

اثرات دیابت نوع یک و دو بر تغییرات میکروآناتومیک غده آدرنال موش صحرایی

زهره الهی مقدم^{۱*}، مرتضی بهنام رسولی^۲، ناصر مهدوی شهری^۳، الهه خواجوی^۱، رویا حاجی نژادشرویه^۱

خلاصه

مقدمه: بیماری دیابت با تغییر در برون‌ده هورمونی غدد اندوکرین سبب بروز اختلالات متابولیک ثانویه می‌گردد. از طرفی نوروپاتی، شایع‌ترین عارضه عصبی دیابت است که علاوه بر تأثیر بر سیستم اعصاب محیطی و اتونومیک، با تأثیر بر سیستم نورواندوکرین سبب تشدید و خامت بیماری می‌شود. تحقیق حاضر به منظور بررسی مقایسه‌ای اثرات هیپرگلیسمی ناشی از دیابت تجربی القا‌ی نوع یک و نوع دو بر تغییرات میکروآناتومیک غده آدرنال در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار طراحی و به مورد اجرا گذاشته شد.

روش: بدین منظور ۱۸ عدد موش صحرایی نر نژاد ویستار به سه گروه کنترل (سالم)، دیابت نوع یک تجربی (تزریق زیر جلدی آلوکسان 135mg/kg) و دیابت نوع دو تجربی (تیمار با آب آشامیدنی محتوی فروکتوز ۱۰٪ به مدت ۸ هفته) تقسیم شدند. دو ماه پس از مشاهده علائم القای هر دو نوع دیابت، سطوح فاکتورهای بیوشیمیایی خون مانند گلوکز، انسولین، کورتیزول، تری‌گلیسرید، کلسترول، LDL و HDL مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت. سپس به‌طور تصادفی یکی از غدد آدرنال موش‌های صحرایی خارج و پس از آماده‌سازی بافتی و رنگ‌آمیزی، تغییرات ساختاری نواحی قشری و مدولای آدرنال به‌وسیله تکنیک‌های استریولوژی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: آنالیز بیوشیمیایی و هورمونی سرم حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار در سطوح گلوکز، تری‌گلیسرید، انسولین و کورتیزول بین گروه‌های تجربی با گروه کنترل بود. نتایج حاصل از بررسی حجم آدرنال، افزایش حجم قشر آدرنال در دیابت نوع یک و دو و همچنین کاهش حجم و دانسیته نورونی مدولای آدرنال در دیابت نوع یک را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد.

نتیجه‌گیری: در هیپرگلیسمی ناشی از دیابت به‌علت افزایش فعالیت محور هیپوتالاموسی-هیپوفیزی-آدرنال افزایش ترشح ACTH منجر به افزایش رشد قشر آدرنال و افزایش ترشح هورمون‌های آن می‌شود. کاهش حجم و تراکم نورونی ناحیه مدولای آدرنال در شرایط دیابتیک ممکن است ناشی از ایجاد مسیرهای متابولیکی غیرطبیعی همچون استرس اکسیداتیو به‌واسطه هیپرگلیسمی اتفاق افتاده باشد. در دیابت نوع دو، ظهور دیررس اختلالات عملکردی و ساختاری را می‌توان به پائین بودن سرعت وقوع هیپرگلیسمی و مقاومت به انسولین نسبت داد لذا عوارض بیماری به‌میزان زیادی وابسته به طول دوره بیماری است.

واژه‌های کلیدی: دیابت نوع یک، دیابت نوع دو، آدرنال، موش صحرایی

۱. کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال ۲. استاد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد ۳. استاد بافت‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: z.elahimoghaddam@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۶/۱۳ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۱/۹/۱۱ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۹/۲۹

مقدمه

وجود انسولین و هورمون‌های آدرنال برای متابولیسم طبیعی و مقاومت در برابر انواع استرس‌ها از قبیل استرس‌های بیولوژیک، فیزیکی و حتی ذهنی ضروری است. دیابت یکی از شایع‌ترین اختلالات متابولیکی است که ناشی از نقص در عملکرد انسولین، ترشح آن و یا هر دو می‌باشد. دیابت با ایجاد اختلال در عملکرد سیستم عصبی و غدد درون ریز همچون آدرنال، سبب تغییر در برون‌ده هورمونی آنها و در نتیجه بروز اختلالات متابولیک غیرطبیعی می‌شود (۱،۲). هیپرگلیسمی مزمن با آسیب و اختلال در عملکرد دستگاه‌های متعدد بدن و سیستم نورواندوکرین سبب اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها، به دلیل ترشح ناکافی و یا اختلال در عملکرد هورمون‌هایی همچون انسولین و کورتیزول، بر بافت‌های هدف خود، می‌شود (۱،۳). از طرف دیگر آسیب‌های عصبی ناشی از دیابت می‌تواند موجب اختلال در عملکرد اعصاب اتونومیک، محیطی و سیستم نورواندوکرین شده و از این طریق سبب تشدید وخامت بیماری و افزایش مرگ و میر در این بیماران شود (۴). در بیماری دیابت افزایش فعالیت محور هیپوتالاموسی-هیپوفیزی-آدرنال (HPA)، هیپرکورتیزولیسم و رشد آدرنو کورتیکال را موجب می‌شود. افزایش فعالیت محور هیپوتالاموسی-هیپوفیزی-آدرنال می‌تواند ناشی از کاهش حساسیت نسبی به فیدبک منفی گلوکوکورتیکوئیدها در بخش‌های مختلف این محور، تغییر فعالیت آنزیم (۱۱ بتا دهیدروکسی استروئید دهیدروژناز) 11B-HSDs و افزایش بیان هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین هیپوتالاموس باشد. به نظر می‌رسد در افراد مبتلا به دیابت عدم توازن سیستم عصبی اتونومیک به افزایش فعالیت محور هیپوتالاموسی-هیپوفیزی-آدرنال منجر می‌گردد (۳،۵). بنابراین چنین به نظر می‌رسد که عوارض متابولیکی غیرطبیعی حاصل از هیپرگلیسمی و همچنین برهم کنش مسیرهای متابولیکی مختلف در بروز نوروپاتی ناشی از دیابت دخیل باشند (۶). تغییرات متابولیکی که در اثر سطوح بالای گلوکز سیستم عصبی اتونومیک را تحت تأثیر

قرار می‌دهد (۷) فعالیت بیولوژیکی سلول‌ها را کاهش داده و منجر به از دست رفتن متابولیسم انرژی، پیام‌رسانی سلولی، نقل و انتقالات و سایر عملکردهای مهم سلول شده و در نهایت منجر به مرگ سلولی از طریق مکانیسم‌های آپوپتوتیک و نکروتیک می‌شوند (۸). در زمینه تغییرات نوروشیمیایی نیز به نظر می‌رسد که سطح نوروترانسمیترهای عصبی در افراد دیابتی تغییر می‌یابد و می‌تواند زمینه تغییرات آناتومیکی را فراهم نماید. در این رابطه کاهش سطوح کاتکول آمین‌ها در سیستم عصبی اتونومیک، آدرنال و سرم موش‌های صحرایی دیابتی حاکی از آن است که سیستم نوروترانسمیتری کاتکول آمین‌ها بیشتر از سایر سیستم‌ها تحت تأثیر دیابت قرار می‌گیرد. کاهش سطوح سرمی این نوروترانسمیترها احتمالاً به دلیل کاهش سنتز کاتکول آمین‌ها و کاهش آزادسازی آنها از ترمینال‌های عصبی می‌باشد (۹،۱۰). اگرچه مطالعات زیادی در زمینه اثرات دیابت نوع یک و دیابت نوع دو بر تغییرات ساختاری و عملکردی بخش‌های مختلف غده آدرنال صورت گرفته است اما تاکنون کمتر به بررسی مقایسه‌ای و همزمان اثرات دیابت نوع یک و دیابت نوع دو پرداخته شده است. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی مقایسه‌ای اثرات دیابت نوع یک و دیابت نوع دو تجربی بر تغییرات میکروآناتومیک آدرنال در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار بوده است.

روش بررسی

در این تحقیق از ۱۸ رت نر نژاد ویستار دو ماهه استفاده شد. این حیوانات در شرایط استاندارد با دمای 20 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ساعات روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ نگهداری و با آب و غذای استاندارد رت مورد تغذیه قرار گرفتند. حیوانات با رعایت مقررات بین‌المللی اخلاق علمی و انجمن حمایت از حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شدند. رت‌ها به صورت تصادفی به سه گروه شش‌تایی شامل گروه کنترل و دو گروه تجربی شامل دیابتی نوع یک و دیابتی نوع دو تقسیم شدند. به منظور القای دیابت نوع دو، رت‌ها از سن دو ماهگی به جای آب آشامیدنی معمولی با آب آشامیدنی حاوی فروکتوز ۱۰٪ (Merk, Germany) تغذیه

آلوکسان به منظور اطمینان از ایجاد دیابت نوع یک، قند خون ناشتای این حیوانات اندازه گیری شد. در پایان هفته ۱۶ (حدود ۶ ماهگی) فاکتورهای بیوشیمیایی خون مانند گلوکز، انسولین، تری گلیسرید، کلسترول، کلسترول-LDL و کلسترول-HDL و هورمون کورتیزول اندازه گیری شد.

آماده سازی و جداسازی نمونه های بافتی تکنیک کاوالیه

پس از پرفیوژن و خارج کردن غدد آدرنال و فیکساسیون تکمیلی یکی از غدد آدرنال حیوانات وارد مراحل پاساژ بافتی گردید. پس از آن از بلوک های پارافینی تهیه شده، برش هایی به ضخامت ۷ میکرون و به صورت سریال تهیه شد. برش های اولیه تا رسیدن به غده آدرنال کنار گذاشته شدند و برش های ناحیه غده آدرنال به صورت تصادفی و سریال به ازای هر ۳۰ برش ۳ برش انتخاب شدند، بدین ترتیب که با انتخاب یک عدد بین ۱ و ۳۰ مثلاً عدد ۱۵ برش برداری آغاز شد. به طوری که سری اول، برش های شماره ۱۵ و ۱۶ و ۱۷ و سری دوم برش های ۴۵ و ۴۶ و ۴۷ و سری سوم برش های ۷۵ و ۷۶ و ۷۷ و الی آخر انتخاب شدند. هدف از این کار، در اختیار داشتن تمام قسمت های مورد بررسی در مجموع نمونه های مربوط به هر گروه بود. پس از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، تصاویر مربوط به هر نمونه با استفاده از دوربین دیجیتال (Olympus Dp71) تهیه شد. برای تهیه تصویری کامل از غده آدرنال عکس برداری با استفاده از عدسی شیئی ۲ از برش های اول هر سری صورت گرفت.

در مرحله بعد از عکس های تهیه شده برای بررسی حجمی غده آدرنال از تکنیک کاوالیه استفاده شد.

این تکنیک اهمیت ویژه ای را در برآورد حجم مرجع در مطالعات استریولوژیکی به ویژه در کارهای بیومدیكال دارا می باشد، که با استفاده از برش های تصادفی یکنواخت و موازی و با فاصله مشخص، حجم نمونه را می توان با در دست داشتن مساحت برش ها و فاصله بین آنها محاسبه نمود (۱۴، ۱۵).

شدند (۱۱، ۱۲). این روند به مدت هشت هفته (یعنی تا سن چهار ماهگی) ادامه داشت تا مقاومت به انسولین القا گردید. در طی این مدت رت های گروه کنترل و گروه دیابتی نوع یک با آب و غذای معمولی تغذیه شدند.

جهت اطمینان از ایجاد القای دیابت نوع دو، از رت ها تست تحمل گلوکز گرفته شد و مساحت زیر منحنی و شاخص مقاومت به انسولین ناشتا (FIRI) در دو گروه کنترل و دیابتی نوع دو با یکدیگر مقایسه شدند. محاسبه FIRI با خون گیری از سینوس چشمی و اندازه گیری میزان انسولین و گلوکز ناشتا صورت گرفت. جهت پایدار نگه داشتن حالت مقاومت به انسولین تیمار با فروکتوز در طول دوره آزمایش (هشت هفته بعد) ادامه یافت. در تمام مدت آزمایش تغییرات وزن و گلوکز خون حیوانات به طور مداوم اندازه گیری و مورد ارزیابی قرار گرفت.

اندازه گیری تست تحمل گلوکز

در پایان هفته هشتم تیمار با فروکتوز و پس از ۱۲ ساعت ناشتا، وزن و قند خون ناشتای حیوانات با استفاده از دستگاه گلوکومتر اندازه گیری شد. سپس، محلول ۴۰٪ گلوکز با غلظت دو گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی به حیوان تزریق و میزان گلوکز خون در زمان ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق گلوکز مورد ارزیابی قرار گرفت.

محاسبه شاخص مقاومت به انسولین ناشتا Fasting Insulin Resistance Index (FIRI):

شاخص مقاومت به انسولین ناشتا معیاری برای تعیین دیابت نوع دو است که از فرمول ذیل به دست می آید (۱۳).

$$FIRI = \frac{(mg/dl) \times \text{گلوکز} (MIU/ml) \times \text{انسولین}}{25}$$

دیابت نوع یک در سن چهار ماهگی با تزریق زیر پوستی آلوکسان (Merk, Germany) با دو ۱۳۵ mg/kg وزن بدن، دیابت نوع یک القا شد. سه روز پس از تزریق

تکنیک دایسکتور

پس از تهیه برش‌های سریال تصاویر با عدسی شیئ ۴۰ از برش‌های ۱ و ۲ هر لام تهیه شد. بدین ترتیب که ابتدا کل مقطع مدولای آدرنال به ۹ فیلد میکروسکوپی تقسیم شد و انتخاب فیلدهای میکروسکوپی برای عکس‌برداری به صورت سیستماتیک رندوم انجام شد. بدین صورت که به ازای هر ۳ فیلد، ۱ فیلد میکروسکوپی انتخاب و عکس برداری شد، به عنوان مثال در سری اول، فیلدهای ۲ و ۵ و ۸ انتخاب و عکس‌برداری شدند و پس از یافتن همین مناطق در برش ۲ از آنها نیز عکس‌برداری شد. در سری دوم فیلدهای ۳ و ۶ و ۹ و الی آخر انتخاب و عکس‌برداری شدند. در مرحله بعد از عکس‌های تهیه شده برای شمارش نورون‌ها به کمک تکنیک دایسکتور (۱۶) استفاده شد و تراکم نورونی در مدولای آدرنال مورد بررسی قرار گرفت.

روش انجام آنالیزهای آماری

جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف از آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه نرم‌افزار SPSSv15 استفاده شد. سپس سطح اختلاف معنی‌دار بین هر دو گروه با استفاده از آزمون t-test به دست آمد (از نظر آماری مقادیر $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد). نمودارها و جداول نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردیدند.

نتایج

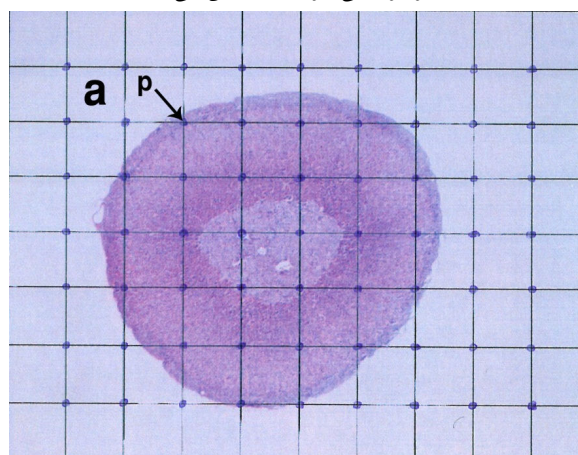
از متغیرهای مهمی که جهت اطمینان از القای دیابت نوع دو مورد استفاده قرار می‌گیرند فاکتور FIRI و تست تحمل گلوکز است. این متغیرها در دو گروه کنترل و مقاوم به انسولین محاسبه گردید.

نتایج مربوط به تست تحمل گلوکز نشان داد که تفاوت میزان قند خون ناشتا، در نیم ساعت و دو ساعت پس از تزریق گلوکز بین دو گروه کنترل و گروه دیابت نوع دو معنی‌دار است.

نیز در گروه (FIRI) همچنین اندازه مساحت زیر منحنی و فاکتور (دیابتی نوع دو در مقایسه با کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد (جدول ۱).

مراحل مختلف این روش به شرح زیر می‌باشد. نمونه مورد نظر (در این تحقیق غده آدرنال) به صورت برش‌های سیستماتیک موازی و با فاصله مساوی (d) برش زده شد. آغاز برش‌گیری به صورت اتفاقی است. پس از آن از یک برگ ترانس پرئسی که بر روی آن تعدادی نقطه به طور یکنواخت و با فواصل برابر قرار گرفته بود (شکل ۱) بر روی برش‌ها قرار داده شد و تعداد نقاط واقع بر روی مقطع آدرنال شمارش شد، بدین ترتیب مجموع وسعت و یا سطح مقطع‌های غده آدرنال ($\sum A$) روی تمام برش‌ها محاسبه شد و به دنبال آن طبق فرمول زیر حجم کلی غده آدرنال محاسبه گردید.

شکل ۱. در تکنیک کاوالیه تعداد نقاطی که بر روی سطح مقطع مورد نظر قرار می‌گیرند، شمارش می‌شوند.



$$V (\text{Adrenal Gland}) = d \times \sum A$$

V = حجم کلی مقطع مورد نظر

d = فاصله بین برش‌ها (mm)

$\sum A$ = مجموع مساحت سطح مقطع‌های غده آدرنال و از

فرمول زیر به دست می‌آید.

$$\sum A = \sum P \times a(p)$$

$\sum P$ = تعداد نقاط شمارش شده روی کل سطح مقطع‌های

نمونه

$a(p)$ = مساحت مربوط به هر نقطه p (mm²).

$$V(\text{mm}^3) = d \times \sum p \times a(p)$$

بنابراین :

(۵ ماهگی) و در پایان دوره آزمایش (۶ ماهگی) مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان گلوکز سرم خون همه گروه‌ها نیز در زمان شروع کار (دو ماهگی)، پس از القا دیابت نوع یک و دو (چهار ماهگی) و در پایان دوره آزمایش (۶ ماهگی) اندازه‌گیری شد (جدول ۲). همچنین تغییرات سطح سایر فاکتورهای بیوشیمیایی خون و هورمون کورتیزول (جدول ۳) نیز اندازه‌گیری گردید.

نتایج حاصل از بررسی حجمی قشر آدرنال، افزایش معنی‌داری را در دیابت نوع یک و نوع دو در مقایسه با کنترل نشان داد. بررسی حجمی قشر آدرنال گروه‌های دیابتی نوع ۱ و ۲ در مقایسه با یکدیگر حاکی از تفاوت معنی‌داری نبود (نمودار ۱).

جدول ۱. مقایسه میزان فاکتور FIRI و مساحت زیر منحنی در دو گروه کنترل و مقاوم به انسولین

مقاوم به انسولین	کنترل	
مساحت زیر منحنی (mg/dl)×min	۴/۱ ± ۱۶۵۲۲/۰۵	*۶/۳ ± ۱۹۴۳۹/۵۵
فاکتور FIRI (mg/dl)×(miu/ml)	۰/۵۷ ± ۴/۰۷	**۱/۲۶ ± ۱۰/۱۱

مقایسه (میانگین ± SEM) با گروه کنترل $p < ۰/۰۵$ ، $p < ۰/۰۱$ ، $p < ۰/۰۰۱$

حجم نمونه در هر گروه ۶ رت نر بالغ

روش آماری: student t-test

نوع مطالعه: تجربی

در گروه کنترل و گروه‌های تجربی، وزن حیوانات در سه سطح پایه (دو ماهگی)، یک ماه پس از تأیید القا دیابت

جدول ۲. تغییرات وزن و گلوکز سرم خون گروه‌های مختلف در طول دوره آزمایش

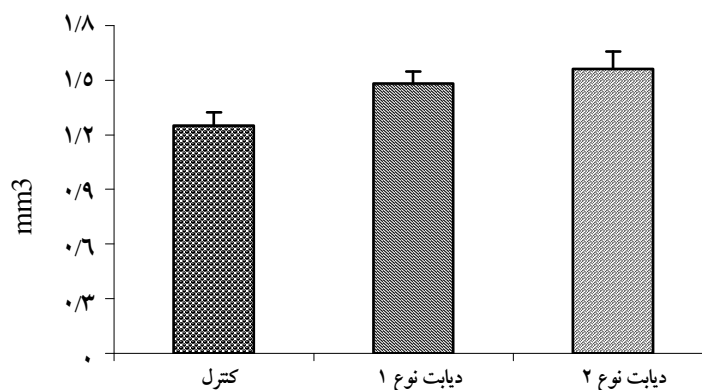
وزن بدن (گرم)		گلوکز سرم (میلی گرم بر دسی لیتر)				
دو ماهگی	پنج ماهگی	شش ماهگی	دوماهگی	چهار ماهگی	شش ماهگی	
۲/۳ ± ۲۱۰/۵	۲/۴ ± ۲۲۷	۵/۲ ± ۲۲۷/۸	۳/۷ ± ۱۱۰/۸	۴/۴ ± ۱۰۸	۱۰/۲ ± ۹۵/۵	کنترل
۲/۲ ± ۲۲۳/۲	*۵/۸ ± ۲۲۶/۵	۱۰ ± ۱۹۰/۵	۴/۴ ± ۱۰۸	***۲۵ ± ۳۷۰	***۸۲/۵ ± ۳۳۰	دیابت نوع یک
۳/۹ ± ۲۰۸/۲	**۶/۸ ± ۲۵۸/۱	***۶/۷ ± ۲۹۷/۷	۵/۷ ± ۱۰۵	۴ ± ۱۲۱/۷	*۳۲/۶ ± ۱۷۷/۵	دیابت نوع دو

مقایسه (میانگین ± SEM) وزن و میزان گلوکز سرم در گروه‌های مختلف $p < ۰/۰۵$ ، $p < ۰/۰۱$ ، $p < ۰/۰۰۱$

حجم نمونه ۶ رت نر بالغ

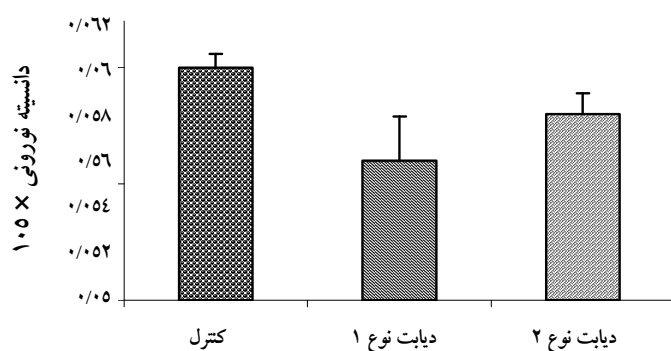
روش آماری: ANOVA و student t-test

نوع مطالعه: تجربی



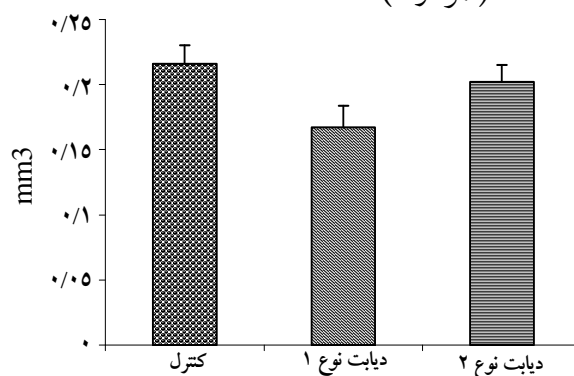
نمودار ۱. مقایسه بررسی حجمی قشر آدرنال (mm^3) در موشهای صحرایی کنترل و دیابت نوع یک و دو. نتایج به صورت میانگین ± SEM ارائه شده است ($p < ۰/۰۵$ در مقایسه با کنترل) ($n = 6$).

نتایج حاصل از محاسبه حجمی ناحیه مدولای آدرنال، کاهش معنی داری را در گروه دیابت نوع یک در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. در گروه دیابت نوع دو دانسیته نورونی مدولا کاهش یافت ولی این کاهش در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبود. بین گروه‌های تجربی نیز تفاوت معنی داری مشاهده نشد (نمودار ۳).



نمودار ۳. مقایسه دانسیته نورونی ناحیه مدولای آدرنال (Nv/mm^3) در موشهای صحرایی کنترل و دیابت نوع یک و نوع دو. نتایج به صورت میانگین \pm SEM ارائه شده است ($p < 0.05$ ، $^{**}p < 0.01$ ، مقایسه با گروه کنترل) ($n=6$).

نتایج حاصل از محاسبه حجمی ناحیه مدولای آدرنال، کاهش معنی داری را در گروه دیابت نوع یک در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. در گروه دیابت نوع دو حجم مدولا کاهش یافت ولی این کاهش در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبود. بین گروه‌های تجربی نیز تفاوت معنی داری مشاهده نشد (نمودار ۲).



نمودار ۲. مقایسه بررسی حجمی مدولای آدرنال (mm^3) در موشهای صحرایی کنترل و دیابت نوع یک و دو. نتایج به صورت میانگین \pm SEM ارائه شده است ($p < 0.05$ ، $^{**}p < 0.01$ ، مقایسه با کنترل) ($n=6$).

جدول ۳. میزان گلوکز، انسولین، تری گلیسیرید، کورتیزول، کلسترول، HDL LDL در گروه کنترل و گروه‌های تجربی در پایان دوره آزمایش

گروه	کنترل	دیابت نوع یک	دیابت نوع دو
گلوکز (mg/dl)	10/27 ± 95/5	*82/55 ± 330	*32/6 ± 177/5
کورتیزول (nmol/l)	5/88 ± 36/2	11/6 ± 31/74	7/19 ± 64/8
انسولین (miu/ml)	0/11 ± 1/07	0/08 ± 0/97	*0/17 ± 1/52
تری گلیسیرید (mg/dl)	4/09 ± 50/75	*10/64 ± 62	16/02 ± 68/25
کلسترول (mg/dl)	2/29 ± 61/25	4/15 ± 69/5	1/25 ± 61/25
LDL (mg/dl)	1/8 ± 36/25	3/61 ± 30/7	1/82 ± 35
HDL (mg/dl)	1/2 ± 16/33	1/41 ± 15/5	0/49 ± 15/33

مقایسه (میانگین \pm SEM) با گروه کنترل $p < 0.05$ ، $^{*}p < 0.01$ ، $^{***}p < 0.001$

حجم نمونه ۶ رت بالغ

روش آماری: ANOVA و student t-test

نوع مطالعه: تجربی

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهند که پس از ۸ هفته تیمار با فروکتوز در گروه دیابتی نوع دو، افزایش معنی‌دار فاکتور FIRI و نیز مساحت زیر منحنی و همچنین افزایش وزن بدن و گلوکز خون تأیید کننده القای دیابت نوع دو است (جدول ۱ و ۲). از طرفی در رت‌های دیابتی نوع یک افزایش گلوکز خون، اشتها، ادرار، تشنگی و کاهش وزن بدن که در طول دوره آزمایش مشاهده شد گواه بر القای دیابت نوع یک در آنهاست.

مقایسه نتایج حاصل از اندازه‌گیری قشر آدرنال به روش کاوالیه در گروه‌های کنترل و دیابتی حاکی از افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) حجم قشر آدرنال در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل می‌باشد. این چنین افزایش حجم قشر آدرنال در گروه‌های دیابتی در توافق با نتایج حاصل از تحقیقات قبلی است (۱۷-۱۹). افزایش حجم قشر آدرنال احتمالاً به دلیل هیپرتروفی و افزایش ترشح هورمون‌های قشر آدرنال، از جمله کورتیزول است. در این رابطه اندازه‌گیری سطح کورتیزول سرم خون افزایش معنی‌دار ($P < 0.01$) سطح کورتیزول سرم را در گروه دیابتی نوع دو نسبت به کنترل نشان می‌دهد (جدول ۳). در این راستا نتایج مطالعه‌ای بر روی میزان متابولیت‌های ادراری کورتیزول کاهش میزان این متابولیت‌ها در ادرار افراد مبتلا به دیابت نوع یک را نشان می‌دهد. این کاهش احتمالاً ناشی از آسیب مسیرهای متابولیک ناشی از هیپرگلیسمی، مانند مسیر beta HSD ۱۱ که کورتیزول را به متابولیت غیرفعال آن (کورتیزون) تبدیل می‌کند، باشد (۲۰). از طرف دیگر اندازه‌گیری شبانه‌روزی سطوح کورتیزول و ACTH در ۱۷۰ بیمار مبتلا به دیابت نوع دو نشان داده است که ترشح ادراری کورتیزول و فعالیت محور HPA در آن دسته از بیماران دیابتی که از اختلالات مزمن دیابت نیز رنج می‌برند، نسبت به آنهایی که بدون اختلالات مزمن هستند، به‌طور چشمگیری بیشتر است (۲۱). این یافته‌ها بیانگر آن است که در شرایط دیابتی، به‌ویژه دیابت نوع دو، فعالیت محور HPA و به تبع آن برون‌ده هورمونی قشر آدرنال،

تحت تأثیر شرایط هیپرگلیسمی قرار می‌گیرند و در صورت عدم کنترل قند خون، بروز اختلالات ثانویه در فعالیت سایر غدد درون ریز موجب تشدید وخامت بیماری می‌شود (۳). در شرایط فیزیولوژیک، فعالیت محور HPA تحت تأثیر فیدبک منفی گلوکو کورتیکوئیدها قرار دارد (۲۲). افزایش مزمن گلوکو کورتیکوئیدها، با کاهش حساسیت این محور به اثرات فیدبکی، احتمالاً مسئول بخشی از اختلالات عملکردی و افزایش فعالیت محور HPA در شرایط دیابتی است (۲۲، ۲۳). افزایش سطح ACTH خود موجب تحریک بیشتر قشر آدرنال و به دنبال آن هیپرتروفی و افزایش حجم قشر آدرنال می‌شود (۲۴). اختلال در متابولیسم چربی‌ها و مقاومت به انسولین نیز ممکن است عامل دیگری جهت افزایش حجم قشر آدرنال و افزایش ترشح کورتیزول باشد (۲۴، ۲۵). در این رابطه نتایج حاصل از اندازه‌گیری سطح فاکتورهای بیوشیمیایی خون نشان می‌دهد که سطوح تری‌گلیسرید به‌طور چشمگیری در رت‌های دیابتی افزایش می‌یابد (جدول ۳). نتایج حاصل از مطالعه‌ای که بر روی رت‌های دیابتی شده ناشی از آلوکسان (۲۶) و STZ (۲۷) به‌عمل آمده است نشان داده است که، در مقایسه با گروه کنترل، در نمونه‌های دیابتی شده، سطوح کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL و VLDL افزایش و در سطح HDL کاهش بوجود می‌آید. به‌طور مشابه، در مطالعه دیگری که بر روی رت‌های دیابتی نوع دو (القای دیابت نوع دو با مصرف فروکتوز ۲۵ درصد) انجام شده است افزایش سطوح کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL و VLDL و کاهش HDL دیده شده است (۲۸، ۲۹). این چنین تغییرات بارز و نامطلوب در سطوح لیپیدها و لیپوپروتئین‌های خون می‌تواند ناشی از تغییر سطوح هورمون‌هایی همچون انسولین و کورتیزول باشد. این یافته‌ها خود مؤید ارتباط متقابل بین دو هورمون متابولیک کورتیزول و انسولین است (۱، ۲۴). از این رو دور از انتظار نیست که اختلال یکی موجب بروز اختلال در دیگری شود.

مقایسه نتایج حاصل از اندازه‌گیری حجم و تخمین تراکم نورنی ناحیه مدولای آدرنال نشان می‌دهد که در

حال باید به این موضوع اشاره کرد که یکی از عوارض مزمن دیابت، البته عوارض دیررس، نورپاتی و تغییرات نورولوژیکی است (۳۶،۳۷) و این احتمال وجود دارد که بخش مدولای آدرنال نیز درگیر این اختلال شود (۳۸). (البته در تحقیق حاضر به دلیلی کوتاه بودن طول دوره ابتلای به دیابت وقوع نورپاتی دیابتی بعید به نظر می‌رسد). از این رو چنین به نظر می‌رسد که تغییر در سطوح کاتکول آمین‌ها در بیماری دیابت منعکس کننده عدم توازن سیستم عصبی اتونومیک و شروع بروز اختلالات نورپاتی اتونومیک است (۳۹). همچنین کاهش حجم و تراکم نورونی ناحیه مدولای آدرنال در شرایط دیابتیک ممکن است ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد به‌ویژه رادیکال‌های آزاد اکسیژن و افزایش فاکتورهای التهابی و به‌دنبال آن تشدید آسیب‌پذیری سلول‌های ناحیه مدولا اتفاق افتاده باشد (۷،۴۰).

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از مساعدت‌های مدیریت و کارشناسان گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی که امکان انجام این پژوهش را فراهم آوردند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

- Alrefai H, Allababidi H, Levy S, Levy J. The endocrine system in diabetes mellitus. *Endocrine* 2002; 18: 105-119.
- Kunjara S, Greenbaum AL, McLean P, Gronbaek H, Flyvbjerg A. Effects of long-term experimental diabetes on adrenal gland growth and phosphoribosyl pyrophosphate formation in growth hormone-deficient dwarf rats. *Int J Exp Pathol* 2012; 93(3):196-201.
- Barber M, Kasturi BS, Austin ME, Patel KP, MohanKumar SMJ, MohanKumar PS. Diabetes-induced neuroendocrine changes in

مقایسه با گروه کنترل، در گروه دیابتی نوع یک حجم و تراکم نورنی به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش می‌یابد (نمودار ۳ و ۲). در زمینه تأثیر دیابت نوع یک و دو بر تراکم نورونی و حجم مدولای آدرنال، گزارشات منتشر شده متفاوت و بعضاً متناقض است (۳۳-۳۰، ۱). به‌عنوان نمونه نتایج مطالعه‌ای که بر روی رت‌های دیابتی نوع Wistar/BB انجام شده است حاکی از آن است که سطح کاتکول آمین‌های سرمی در هفته دوم، هشتم و شانزدهم پس از القای دیابت به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد (۳۲،۳۳). همچنین در مطالعه دیگری که در آن رابطه دیابت و تغییرات سطوح کاتکول آمین‌ها مورد بررسی قرار گرفته است نشان داده شده است که علاوه بر کاهش سطح اپی نفرین پلاسما سنتز اپی نفرین و نوراپی نفرین در سطح سمپاتوآدرنال نیز کاهش می‌یابد (۳۴). در مقابل در برخی از گزارشات دیگر بیان شده است که سطح کاتکول آمین‌ها در هفته دوازدهم پس از القای دیابت افزایش می‌یابد (۱،۳۱). در بیماران دیابتی نوع دو چاقی نیز خود عاملی است که موجب بروز مقاومت به انسولین و هیپرانسولینمی مزمن، که با عدم توازن اتونومیک مرتبط است، می‌شود. عدم توازن فعالیت سمپاتیک می‌تواند موجب افزایش سنتز و ترشح کاتکول آمین‌ها شود (۳۵). در عین

rats: role of brain monoamines, insulin and leptin. *Brain Research* 2003; 964: 128-132.

- Edwards JE, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacology & Therapeutics* 2008; 120: 1-34.
- Chan O, Inouye K, Riddell MC, Vranic M, Matthews SG. Diabetes and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Minerva Endocrinol* 2003; 28: 87-102.
- Margaret S, Narelle J, Jay Ives F, Christine L, Katherine M, Rohan I, et al.

- Prevalence of Structural Central Nervous System Abnormalities in Early-Onset Type 1 Diabetes Mellitus. *The Journal of Pediatrics* 2008; 153: 385–390.
7. Lincoln J, Shotton HR. Diabetic autonomic neuropathy. *Tzu Chi Medical* 2008; 20: 161-168.
 8. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetes neuropathy. *Endocrine Reviews* 2004; 25(4): 612-628.
 9. Marco GS, Colucci JA, Fernandes FB, Vio CP, Schor N, Casarini DE. Diabetes induces changes catecholamines in primary mesangial cells. *Biochemistry & Cell Biology* 2008; 40: 747-754.
 10. Guy DA, Sandoval D, Richardson MA, Tate D, Flakoll PJ, Davis SN. Differing physiological effects of epinephrine in type 1 diabetes and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288(1): 178-86.
 11. Jalal R, Bagheri SM, Moghimi A, Behnam-Rasuli M. Hypoglycemic effect of aqueous shallot and garlic extracts in rats with fructose-induced insulin resistance. *Clinical Biochemistry and Nutrition* 2007; 41: 218-223.
 12. Feletou M, Boulanger M, Staczek J, Broux O. Fructose diet and VEGF-induced plasma extravasation in hamster cheek pouch. *ActaPharmacol* 2003; 24: 207-211.
 13. Duncan MH, Singh BM, Wise PH, Carter G, Alagh band-zadeh J. A simple measure of insulin resistance. *Lancet* 1995; 346: 120-21.
 14. Enrica Pagtalunan M, Drachman J, Meyer T. Methods for estimating the volume of individual glomeruli. *Kidney international* 2000; 57: 2644–2649.
 15. Zahiri SH, Dezfoulian A, Panjeh-Shahin MR, Mambini M, Dehghani F. Study of stereological method in nephrotoxicity of Cisplatin, the anti-neoplastic drug, in male rats. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2003; 12 (37): 1-10.
 16. Stereo DC. The unbiased estimation of numberband sizes of arbitrary particles using the dissector. *Microscopy* 1984; 1: 127-136.
 17. Harno E, White A. Will treating diabetes with 11 β -HSD1 inhibitors affect the HPA axis?. *Endocrinology & Metabolism* 2010; 21: 619–627.
 18. Inouye K, Chan O, Riddell MC, Akirav E, Matthews SG, Vranic M. Mechanisms of impaired hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) function in diabetes: reduced counterregulatory responsiveness to hypoglycaemia. *DiabetesNutrMetab* 2002; 15: 348-55.
 19. Noguchi S, Ohno Y, Aoki N. Adrenocortical insufficiency in otsuka long-evanstockushima fatty rats a type 2 diabetes mellitus model. *Metabolism* 2007; 56: 1326-1333.
 20. Dullaart RP, Ubels FL, Hoogenberg K, Smit AJ, Pratt JJ, Muntinga JH, et al. Alterations in cortisol metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus: relationship with metabolic control and estimated blood volume and effect of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Clinical Endocrinology & Metabolism* 1995; 80: 3002-3008.
 21. Chiodini I, Adda G, Scillitani A, Coletti F, Morelli V, Dilembo S, et al . Cortisol Secretion in Patients with Type 2 Diabetes:

- relationship with chronic complications. *Diabetes Care* 2007; 30: 83-88.
22. Revsin Y, Wijk D, Saravia FE, Oitzl MS. Adrenal hypersensitivity precedes chronic hypercorticism in streptozotocin-induced diabetes mice. *Endocrinology* 2008; 149: 3531-3539.
 23. Biessels GJ, Van der heide LP, Kamal A, Bleys RL, Gispen WH. Ageing and diabetes: implications for brain function. *EurPharmacol* 2002; 441: 1-14.
 24. Golden SH, Malhotra S, Wand GS, Brancati FL, Ford D, Ford D, Horton K. Adrenal gland volume and dexamethasone-suppressed cortisol correlate with total daily salivary cortisol in African-American women. *Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007; 92: 1358-1363.
 25. Saravia F, Gonzalez S, Roig P, Alves V, Homo-delarche F, De nicola AF. Diabetes increases the expression of hypothalamic neuropeptides in a spontaneous model of type I diabetes, the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Cell MolNeurobiol* 2001; 21:15-27.
 26. Ganesh T, Saikat S, Thamocharan G, Loganathan T. Pharmacognostic and anti-hyperglycemic evaluation of lantana camara (L.) var. aculeate leaves in alloxan-induced hyperglycemic rats. *Int J Res Pharm Sci* 2010; 1: 247-252.
 27. Bisht S, Sisodia SS. Anti-hyperglycemic and antidyslipidemic potential of azadirachtaindica leaf extract in STZ-Induced diabetes mellitus. *Pharm Sci Res* 2010; 2: 622-627.
 28. Olatunji LA, Okwusidi JI, Soladoye AO. Antidiabetic effect of Anacardiumoccidentale stem-bark in fructose-diabetic rats. *Pharmaceutical Biology* 2005; 43: 589-593.
 29. Daniele SM, Montenegro SM, Tarres MC, Picena JC, Martinez SM. The eSS rat, a nonobese model of disordered glucose and lipid metabolism and fatty liver. *Diabetology Metabolic Syndrom* 2010; 2: 2-15.
 30. Hoffman RP. Antecedent hypoglycemia does not alter increased epinephrine-induced lipolysis in type 1 diabetes mellitus. *Metabolism Clinical and Eperimental* 2006; 55: 371-380.
 31. Morrison JFB, Howarth FC, Sheen R. Catecholamines in the heart and adrenal gland Of the STZ-diabetic rat. *Physiology and Biochemistry* 2001; 109: 206-208.
 32. Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 2003; 26: 1553-79.
 33. Wilke RA, Hillard CJ. Decreased adrenal medullary catecholamine release in spontaneously diabetic BB-Wistar rats.Role of hypoglycemia. *Diabetes*1994; 43: 724-729.
 34. Gallego M, Izquierdo MJ, Setien R, Casis O, Casis E. Diabetes-induced biochemical changes in central and peripheral catecholaminergic systems. *Physiol Res* 2003; 52: 735-741.
 35. Kanaley JA, Baynard T, Franklin RM, Weinstock RS, Goulopoulou S, Carhart R, et al. The effects of glucose load and sympathetic challenge on autonomic function in obese women with and without type 2 diabetes mellitus. *Metabolism Clinical and Experimental* 2007; 56: 778-785.

36. Sun Shin Y, In Koo H, Jae Hoon S, Jung Hoon C, Choong Hyun L, Il Yong K, et al. Regulatory mechanism of hypothalamo-pituitary–adrenal (HPA) axis and neuronal changes after adrenalectomy in type 2 diabetes. *Journal of Chemical Neuroanatomy*; 2010: 130–139.
37. Gerald C, Erik N, Åke W, Erika J, Kerstin B, Tom B. Effects of intensified metabolic control on CNS function in type 2 diabetes. *Psychoneuroendocrinology* 2011; 36: 77–86.
38. Sima AAF. New insights into the metabolic and molecular basis for diabetic neuropathy. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 2445-2464.
39. Porojan M, Costin S, Poanta L, CerghizanA, Bottini P, Boschetti E, et al. Autonomic neuropathy and plasma catecholamine in patients with diabetes mellitus. *Rom J Intern Med* 2010; 48: 341-345.
40. Husebye ES, Winqvist O, Sundkvist G, Kampe O, Karlsson FA, et al. Autoantibodies against adrenal medulla in type 1 and type 2 diabetes mellitus: no evidence for an association with autonomic neuropathy. *Internal Medicine* 1996; 239: 139-146.

Effects of Type 1 and Type 2 Diabetes on Micro-Anatomical Changes of Adrenal Gland in Male Wistar Rats

Elahi-Moghaddam Z., M.Sc.^{1*}, Behnam-Rassouli M., Ph.D.², Mahdavi Shahri N., Ph.D.³, Khajouee E., M.Sc.¹, Hajinejad-Boshroue R., M.Sc.¹

1. Postgraduate of Animal Physiology, Biology Department, Faculty of Science, Islamic Azad University, North Tehran Branch

2. Professor of Animal Physiology, Biology Department, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3. Professor of Histology, Biology Department, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

* Corresponding author; e-mail: z.elahimoghaddam@yahoo.com

(Received: 4 Sep. 2012 Accepted: 20 Dec. 2012)

Abstract

Background & Aims: Changing the hormonal output of endocrine glands, diabetes leads to the occurrence of secondary metabolic disorders. Neuropathy, on the other hand, is the most common neurological complication of diabetes which affects the neuroendocrine system, in addition to peripheral and autonomic nervous system, contributing to exacerbation of disease severity. In this line, the present study was conducted to comparatively evaluate the effects of hyperglycemia, induced by experimental type 1 and type 2 diabetes, on micro-anatomical changes of adrenal gland in male Wistar rats.

Methods: Eighteen male Wistar rats were allocated into three groups including control (healthy), experimental type 1 diabetes (subcutaneous injection of 135mg/kg alloxan), and experimental type 2 diabetes (treated with drinking water containing 10% fructose for 8 weeks). Two months after the induction of both types of diabetes, levels of blood biochemical factors such as glucose, insulin, cortisol, triglycerides, cholesterol, LDL and HDL were measured. One of the adrenal glands was randomly removed from each rat and, following tissue preparation and staining, was evaluated in terms of structural changes of the adrenal cortex and medulla using stereological techniques.

Results: Serum biochemical and hormonal analysis indicated a significant difference in levels of glucose, triglycerides, insulin and cortisol between control and experimental groups. The results achieved by the evaluation of adrenal volume showed increased volume of adrenal cortex in type 1 and type 2 diabetes and also reduced volume and neuronal density of adrenal medulla in type 1 diabetes compared with control.

Conclusion: Due to increased activity of hypothalamic-pituitary-adrenal axis, enhanced ACTH secretion in diabetes-induced hyperglycemia leads to increased growth of adrenal cortex and secretion of adrenal hormones. Reduced volume and neuronal density of adrenal medulla in diabetic condition may be resulted from the development of abnormal metabolic pathways such as those in hyperglycemia-derived oxidative stress. Late incidence of structural and functional impairments in type 2 diabetes can be ascribed to occurrence rate of hyperglycemia and insulin resistance, and, thus, the disease complications largely depend on the disease duration.

Keywords: Type 1 diabetes, Type 2 diabetes, Adrenal, Rat