

## 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 جاندار دوزیست و دارای سیکل تولید مثل ثابت است بررسی شده است. همه آزمایش‌ها بر روی وزغ‌های نر با وزن ۲۳-۳۵ گرم در ۴ گروه ۱- انسولین، ۲- انسولین و hCG ۳- کنترل ۱، ۴- کنترل ۲، انجام گرفت. به گروه انسولین ۴ بار انسولین تزریق شد در تزریق اول ۷ IU/Kg.B.W و در دفعات بعد ۳/۵ IU/Kg.B.W انسولین به حیوان تزریق شد و در گروه انسولین و hCG در تزریق اول ۷ IU/Kg.B.W انسولین با ۵۰ IU/ml hCG و در دفعات بعد ۳/۵ IU/Kg.B.W انسولین و ۵۰ IU/ml hCG تزریق شد. به گروه کنترل ۲ در هر تزریق ۱ میلی‌لیتر رینگر دوزیست تزریق شد و به گروه کنترل ۱ هیچ‌گونه تزریقی انجام نشد. تزریقات با فاصله ۳ روز در مدت ۲ هفته انجام گرفت. سپس با بهرگیری از روش‌های آماری، معنی‌داری تغییرات ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که انسولین باعث افزایش معنی‌داری در سلول‌های اسپرماتوژنیک شده و hCG علاوه بر افزایش عملکرد انسولین، باعث بروز رفتارهای جنسی " آواز جفت‌گیری" و " دربرگیری"، و همچنین تیره شدن پوست می‌شود. انسولین یک میتوزن است و باعث تکثیر سلول‌های اسپرماتوژنیک می‌گردد و hCG با تأثیر بر روی ترشح تستوسترون، رفتارهای جنسی را هم پدید می‌آورد.

### مقدمه

در حدود ۲۰۰۰ گونه از دوزیستان در دنیا وجود دارد که به ۳ گروه سمندرها<sup>۱</sup>، قورباغه‌ها و وزغ‌ها<sup>۲</sup> و آپودا<sup>۳</sup> که فاقد چشم و اندام حرکتی هستند و در مناطق گرمسیر یافت می‌شوند، تقسیم می‌شوند [۱]. 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 [۲].

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

۱-Urodels      ۲-Anura      ۳-Apoda

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 راناسکولانتا<sup>۱</sup> نشان می‌دهد که افزایش نور و دما موجب افزایش وزن بیضه‌ها و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز می‌گردد [۴]. رفتارهای تولید مثل شامل آواز جفت‌گیری<sup>۲</sup> حیوان نر، در برگیری<sup>۳</sup> به دنبال تمایل حیوان ماده، و بالعکس آواز جدایی<sup>۴</sup> حیوان ماده و دفع حیوان نر است. ساختمان ادراری - تناسلی قورباغه یا وزغ نر شامل یک زوج بیضه، مجاری اوران، مجرای ولف و کیسه اسپرمی است. بافت بیضه از لوله‌های سمی‌نیفر 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<sup>۵</sup> 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 اندازه لوله‌های 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 در محیط کشت تحریک کند و در تنظیم رشد سلولی در داخل بدن دخالت داشته باشد [۸]. FSH باعث پیش‌برد تمایز سلول‌های اسپرماتوگنی 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 سن‌سیتوروفو- بلاست جفت ساخته می‌شود [۸]. احتمالاً hCG به همراه FSH باعث رشد سلول‌های لاپدیک 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 دورتولید 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 وزنی ۲۳-۳۵

۱-Rana esculenta

۲-Mating Call

۳-Clasping

۴-Releasing Call

۵-Insulin-like Growth Factor-I

گرم استفاده شد. حیوانات در محیطی با دمای بین ۲۲-۹ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت 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، ۴ بار انسولین تزریق شد. در تزریق اول IU/KgWB<sup>۷</sup> و در دفعات بعدی IU/KgWB<sup>۳/۵</sup> انسولین به هر حیوان تزریق شد. در تیمار دوم نیز، ۴ بار تزریق انسولین به همراه hCG انجام گرفت. در دفعه اول IU/KgWB<sup>۷</sup> انسولین و ۵۰ IU/ml hCG و در دفعات بعدی IU/KgWB<sup>۳/۵</sup> انسولین و ۵۰ IU/ml hCG به هر حیوان تزریق شد. گروه کنترل ۲ هم در هر تزریق ۱ میلی‌لیتر رینگر دریافت می‌کردند، ولی گروه کنترل ۱ هیچ‌گونه تزریقی نداشتند. فاصله بین دو تزریق ۳ روز بوده و ۴۸ ساعت بعد از آخرین تزریق برای بررسی بافت بیضه، بیضه‌ها از بدن جانور خارج شدند.

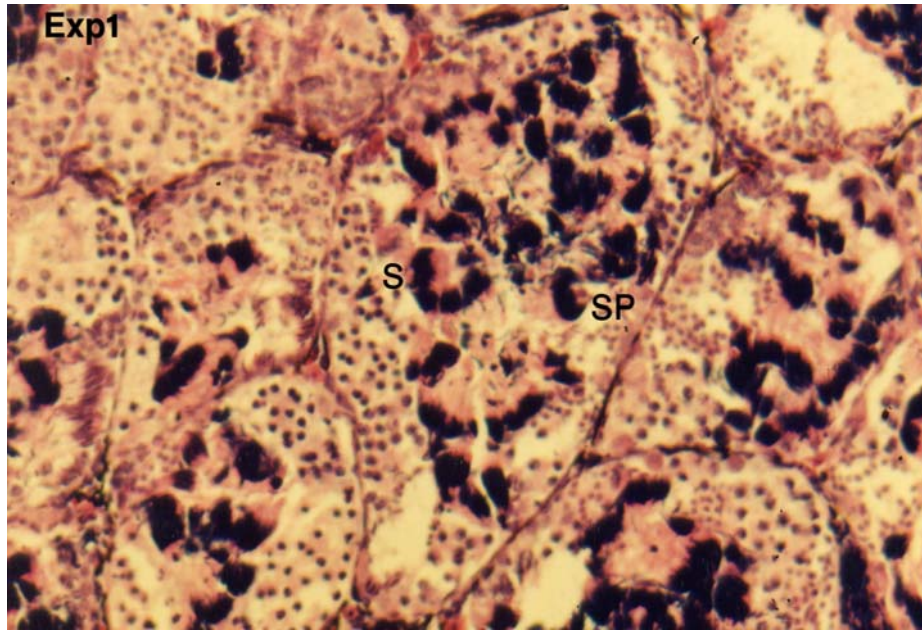
تحلیل‌های آماری با بهره‌گیری از روش آنالیز واریانس و با تعیین انحراف معیار و T-Test انجام گرفت و سپس درصد احتمال معنی‌دار بودن تعیین گردید.

### یافته‌ها

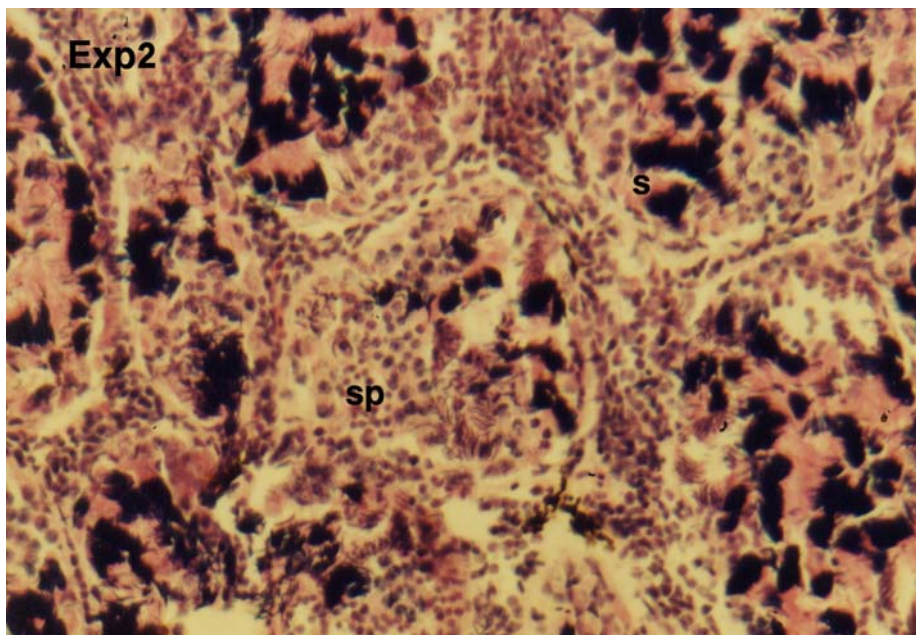
در این قسمت قطر لوله‌های سمی‌نیفر به وسیله میکرومتر مشخص شده و تعداد اسپرماتوگنی‌های I و II، و اسپرماتوسیت‌های I و II، از ۱۰ میدان لام‌های تهیه شده از هر حیوان، در گروه‌های تجربی و کنترل شمارش شد که نتایج آنالیز آماری آن در جدول ۱ آمده است. چون تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل ۱ و ۲ مشاهده نشد، گروه کنترل 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

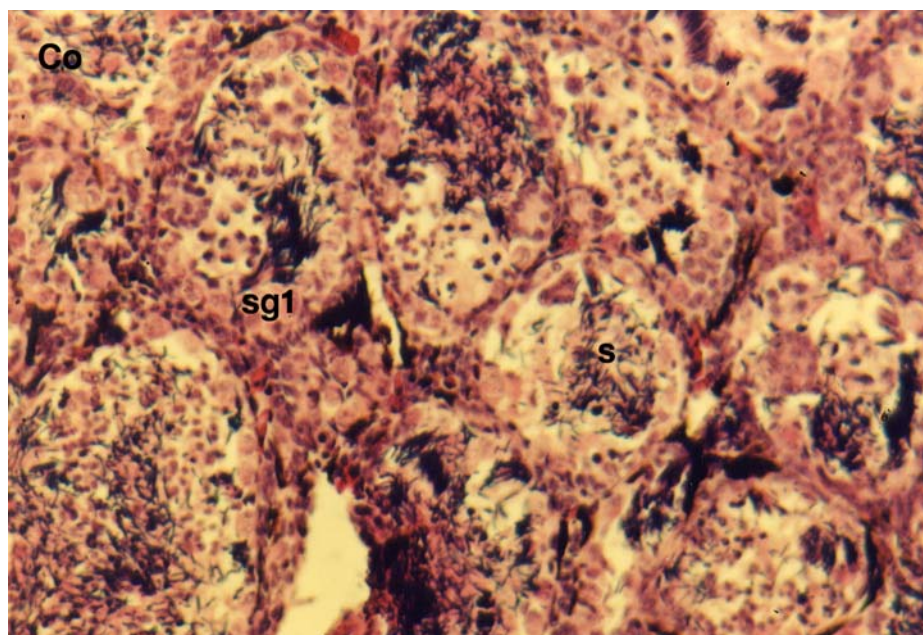
نوع نمونه	قطر لوله های سمی نیفر	تعداد اسپرماتوگنی I	تعداد اسپرماتوگنی II	تعداد اسپرماتوسیت I	تعداد اسپرماتوسیت II
کنترل (Co)	۱۳۴/۴۱۵ ± ۳۲/۱۸۹	۱/۹۰۹ ± ۰/۳۰۴	۵/۱۹۰ ± ۲/۹۶۴	۱۹/۰۷۸ ± ۴/۳۴۷	۳/۴۵ ± ۱/۸
گروه تجربی ۱ (Exp1)	۱۰۵/۶۵۲ ± ۲۶/۳۲۵	۲/۹۴۹ ± ۰/۴۲۶	۱۲/۵۳۰ ± ۴/۱	۲۹/۶۷ ± ۸/۷۶۹	۸/۶۸ ± ۴/۴۶۸
گروه تجربی ۲ (Exp2)	۱۴۴/۷۸۵ ± ۳۱/۲۱۸	۴/۹۵ ± ۱/۱۷	۱۴/۷ ± ۱/۸۶۷	۲۲/۶۲ ± ۴/۵۹۶	۸/۰۷۱ ± ۱/۵۹۵



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



شکل ۲- مقطع عرضی لوله‌های سمی نیفر بیضه وزغ، گروه تجربی ۲، تیمار انسولین و hCG، (H & E × 800)

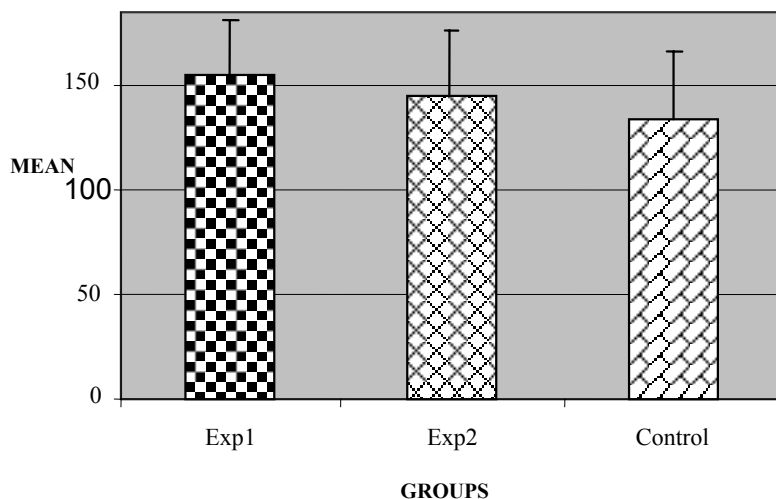


شکل ۳- مقطع عرضی لوله‌های سمی نیفر بیضه وزغ، گروه کنترل، (H&E)×800

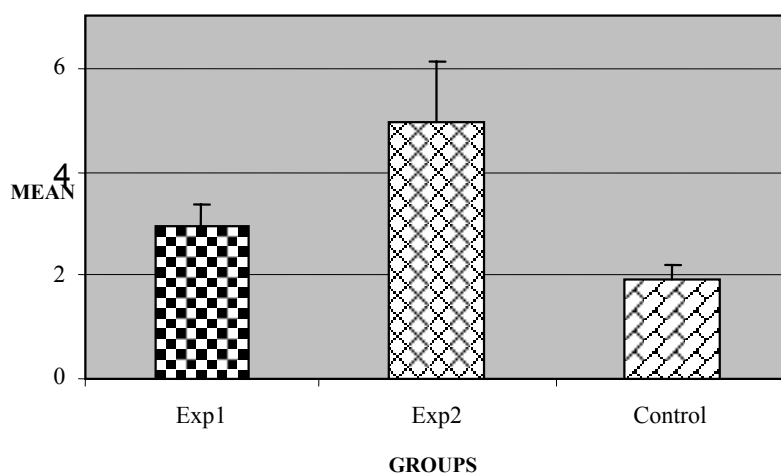
چنان که در جدول مشاهده می‌شود:

- ۱- میانگین قطر لوله‌های سمی نیفر در گروه کنترل  $32/189 \pm 134/415$  میکرون و در گروه تجربی ۱،  $26/325 \pm 155/652$  میکرون است، که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند ( $P < 0/05$ ). همچنین قطر این لوله‌ها در گروه تجربی ۲،  $31/218 \pm 144/785$  میکرون است که با گروه کنترل از لحاظ آماری نیز اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند ( $P < 0/05$ ) (نمودار ۱).
- ۲- میانگین تعداد اسپرماتوگنی‌های I در گروه کنترل  $1/909 \pm 0/304$  و گروه تجربی ۱،  $2/949 \pm 0/426$  از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند ( $P < 0/05$ )، و بین گروه تجربی ۲،  $4/95 \pm 1/17$  با گروه کنترل نیز از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0/05$ ) (نمودار ۲).
- ۳- میانگین تعداد اسپرماتوگنی‌های II در گروه کنترل  $2/964 \pm 5/190$  و گروه تجربی ۱،  $12/530 \pm 4/1$  از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند ( $P < 0/05$ )، و همچنین گروه تجربی ۲،  $14/7 \pm 1/867$  با گروه کنترل از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارند ( $P < 0/05$ ) (نمودار ۳).
- ۴- میانگین تعداد اسپرماتوسیت‌های I در گروه کنترل  $4/347 \pm 19/078$  و گروه تجربی ۱،  $29/67 \pm 8/769$  است که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان داده ( $P < 0/05$ )، در حالی که گروه تجربی ۲،  $4/596 \pm 22/62$  با گروه کنترل از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهند ( $P = 0/078$ ).

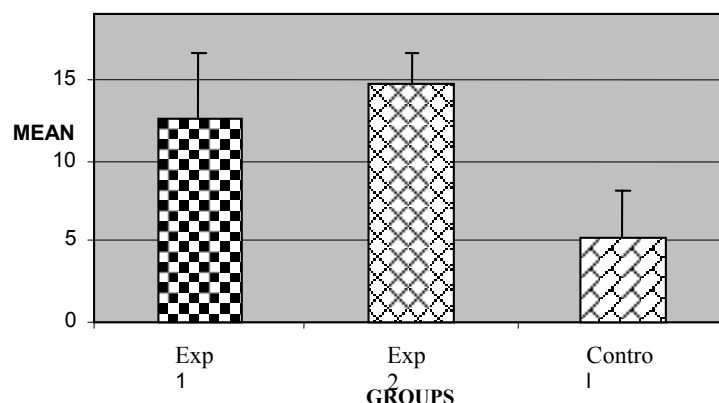
۵- میانگین تعداد اسپرماتوسیت‌های II، در گروه کنترل  $1/8 \pm 3/45$  و گروه تجربی ۱،  $4/68 \pm 8/68$  است که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهند ( $P < 0/05$ )، این تعداد در گروه تجربی ۲،  $1/595 \pm 8/071$  است که با گروه کنترل از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری دارد ( $P < 0/05$ ) (نمودار ۴).



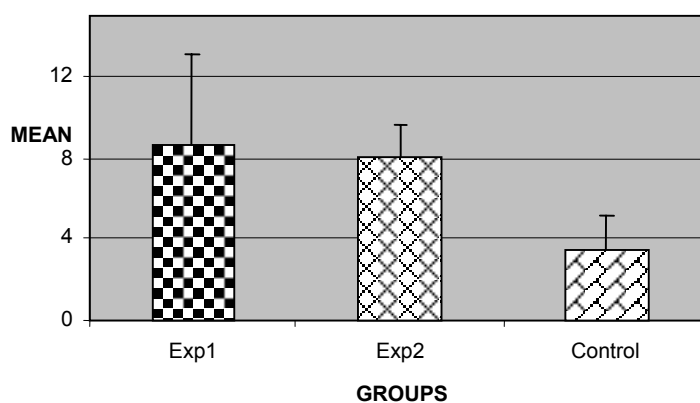
نمودار ۱- مقایسه میانگین قطر لوله های سمی نیفر در گروه های تیماری و کنترل



نمودار ۲- مقایسه میانگین تعداد اسپرما توگنی در گروه های تیماری و کنترل



نمودار ۳- مقایسه میانگین تعداد اسپرما توگنی II در گروه های تیماری و کنترل



نمودار ۴- مقایسه میانگین تعداد اسپرما توسیت II در 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<sup>۱</sup> و همکاران (۱۹۷۴) [۱۲]، پیرانتونی<sup>۲</sup> و همکاران (۱۹۸۶) [۱۳]، واریل<sup>۳</sup> و همکاران (۱۹۸۶) انجام دادند، مشخص شد که در اوایل بهار مقدار تستوسترون افزایش می‌یابد، که با افزایش اسپرماتوزنز همراه است [۱۴]. 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 اسپرماتوزنیک 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 پلازما همسویی دارد [۱۵]. محققان دیگری چون بن‌احمد<sup>۴</sup> و همکاران (۱۹۸۷) [۱۶]، چاتلین<sup>۵</sup> و همکاران (۱۹۸۷)، مورر<sup>۶</sup> و همکاران (۱۹۸۷)

۱- d'Istria

۲-Pieranantoni

۳-Varriale

۴-Benahmed

۵-Chatelain

۶-Morera

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<sup>۱</sup> و همکاران (۱۹۸۷)، بورلند<sup>۲</sup> و همکاران (۱۹۸۴) [۱۷]، هندلزمن<sup>۳</sup> و همکاران (۱۹۸۵) و جیلارد<sup>۴</sup> 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 اولاً باعث 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. لافنز<sup>۵</sup> و همکاران (۱۹۷۵)، و لیچ<sup>۶</sup> (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 و hCG 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.

<sup>۱</sup>-Baxter

<sup>۲</sup>-Borland

<sup>۳</sup>-Handelsman

<sup>۴</sup>-Gaillard

<sup>۵</sup>-Lofts

<sup>۶</sup>-Licht

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. Androl*, 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.

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.