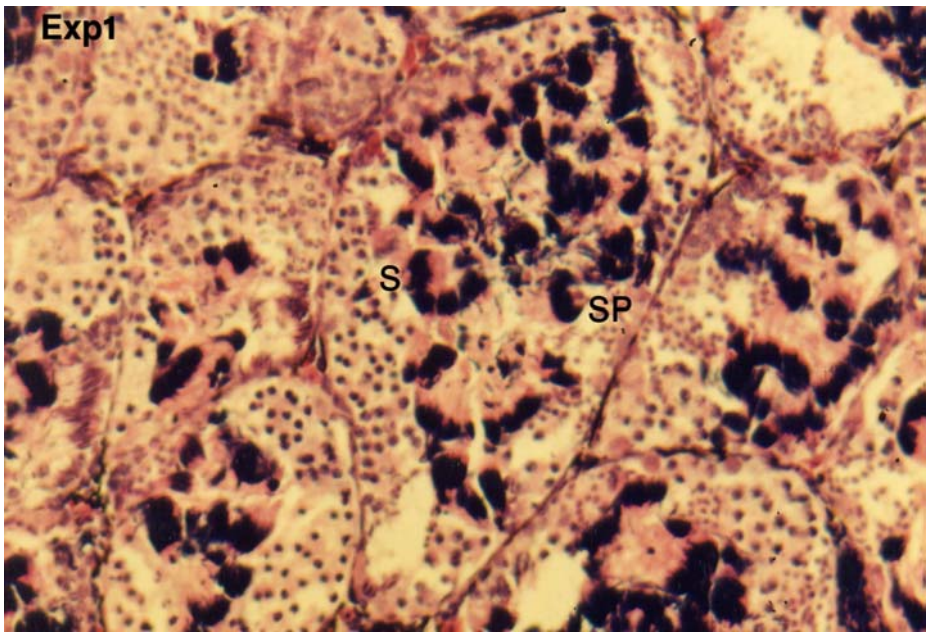
یافته‌ها

در این قسمت قطر لوله‌های سمی‌نیفر به وسیله میکرومتر مشخص شده و تعداد اسپرماتوگنی‌های I و II، و اسپرماتوسیت‌های I و II، از ۱۰ میدان لام‌های تهیه شده از هر حیوان، در گروه‌های تجربی و کنترل شمارش شد که نتایج آنالیز آماری آن در جدول ۱ آمده است. چون تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل ۱ و ۲ مشاهده نشد، گروه کنترل ۱ از محاسبات آماری حذف و گروه کنترل ۲، به صورت کنترل معرفی گردید. تصاویر برش‌های بافتی بیضه در شکل‌های ۱ الی ۳ نشان داده شده است.

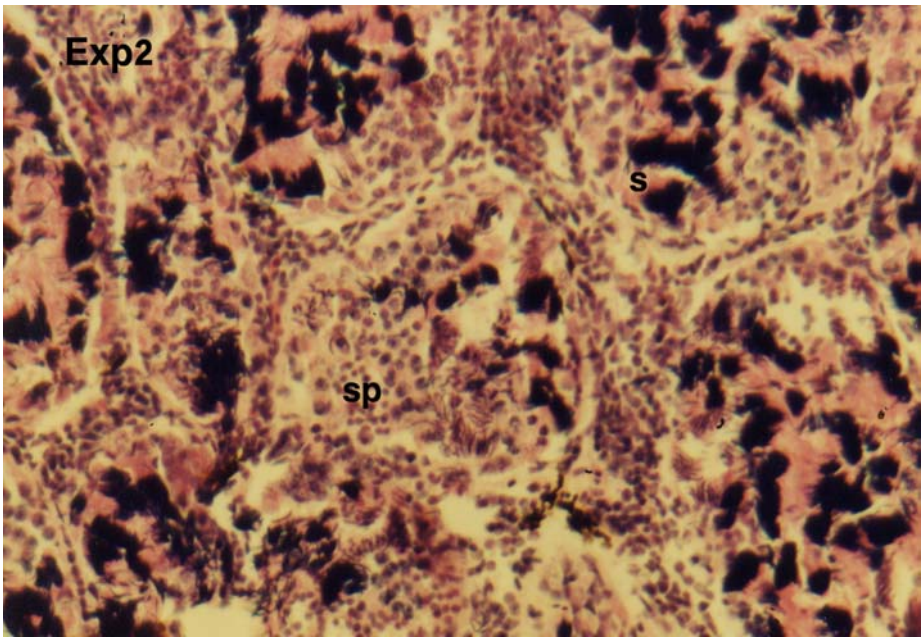
جدول ۱- مقایسه نتایج آزمایش‌ها در گروه‌های مختلف

نوع نمونه	قطرلوله های سمی نیفر	تعداد اسپرماتوگنیI	تعداد اسپرماتوگنی II	تعداد اسپرماتوسیت I	تعداد اسپرماتوسیت II
کنترل (Co)	۱۳٤/٤۱۵ ± ۳۲/۱۸۹	۱/۹۰۹ ± ۰/۳۰٤	۵/۱۹۰± ۲/۹٦٤	۱۹/۰۷۸ ± ٤/۳٤۷	۳/٤۵± ۱/۸
گروه تجربی۱ (Exp1)	۱۵۵/٦۵۲ ± ۲٦/۳۲۵	۲/۹٤۹ ± ۰/٤۲٦	۱۲/۵۳۰ ± ٤/۱	۲۹/٦۷ ± ۸/۷٦۹	۸/٦۸ ± ٤/٤٦۸
گروه تجربی ۲ (Exp2)	۱٤٤/۷۸۵ ± ۳۱/۲۱۸	٤/۹۵ ± ۱/۱۷	۱٤/۷ ± ۱/۸٦۷	۲۲/٦۲ ± ٤/۵۹٦	۸/۰۷۱ ± ۱/۵۹۵

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-04]

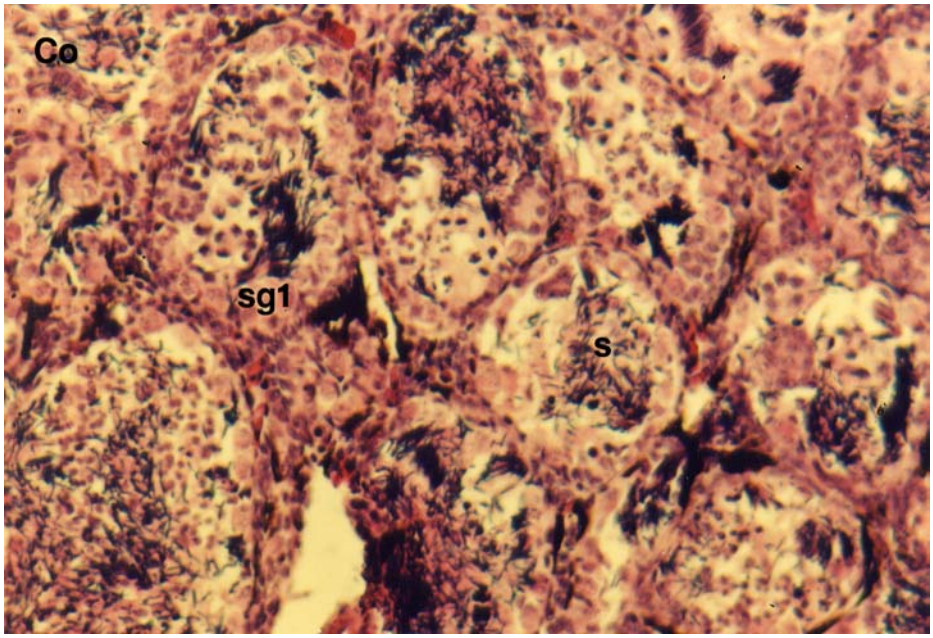


شکل۱- مقطع عرضی لوله‌های سمی نیفر بیضه وزغ، گروه تجربی ۱ ، تیمار انسولین،(H &E×800)



شکل۲- مقطع عرضی لوله‌های سمی نیفر بیضه وزغ، گروه تجربی۲، تیمار انسولین وhCG،H) &E×800)

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-04]



شکل ۳- مقطع عرضی لوله‌های سمی نیفر بیضه وزغ، گروه کنترل،H&E)×800)

چنان که در جدول مشاهده می‌شود :

۱- میانگین قطر لوله‌های سمی‌نیفر در گروه کنترل ۳۲/۱۸۹ ± ۱۳٤/٤۱۵ میکرون و در گروه تجربی۱، ۲٦/۳۲۵ ± ۱۵۵/٦۵۲میکرون است، که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند (P< ۰/۰۵). همچنین قطر این لوله‌ها در گروه تجربی ۲، ۳۱/۲۱۸ ± ۱٤٤/۷۸۵ میکرون است که با گروه کنترل از لحاظ آماری نیز اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند(P<۰/۰۵) (نمودار ۱).

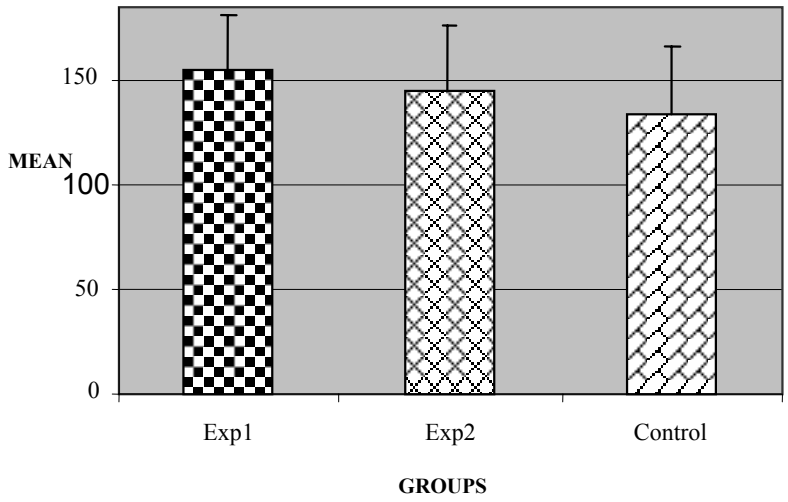
۲- میانگین تعداد اسپرماتوگنی‌های I در گروه کنترل ۰/۳۰٤± ۱/۹۰۹ و گروه تجربی۱، ۰/٤۲٦ ± ۲/۹٤۹ از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند(P<۰/۰۵)، و بین گروه تجربی ۲، ۱/۱۷ ± ٤/۹۵ با گروه کنترل نیز از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود دارد(P<۰/۰۵)(نمودار ۲).

۳- میانگین تعداد اسپرماتوگنی‌های II در گروه کنترل ۲/۹٦٤ ± ۵/۱۹۰ و گروه تجربی۱، ٤/۱ ± ۱۲/۵۳۰ از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند(P<۰/۰۵)، وهمچنین گروه تجربی۲،۱/۸٦۷± ۱٤/۷ با گروه کنترل از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارند(P<۰/۰۵)(نمودار ۳).

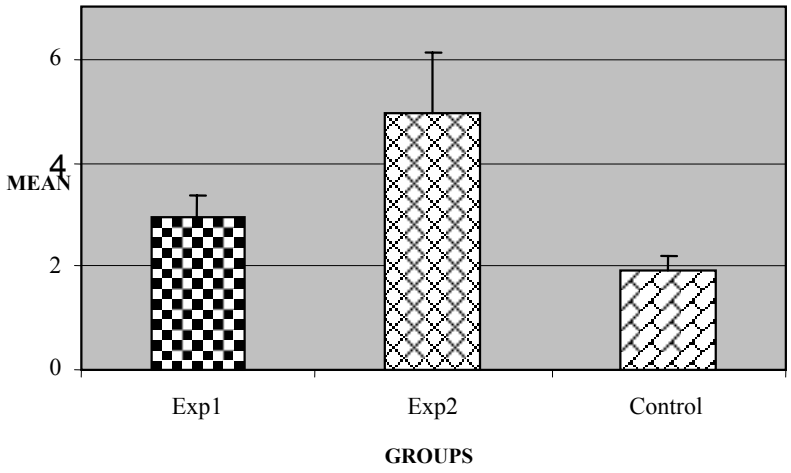
٤- میانگین تعداد اسپرماتوسیت‌های I در گروه کنترل ۳٤۷/ ٤ ± ۱۹/۰۷۸ و گروه تجربی۱، ۸/۷٦۹ ± ۲۹/٦۷ است که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان داده (P<۰/۰۵)، در حالی که گروه تجربی ۲، ٤/۵۹٦ ± ۲۲/٦۲، با گروه کنترل از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان ن نمی‌دهند(۰۷۸/ =P).

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-04]

۵ـ میانگین تعداد اسپرماتوسیت‌های II، در گروه کنترل ۱/۸ ± ۳/۴۵ و گروه تجربی ۱، ۴/۴۶۸ ± ۸/۶۸ است که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند(P<۰/۰۵)، این تعداد در گروه تجربی۲، ۱/۵۹۵± ۸/۰۷۱ است که با گروه کنترل از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارد(P<۰/۰۵)(نمودار ٤).

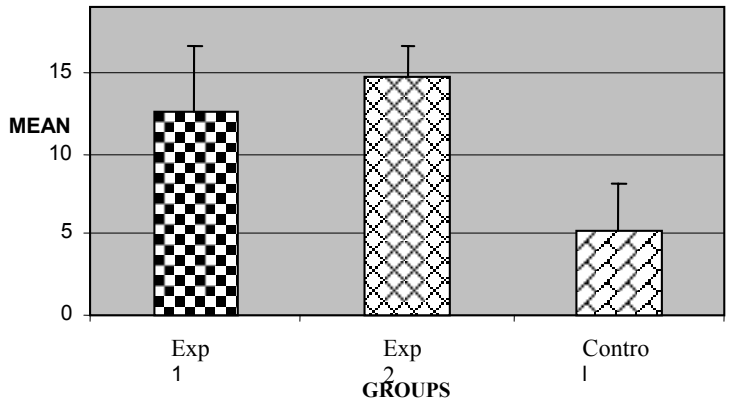


نمودار ۱ـ مقایسه میانگین قطر لوله های سمی نیفر در گروه های تیماری وکنترل

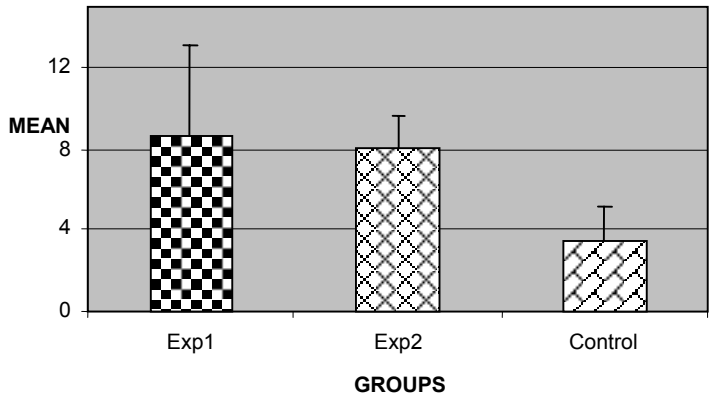


نمودار ۲ـ مقایسه میا نگین تعداد اسپرما توگنی Iدر گروه های تیماری وکنترل

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-04]



نمودار۳- مقایسه میا نگین تعداد اسپرما تو گنی IIدر گروه های تیماری و کنترل



نمودار ٤- مقایسه میا نگین تعداد اسپرما توسیت IIدر گروه های تیماری و کنترل

بحث

سیکل تولید مثل همگام با تغییرات محیطی، تغییرات رفتاری و بافتی را نیز ایجاد می‌کند .در بررسی‌هایی که با تعیین مقادیر هورمون‌ها در طول سال دیستریا[۱] و همکاران(۱۹۷٤)[۱۲]، پیرآنتونی[۲]و همکاران(۱۹۸۶) [۱۳]، واریل[۳] و همکاران(۱۹۸۶) انجام دادند، مشخص شد که در اوایل بهار مقدار تستوسترون افزایش می‌یابد، که با افزایش اسپرماتوژنز همراه است[۱٤]. در تحقیق حاضر تزریق انسولین به تنهایی باعث تغییر رنگ پوست و بروز رفتارهای جنسی نشد، ولی از نظر بافتی افزایش معنی‌داری در قطر لوله‌های سمی‌نیفر و تکثیر سلول‌های اسپرماتوژنیک ایجاد کرد. تحقیقات انجام شده بر روی رت‌های مبتلا به دیابت مشخص کرد که در این حیوانات ظرفیت اسپرمی کاهش یافته و با کاهش غلظت تستوسترون پلاسما همسویی دارد[۱۵]. محققان دیگری چون بن‌احمد[٤] و همکاران(۱۹۸۷)[۱٦]، چاتلین[٥]و همکاران(۱۹۸۷)، و مورر[٦] و همکاران (۱۹۸۷)

۱- d'Istria ۲-Pieranantoni ۳-Varriale ٤-Benahmed ٥-Chatelain ٦-Morera

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-04]

دریافته‌اند که پپتیدهای مربوط را سلول‌های سرتولی و لوله‌های سمی‌نیفر ترشح می‌کنند. IGF-I در عمل اسپرماتوژنز و رشد بیضه دخالت داشته و با تحقیقاتی که باکستر[۱] و همکاران(۱۹۸۷)، بورلند[۲] و همکاران (۱۹۸٤)[۱۷]، هندلزمن[۳] و همکاران (۱۹۸۵) و جیلارد[٤] و همکاران (۱۹۸۷) انجام دادند، وجود رسپتورهای IGF در سلول‌های سرتولی مشخص گردید، به طوری که انسولین یا IGF-I می‌توانند باعث تحریک تکثیر سلولی در سلول‌های سرتولی شوند[۱۸]. تزریق انسولین به همراه hCG اولاًباعث تیرگی شدید پوست و بروز رفتارهای تولید مثل، آواز جفت‌گیری و در برگیری شده و همچنین از نظر بافتی باعث افزایش معنی‌داری در سلول‌های اسپرماتوژنیک و کلاً روند اسپرماتوژنز می‌شود. لافتز[٥] و همکاران (۱۹۷۵)، و لیچ[٦] (۱۹۷۳)[۱۹] نشان دادند که hCG باعث فعال شدن اسپرم‌زایی شده و با اندازه‌گیری هورمون‌ها که لیچ و همکاران(۱۹۸۳) [۲۰] انجام دادند مشخص گردید که در زمان آواز جفت‌گیری در حیوان نر، مقدار گنادوتروپین‌ها افزایش می‌یابد[۲۱]. این یافته نشان می‌دهد که افزایش hCG، منجر به افزایش بیان IGF-I شده که عامل افزایش میتوز نیز است[۲۲]. سرانجام این که، اتروفیه شدن سلول‌های بینابینی در اثر فقدان انسولین با کاهش ترشح تستوسترون همسویی دارد[۲۳].

نتایج تحقیق حاضر بیان‌گر این مسئله است که اثر انسولین بر روی تکثیر سلول‌های اسپرماتوژنیک مثبت است، ولی بر سنتز هورمون‌های جنسی تأثیری ندارد وhCG باعث تحریک سنتز هورمون‌های جنسی شده و همین امر باعث بروز رفتارهای جنسی نیز می‌شود.

منابع

1. J. Dodd, Gonadal and gonadotropin hormones in lower-vertebrates, Marshall's physiology of reproduction edited by A.S Pakes , Vol. 1 Part two (1960) 417-581.
2. F. Moore, Behavioral endocrinology of amphibian reproduction, Bioscience, 33(9) (1983)557-591.
3. R. Rastogi, Seasonal cycle in anuran (amphibian) testis, The endocrine and environmental control, Boll Zool, 43 (1976) 151-172.
4. R. Rastogi, Circannual testicular rhythm in the green frog Rana esculenta, Boll Zool, 48 (1981) 97-105.

۱-Baxter ۲-Borland ۳-Handelsman ٤-Gaillard ٥-Lofts ٦-Licht

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-04]

5. W. Dubois, G.V. Collard Culture of intact sertoli/germ cell units and isolated sertoli cells from squalus testis. II stimulatory effects of insulin and IGF-1 on DNA synthesis in premeiotic stages, The journal of experimental zoology, 267(1993) 233-244.
6. G.B. Martin, Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats, J. Reprod - Fertil suppl, 49(1995) 437-49.
7. N. Itoh, A. Nanbu, H. Tachiki, k. Akagashi, T. Nitta, N. Mikuma, T. Tsukamoto, Restoration of testicular transferrin, insulin-like growth factor-I(IGF-I)and spermatogenesis by exogenously administered purified FSH and testosterone in medically hypophysectomized rats, Arch-Androl, 33(3) (1994) 169-177.
8. R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell Harper's Biochemistry, twenty forth Edition, Appleton and Lange, Stamford, Connecticut (1996) 575-580, 582-594.
9. T. Yamamota, Y. Nakayama, S.I. Abe, Mammalian follicle - Stimulating hormone and insulin like growth factor-I (IGF-I) up - regulate IFG-1 gene expression in organ culture of new testis, Mol - Reprod - Dev, 60 (2001) 56-64.
10. G.N. Savage, J.B. Kem, Effects of seminiferous tubule size on hCG-induced regeneration of peritubular Leydig cells in hypophysectomized, EDS treated rats, Int-J-Androl, 18(1)(1995) 35-45.
11. A.W. Kung, Y.Y. Zhong, K.S. Lam, C. Wang, Induction of spermatogenesis with gonadotropins in Chinese men with hypogonadotropic hypogonadism, Int. J. Andnol, 17(5) (1994) 241-7.
12. M. d'Istria, G. Delrio, V. Botto and G. Chieffi , Radioimmunoassay of testosterone, 17 beta-estradiol and oestrone in the male and female plasma of Rana esculenta during the sexual cycle. Steroid Lipids Research, 5 (1974) 42-48.
13. R. Pierantoni, B. Varriale, Minuccis, Di Matteol, S. Fasano, Regulation of androgen production by frog(Rana esculenta)testis, an in vitro study on the effects exerted by estradiol, 5 alpha-dihydrotestosterone, testosterone, melatonin and serotonin. Gen. Comp. Endocrinolo -gy, 64 (1986) 405-410.
14. F. Guarino, M. Maddatena, V. Caputo, F. Angelin, Seasonal analysis of the reproductive cycle in two wild populations of Rana italica Dubois, Anim. Biol., 2 (1993) 25-43.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-04]

15. S. Naguchi, Y. Ohba, and T. Oka, Involvement of epidermal growth factors deficiency in pathogenesis of oligozoospermia in streptozotocin induced diabetic mice, Endocrinology, 127 (1990) 2136-2146.
16. M. Benahmed, A.M. Morera, MA.Chauvin, E. De Peretti, Somatomedin C/insulin-like growth factor-I as a possible intratesticular regulator of Leydig cell activity.Mol Cell Endocrinology, 50 (1987) 69-77.
17. K. Borland, et al., The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. Endocrinology, 114 (1984) 240-246.
18. C.S. Niederberger, S. Shubhada, S.J. Kim, and D.J. Lamb, Paracrine factors and the regulation of spermatogenesis, Urology, 11(1993) 120-128.
19. P. Licht , Induction of spermiation in anurans by mammalian pituitary gonadotropins and their subunits. Gen. Comp. Endocrinology, 20 (1973) 522-529.
20. P. Licht, et al. , Seasonal and stress-related changes in plasma gonadotropins, sex steroids and corticosterone in Bullfrog, Rana catesbeiana. Gen. Comp. Endocrinology, 50 (1983)124-145.
21. M. Orchinik, P. Licht and D. Crews, Plasma steroid concentrations changes in response to sexual behavior in Bufo marinus. Hormones and behavior, 22 (1988) 338-350.
22. H. Huynh, In vivo regulation of insulin like growth factor system of mitogens by human chorionic gonadotropin, Int. J. Oncol, 13(3) (1998) 571-5.
23. J. Spiteri-Grech, G.F. Weinbauer, P. Bolze, Effects of FSH and testosterone on intratesticular insulin-like growth factor-I nd specific germ cell population in rats treated with gonadotropin releasing hormone antagonist, J-Endocrinology, 137(1)(1993) 8- 9.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-04]