Original Article

The Effects of Liraglutide on In Vitro Fertilization in Mice Following Experimental Diabetes

Rafieh Khalili[1], *Shapour Hasanzadeh*[1*], *Ali Shalizar Jalali*[1], *Rasoul Shahrooze*[1], *Gholamreza Najafi*[2], *Mehdi Eimani*[3]

[1]*Department of Histology and Embryology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.*

[2]*Department of Anatomy and Embryology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.*

[3]*Department of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Shapour Hasanzadeh;
Department of Histology and Embryology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Email:
s.hasanzadeh@urmia.ac.ir
shprhasanzadeh487@gmail.com

Received: 5 Oct, 2019
Accepted: 2 Feb, 2020

Abstract

Background and Objectives: Diabetes mellitus has adverse effects on reproductive system. Antidiabetic drugs are likely to develop impairment of fertility. In this regard, the present study was conducted to investigate the adverse effects of antidiabetic drug liraglutide on *in vitro* fertilization.

Methods: A total of 48 adult female mice, were divided into 6 groups of 8 each, as follows: control group that did not receive the drug; non-diabetic group received liraglutide at a dose of 1.2 mg/kg BW; the non-diabetic group that was given liraglutide at a dose of 1.8 mg/kg BW; diabetic group that did not received liraglutide; diabetic group that received liraglutide at a dose of 1.2 mg/kg BW; and diabetic group that received that was given liraglutide at the dose of 1.8 mg/kg BW. Liraglutide was daily injected through subcutaneous route. After 35 days of treatment, the fertility potentials of the retrieved oocytes, was evaluated. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test.

Results: In the diabetic group, a significant decrease ($p < 0.05$), were observed in the number of oocytes, percentages of fertilization, percentages of two-cell, four-cell, morula, blastocysts, and hatched embryos compared to the control group. In both diabetic groups receiving the drug, there was a decrease in the aforementioned parameters, but compared to the untreated diabetic group, there was an increase in these parameters.

Conclusion: The results revealed that administration of liraglutide in diabetic mice improved fertility and increased the percentage of fertility and Embryos.

Keywords: Diabetes Mellitus, Experimental; Fertilization *in Vitro*; Liraglutide; Mice.

DOI: 10.29252/qums.14.1.51

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره چهاردهم، شماره اول، فروردین ۹۹
صفحه ۵۱ الی ۶۰

مقاله پژوهشی
(Original Article)

آثار لیراگلوتاید بر میزان باروری آزمایشگاهی موش‌های ماده سفید کوچک آزمایشگاهی متعاقب القای دیابت تجربی

رفیعه خلیلی[۱]، شاپور حسن‌زاده[۱*]، علی شالیزار جلالی[۱]، رسول شهروز[۱]، غلامرضا نجفی[۲]، مهدی ایمانی[۳]

[۱]گروه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

[۲]گروه آناتومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

[۳]گروه بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
شاپور حسن‌زاده؛ گروه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
s.hasanzadeh@urmia.ac.ir
shprhasanzadeh487@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: بیماری دیابت شیرین اثرات منفی بر دستگاه تولید مثل دارد. احتمال دارد داروهای ضد دیابت باعث اختلال در باروری شوند. در این ارتباط، پژوهش حاضر با هدف بررسی عوارض داروی ضد دیابت لیراگلوتاید (Liraglutide) بر لقاح آزمایشگاهی انجام شد.

روش بررسی: ۴۸ موش ماده بالغ به شش گروه هشت نفره تقسیم شدند که عبارت بودند از: گروه کنترل که دارو دریافت نکرد، گروه غیر دیابتی دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز ۱/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، گروه غیر دیابتی دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز ۱/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، گروه دیابتی بدون دریافت لیراگلوتاید، گروه دیابتی دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز ۱/۲ میلی‌گرم و گروه دیابتی دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز ۱/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن. لیراگلوتاید به صورت روزانه و به شکل زیر جلدی تزریق می‌گردید. توان باروری تخمک‌های گروه‌ها پس از ۳۵ روز دوره تیمار ارزیابی شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تعقیبی توکی تحلیل گردیدند.

یافته‌ها: در گروه دیابتی کاهش معناداری در تعداد اووسیت‌ها، درصد لقاح و درصد جنین‌های دو سلولی، چهار سلولی، مورولا، بلاستوسیست و هچ‌شده نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید ($P\leq۰/۰۵$). در هر دو گروه دیابتی دریافت‌کننده دارو نیز کاهش در پارامترهای مذکور وجود داشت؛ اما نسبت به گروه دیابتی درمان نشده، افزایش در پارامترهای مذکور مشاهده گردید ($P\leq۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که به‌کارگیری داروی لیراگلوتاید در موش‌های دیابتی موجب بهبود باروری و افزایش درصد لقاح و جنین‌های ایجاد شده می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: دیابت ملیتوس، تجربی؛ لقاح آزمایشگاهی، لیراگلوتاید، موش.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Khalili R, Hasanzadeh Sh, Shalizar Jalali A, Shahrooze R, Najafi Gh, Eimani M. The Effects of Liraglutide on In Vitro Fertilization in Mice Following Experimental Diabetes. Qom Univ Med Sci J 2020;14(1):51-60. [Full Text in Persian]

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مقدمه

دیابت شیرین یک بیماری با ایجاد اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی و پروتئین است که به دلیل فقدان ترشح انسولین یا کاهش حساسیت بافت‌ها به انسولین ایجاد می‌شود (۱).
براساس پژوهش‌های صورت‌گرفته، کاهش انسولین و متعاقب آن هیپرگلایسمی می‌تواند موجب کاهش فعالیت طبیعی گنادها (هیپوگنادیسم) و هورمون‌های جنسی گردد که در نهایت منجر به کاهش باروری در جانداران خواهد شد (۲).
شناخت اثرات منفی دیابت بر عملکرد تولید مثلی از آن جهت که شمار زنان جوان دیابتی رو به افزایش می‌باشد، اهمیت زیادی دارد. با توجه به محدود بودن جمعیت سلول‌های جنسی در تخمدان‌ها ممکن است کنترل دیابت یکی از راه‌های درمان ناباروری در زنان باشد (۳). انجمن دیابت آمریکا
(ADA: American Diabetes Association) ابتدا متفورمین را برای درمان دیابت نوع دو توصیه نمود. در خط دوم درمان، اغلب انسولین به همراه متفورمین مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). طی چند سال گذشته داروهای جدیدی برای درمان بیماران دیابتی معرفی شده است که در میان آن‌ها انسولین و متفورمین به اندازه کافی موفق نبوده‌اند. داروی لیراگلوتاید که در سال ۲۰۱۰ از سوی سازمان غذا و دارو جهت درمان دیابت نوع دو با تیمار روزانه مورد تأیید قرار گرفت، از آگونیست‌های طولانی اثر برای رسپتورهای GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) می‌باشد (۵).
GLP- 1 از ترشحات درون‌ریز بوده و به عنوان پپتید محرک ترشح انسولین وابسته به گلوکز شناخته شده است و تقریباً ۷۰-۵۰ درصد از ترشح انسولین پس از غذا را موجب می‌شود (۷،۶).
به نظر می‌رسد داروی لیراگلوتاید به عنوان یک آگونیست GLP-1R در درمان بیماری دیابت با سه مکانیسم اثرگذار می‌باشد. به طور خلاصه، این دارو با تحریک ترشح انسولین و آزادسازی آن توسط سلول‌های β پانکراس، ممانعت از آزادسازی گلوکاگون و آهسته نمودن جذب گلوکز به داخل جریان خون باعث کنترل گلوکز در جریان خون می‌شود (۸).
لیراگلوتاید با نام تجاری "ویکتوزا" عرضه شده و دارای ۹۷ درصد تشابه توالی آمینو اسیدی با GLP-1 می‌باشد. این دارو به صورت یک بار تزریق در روز تا دوز ۱/۸ میلی‌گرم برای درمان دیابت و نیز درمان چاقی‌های مزمن مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹).
در این راستا، نتایج پژوهش تخصصی Maiorino و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که درمان‌های ترکیبی دیابت که انسولین پایه به همراه آگونیست‌های GLP-1R (لیراگلوتاید) می‌باشد، در کنار کنترل قند خون در مقایسه با رژیم‌های انسولین بدون آگونیست‌های GLP-1R، هیپوگلایسمی کمتری ایجاد نموده و باعث کاهش وزن می‌شود (۱۰).
از مزایای دیگر لیراگلوتاید این است که بر خلاف حالت آزاد که به وسیله پپتیدازهای آندوژن تخریب می‌شود، به میزان ۹۹ درصد به آلبومین پلاسما متصل بوده و در برابر عملکرد آنزیم‌ها مقاوم می‌باشد. علاوه‌براین، دارای نیمه عمر ۱۳ ساعت بوده و پس از ۱۴-۱۰ ساعت پس از مصرف به حداکثر غلظت خود می‌رسد. پس از آن متابولیزه شده و از بدن حذف می‌گردد (۱۲،۱۱).
باید توجه داشت که انتخاب داروی کنترل بیماری دیابت از اهمیت بالایی برخوردار است؛ زیرا احتمال دارد خود دارو باعث ایجاد اختلال در باروری شود. با توجه به اینکه تاکنون مطالعات اندکی در زمینه بررسی اثرات داروهای آگونیست GLP-1R بر سیستم تولید مثل جنس ماده مبتلا به دیابت صورت گرفته و مطالعات جامع در زمینه لقاح آزمایشگاهی اندک می‌باشد، در پژوهش حاضر به بررسی اثرات لیراگلوتاید به عنوان آگونیست GLP-1R بر شاخص‌های باروری و لقاح آزمایشگاهی در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی مبتلا به دیابت تجربی پرداخته شد.

روش بررسی

به منظور انجام این مطالعه، لیراگلوتاید از شرکت (Dnmark، DK-2880 Bagsvaerd، NovoAlle، A/S، Novonordisk) و استرپتوزوتوسین از شرکت (Germany، 49.7329.970، Sigma Chemical Co. P.O 1120.89552 Steinneim) تهیه شد.

گروه‌بندی حیوانات: در این مطالعه از ۴۸ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی بالغ ماده
NMRI (Nawal Medical esearch Institute) ۱۰ هفته‌ای در

International License Creative Commons Attribution License 4.0

محدوده وزنی ۲۵ تا ۳۰ گرم تهیه شده از مرکز معتبر پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی استفاده گردید. در این مطالعه تمامی مقرارت مرتبط با حیوانات براساس رعایت اصول رفتار انسانی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق رفتار با حیوانات در تحقیقات دانشگاه ارومیه (IR-UU- AEC-580/2019) صورت گرفت.

حیوانات طی مطالعه با شرایط تغذیه‌ای یکسان، دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند و سیکل روشنایی ۱۲ ساعت نور- ۱۲ ساعت تاریکی، شرایط تهویه مناسب براساس پروتکل اخلاقی و حمایت از حیوانات آزمایشگاهی برای تمام آن‌ها رعایت گردید. متعاقب یک هفته سازگاری با شرایط محیط، موش‌ها به صورت تصادفی در شش گروه هشت نفره جای گرفتند که عبارت بودند از: گروه کنترل غیر دیابتی (Control) که دارو دریافت نکردند و روزانه ۰/۱ سی‌سی نرمال سالین استریل را به صورت زیرجلدی دریافت نمود، گروه غیر دیابتی یا گروه Liraglutide-1 که دارو را با دوز ۱/۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمود، گروه غیر دیابتی یا گروه Liraglutide-2 که دارو را با دوز ۱/۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمود، گروه آزمایشی دیابتی (Diabetic-Control) که موش‌های دیابتی شده بدون درمان با لیراگلوتاید بودند، گروه آزمایشی دیابتی دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز پایین و گروه Diabetic-Liraglutide-1 دریافت‌کننده دارو با دوز ۱/۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن. در گروه حیوانات آزمایشی دیابتی دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز بالا یا گروه Diabetic-Liraglutide-2، موش‌های دیابتی شده دارو را با دوز ۱/۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند (۱۳). شایان ذکر است که مدت تیمار پنج هفته بود و لیراگلوتاید به صورت روزانه و زیرجلدی تزریق گردید.

روش ایجاد تجربی دیابت: روش ایجاد دیابت تجربی در گروه‌های دیابتی و دیابتی تحت درمان، به‌کارگیری استرپتوزوتوسین (STZ: Streptozotocin) با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن محلول در سیترات بافر ۲۰ میلی‌مولار (IACUC: The Institutional Animal Care and Use Committee) از راه تزریق داخل صفاقی بود.

تأیید دیابت به دنبال صرف غذا و ۱۸ ساعت پس از تزریق از طریق سوراخ کردن دم (Tail puncture) به وسیله گلوکومتر (Beurer medical ،Art. Nr.461.10 ،89077 ULM Germany) صورت گرفت. موش‌هایی که قند خون آن‌ها به صورت پایدار معادل ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر خون و بالاتر بود، به عنوان موش‌های دیابتی در نظر گرفته شده و مورد مطالعه قرار گرفتند.

استحصال اسپرم از دم اپیدیدیم: برای اسپرم‌گیری از موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی نر بالغ هشت هفته‌ای و سالم استفاده شد. برای آسان‌کشی ابتدا موش‌ها با استفاده از ترکیب کتامین با دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و زایلازین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند و سپس با استفاده از جابه‌جایی مهره‌های گردن آسان‌کشی گردیدند. پس از استریل کردن پوست ناحیه شکمی با اتانول ۷۰ درصد و ایجاد برش در ناحیه شکم، دم اپیدیدیم از بیضه جدا شد و درون میکروتیوب حاوی ۱ سی‌سی محیط کشت HTF (Human Tubal Factor) قرار گرفت. پس از آنکه دم اپیدیدیم در داخل محیط کشت به قطعات کوچک تقسیم گردید، به مدت ۳۰ دقیقه درون محیط کشت در انکوباتوری با CO_2 ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا خروج اسپرم‌ها از اپیدیدیم انجام شود. اسپرم‌های متحرک با استفاده از روش شناورسازی جدا گردیدند و به منظور ظرفیت‌یابی به مدت یک ساعت در انکوباتوری با CO_2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (۱۴).

تخمک‌گیری و لقاح داخل آزمایشگاهی: به منظور القای سوپراوولاسیون، هریک از موش‌های ماده بالغ، ۱۰ واحد بین‌المللی (IU: *International unit*) هورمون گنادوتروپین جفت انسان یا HCG (Human Chorionic Gonadotropin) (شرکت سیگما) را به صورت داخل صفاقی، ۴۸ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی ۱۰ واحد بین‌المللی گنادوتروپین مادیان آبستن یا PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) (شرکت فولیگون، هلند) دریافت نمود. ۱۰ الی ۱۲ ساعت پس از تزریق HCG (۱۵)، بعد از بیهوشی موش‌های ماده با کتامین و زایلازین و آسان‌کشی، لوله‌های رحمی جدا گردید و داخل محیط کشت HTF با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

تخمک‌گیری از ناحیه آمپول لوله رحمی به روش شکافتن و با استفاده از سرنگ انسولین گیج ۳۰ صورت گرفت و تخمک‌های حاوی توده کومولوسی (Cumulus Oophorus Cells-COCs) پس از شستشو با محیط کشت HTF به قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF منتقل شدند. اسپرم‌های جدا شده پس از طی روند ظرفیت‌یابی به طور مجزا به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت به قطرات لقاح اضافه گردیدند. عمل لقاح حدود ۶-۴ ساعت پس از اضافه کردن اسپرم با مشاهده دو پیش هسته نر و ماده مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶). زیگوت‌ها پس از شستشو به محیط کشت تازه‌ای که از قبل به تعادل رسیده بود، انتقال یافتند. ۲۴ ساعت بعد از لقاح، درصد جنین‌های دو سلولی و ۱۲۰-۹۶ ساعت پس از آن، درصد جنین‌های چهار سلولی، بلاستوسیست‌های ایجاد شده، جنین‌های هچ شده و جنین‌های متوقف شده در هر گروه رکوردگیری شد و مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷).

در انتها، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند و مقایسه بین گروه‌ها از طریق آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون‌های مقایسه‌ای چندگانه توکی صورت گرفت. سطح معناداری بین گروه‌ها معادل (P≤۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج تعداد اووسیت‌های اخذ شده: بر مبنای نتایج مشخص گردید که تعداد اووسیت‌های حاوی توده کومولوسی (COCs) اخذ شده در گروه‌های دریافت‌کننده داروی لیراگلوتاید کاهش یافته است که این کاهش وابسته به دوز می‌باشد؛ به طوری که در گروه دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز بالا، کاهش در تعداد اووسیت‌های حاوی توده کومولوسی بیشتر از گروه دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز پایین بوده است؛ اما این اختلاف معنادار نمی‌باشد (P>۰/۰۵).

همچنین در گروه دیابتی کاهش قابل توجهی در میزان اووسیت‌های اخذ شده از آمپول اویداکت مشاهده گردید که در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معناداری را نشان داد (P≤۰/۰۵).

در گروه‌های دیابتی دریافت‌کننده داروی لیراگلوتاید نیز افزایش در تعداد اووسیت‌های بالغ مشاهده گردید؛ اما هیچ‌گونه اختلاف معناداری در مقایسه با گروه دیابتی و گروه‌های دریافت‌کننده داروی لیراگلوتاید با دوز پایین و بالا به دست نیامد (شکل ۱).

میانگین درصد لقاح (زیگوت): همان طور که مشاهده می‌شود (جدول ۱)، درصد لقاح در گروه‌های دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز بالا و پایین و نیز در گروه دیابتی کاهش یافته است؛ اما هیچ‌گونه اختلاف معناداری بین این گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل وجود ندارد (P>۰/۰۵). از سوی دیگر در موش‌های دیابتی دریافت‌کننده لیراگلوتاید با هر دو دوز بالا و پایین با وجود افزایش در میزان درصد لقاح، اختلاف معناداری در مقایسه با گروه دیابتی مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل ۱).

نتایج مربوط به جنین‌های مرحله دو سلولی: در این مطالعه نشان داده شد که در گروه‌های دریافت‌کننده داروی لیراگلوتاید با هر دو دوز بالا و پایین، درصد جنین‌های دو سلولی کاهش یافته است؛ اما اختلاف معناداری در مقایسه با گروه کنترل وجود ندارد (P>۰/۰۵). بر مبنای نتایج کاهش در تعداد جنین‌های دو سلولی در موش‌های دیابتی، اختلاف معناداری با گروه‌های کنترل و دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز بالا و پایین داشت (P≤۰/۰۵). همچنین در موش‌های دیابتی دریافت‌کننده داروی لیراگلوتاید در هر دو دوز بالا و پایین، افزایش در تعداد جنین‌های دو سلولی مشاهده شد که این افزایش هیچ‌گونه اختلاف معناداری را نسبت به گروه دیابتی نشان نداد (P>۰/۰۵). شایان ذکر است که در هر دو گروه دیابتی دریافت‌کننده دارو با دوز بالا و پایین در مقایسه با گروه کنترل، اختلاف معناداری مشاهده گردید (P≤۰/۵۰) (شکل ۱).

نتایج مربوط به جنین‌های مرحله چهار سلولی و مورولا: آنالیز داده‌های مربوط به جنین‌ها در جدول ۱ نشان می‌دهد که کاهش درصد جنین‌های چهار سلولی و مورولا در گروه دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز بالا و گروه دیابتی، حاکی از اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد (P≤۰/۵۰). در این مطالعه مشاهده شد که در گروه‌های دیابتی دریافت‌کننده لیراگلوتاید با هر دو دوز پایین و بالا، افزایش معناداری در تعداد جنین‌های چهار سلولی و مورولا در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد (P≤۰/۰۵)؛ اما هیچ‌گونه اختلاف معناداری بین گروه‌های دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز پایین و بالا و همچنین گروه‌های

International License Creative Commons Attribution License 4.0

دیابتی دریافت‌کننده داروی لیراگلوتاید با دوز پایین و بالا در مقایسه با گروه دیابتی مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل ۱).

نتایج مربوط به جنین‌های مرحله بلاستوسیست و هچ شده: بر مبنای نتایج مشخص گردید که رشد جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیست در گروه‌های دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز پایین و بالا و همچنین در گروه دیابتی کاهش یافته است که این کاهش در هر سه گروه، اختلاف معناداری را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد (P≤۰/۰۵)؛ اما هیچ‌گونه اختلاف معناداری بین دو گروه دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز پایین و بالا مشاهده نشد (P>۰/۰۵). بین گروه‌های دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز پایین و بالا با گروه دیابتی نیز اختلاف معناداری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵) (شکل ۱).

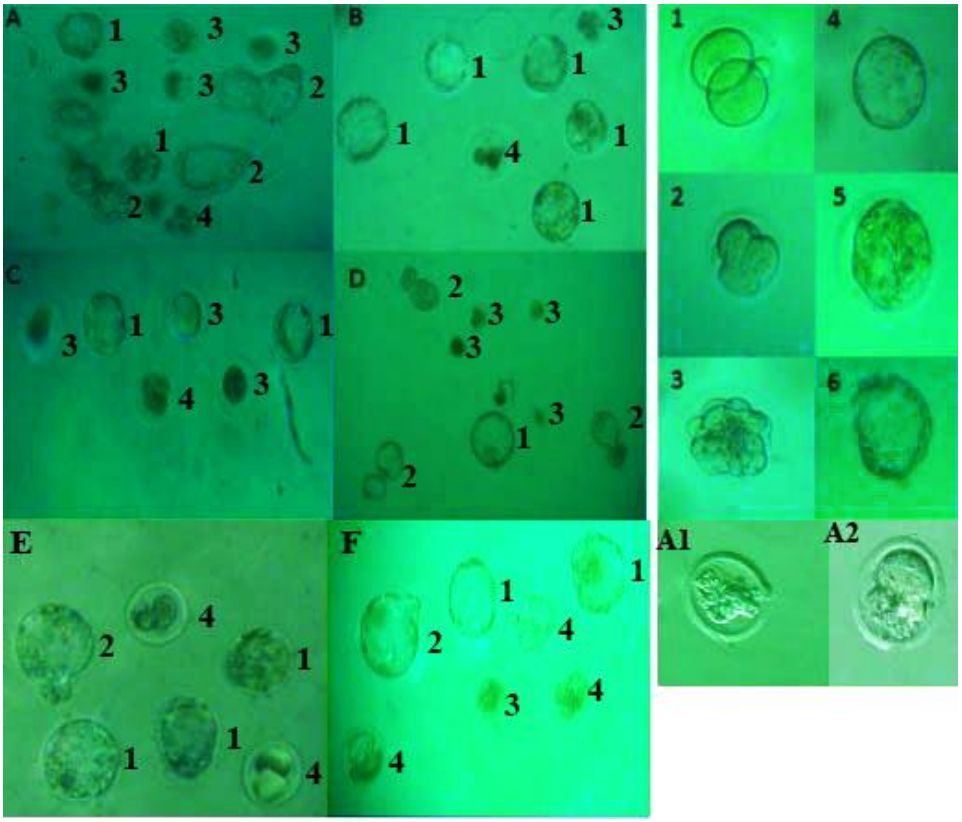
نتایج مربوط به جنین‌های متوقف شده: همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، جنین‌های متوقف شده در گروه‌های دریافت‌کننده داروی لیراگلوتاید با دوز پایین و بالا و گروه دیابتی افزایش یافته و اختلاف معناداری با گروه کنترل دارد (P≤۰/۰۵). همچنین جنین‌های متوقف شده در موش‌های دیابتی دریافت‌کننده داروی لیراگلوتاید در هر دو دوز کاهش یافته است و اختلاف معناداری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می‌شود (P≤۰/۰۵). در این مطالعه هیچ‌گونه اختلاف معناداری بین موش‌های دریافت‌کننده لیراگلوتاید با دوز پایین و بالا مشاهده نشد (P>۰/۰۵). کاهش در تعداد جنین‌های متوقف شده در گروه دیابتی نیز هیچ‌گونه اختلاف معناداری را در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده داروی لیراگلوتاید با دوز پایین و دوز بالا نشان نداد (شکل ۱).

جدول شماره ۱: مقایسه درصد اووسیت‌های حاوی توده کومولوسی، درصد زیگوت، جنین‌های دو سلولی و چهار سلولی، مورولاها، بلاستوسیست‌ها، جنین‌های هچ شده و جنین‌های متوقف شده در گروه‌های مختلف آزمایشی (M±SE)

گروه‌های آزمایشی	اووسیت‌های حاوی توده کومولوسی	سلول‌های زیگوت (درصد)	جنین‌های دو سلولی (درصد)	جنین‌های چهار سلولی (درصد)	مورولا (درصد)	بلاستوسیست‌ها (درصد)	جنین‌های هچ شده (درصد)	جنین‌های متوقف شده (درصد)
کنترل	۳۱/۲۵±۲/۶۵	۸۱/۵۵±۲/۰۹	۸۱/۶۴±۳/۲۵	۷۳/۵۵±۳/۲۲	۶۵/۷۸±۴/۴۰	۵۹/۲۳±۴/۲۹	۴۵/۲۲±۱/۹۴	۲۷/۵۶±۳/۹۳
لیراگلوتاید ۱	۲۵/۰۰±۲/۶۴	۷۸/۰۹±۵/۹۴	۷۵/۶۵±۳/۴۹	۶۶/۲۷±۱/۲۵	۴۹/۶۹±۱/۹۶	۲۸/۳۹±۱/۷۳[a]	۱۱/۸۴±۶/۷۹[a]	۶۲/۱۰±۳/۹۵[a]
لیراگلوتاید ۲	۲۰/۳۳±۲/۷۲	۷۳/۶۸±۰/۶۸	۷۵/۱۶±۱/۴۶	۵۷/۳۰±۱/۹۶[a]	۴۶/۴۰±۱/۸۶[a]	۳۳/۴۱±۴/۲۶[a]	۵/۷۸±۳/۲۱[a]	۵۵/۵۵±۵/۵۵[a]
دیابتی	۱۶/۰۰±۳/۰۰[b]	۶۳/۵۶±۵/۶۷	۵۵/۰۴±۰/۵۰[b]	۵۰/۵۰±۵/۰۵[b]	۴۰/۴۰±۴/۰۴[b]	۲۴/۷۴±۲/۵۲[b]	۰/۰۰±۰/۰۰[b]	۵۵/۰۰±۵/۰۰[b]
دیابتی لیراگلوتاید ۱	۲۲/۰۰±۱/۵۲	۶۸/۱۴±۱/۸۵	۶۴/۲۹±۱/۴۹[c]	۵۳/۳۷±۰/۲۶	۴۲/۷۰±۳/۷۰	۲۸/۶۰±۲/۹۸	۰/۰۰±۰/۰۰	۵۵/۶۸±۳/۶۵
دیابتی لیراگلوتاید ۲	۲۵/۳۳±۱/۲۰	۷۰/۰۵±۴/۸۳	۶۵/۵۳±۵/۰۶[c]	۵۴/۳۸±۴/۳۸	۴۳/۳۳±۲/۴۵	۳۲/۲۸±۲/۸۳	۰/۰۰±۰/۰۰	۵۷/۷۳±۰/۵۹

حرف a در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنادار گروه‌های لیرا ۱ و لیرا ۲ با گروه کنترل می‌باشد؛ حرف b در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنادار گروه دیابتی با گروه کنترل می‌باشد؛ حرف c نشان‌دهنده اختلاف معنادار گروه دیابتی با گروه‌های لیرا ۱ و لیرا ۲ می‌باشد.

International License Creative Commons Attribution License 4.0



شکل شماره ۱: جنین‌ها در مراحل مختلف رشد در روز پنجم پس از لقاح (۱. بلاستوسیت، ۲. جنین‌های در حال هچ‌شدن، ۳. اووسیت‌های بارور نشده، ٤. جنین‌های متوقف شده در مراحل مختلف رشد) در گروه‌های مورد مطالعه شامل: گروه کنترل (A)، گروه لیراگلوتاید ۲ (B)، گروه دیابتی (C)، گروه لیراگلوتاید ۱ (D)، گروه دیابتی با لیراگلوتاید ۱ (E) و گروه دیابتی با لیراگلوتاید ۲ (F) (درشت‌نمایی X ۲۰۰)

***در سمت راست شکل، جنین دو سلولی سالم (۱)، جنین چهار سلولی سالم (۲)، مورولا (۳)، بلاستوسیست (٤،٥)، جنین هچ‌شده (٦) و جنین‌های متوقف شده (A2،A1) مشاهده می‌شوند.**

بحث

بیماری دیابت به عنوان یک اختلال متابولیک، ساختار و عملکرد دستگاه‌های مختلف بدن از جمله دستگاه تولید مثل را مختل می‌کند (۱۹،۱۸). در سال‌های اخیر براساس تحقیقات صورت‌گرفته در ارتباط با دستگاه تولید مثل مشخص شده است که بین ناباروری و بیماری دیابت نوع دو ارتباط وجود دارد (۲۰). در مردان به دنبال درگیری فرد با بیماری دیابت، تغییرات غیر طبیعی در شاخص‌های باروری ظاهر می‌گردد. این تغییرات شامل: کیفیت پایین اسپرم‌ها از جمله کاهش تعداد، کاهش حرکت، حرکات غیر طبیعی و آثار بدشکلی ظاهری اسپرم‌ها می‌باشد (۲۱). روشن است که هرکدام از پارامترهای مذکور، تأثیر منفی بر توان باروری فرد مبتلا خواهد داشت.

در پژوهشی به خوبی نشان داده شده است که کیفیت اسپرم از نظر توان زنده‌مانی و کیفیت محتوای DNA می‌تواند در سطح قابل توجهی میزان باروری را تحت تأثیر قرار دهد (۲۲). تغییرات متابولیک ناشی از هیپرگلایسمی که می‌تواند باعث شکست DNA سلولی شود، دلیلی بر کاهش لقاح در گروه‌های دیابتی می‌باشد.

در جنس ماده پس از بلوغ جنسی، تخمدان‌ها فعالیت خود را در جهت آزادسازی اووسیت‌های رسیده سالم برای لقاح و تولید جنین آغاز می‌کنند. محور هیپوتالاموسی- هیپوفیزی- گنادی (HHGA Hypothalamo-Hypophyseal- Gonadal Axis) نقشی کلیدی را در این راستا بازی می‌کند. هرگونه اختلال در عملکرد این محور، فیزیولوژی طبیعی آن را مختل نموده و موجب قطع آزادسازی اووسیت‌ها می‌شود و یا اووسیت‌های غیر طبیعی و آسیب‌دیده را آزاد می‌کند که این امر ممکن است در برخی از بیماری‌ها از جمله دیابت رخ دهد. در پژوهش حاضر اثرات داروی لیراگلوتاید بر میزان باروری آزمایشگاهی موش‌های ماده از طریق القای دیابت تجربی مورد بررسی قرار گرفت.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

اهدافی که در این مطالعه پیگیری شدند عبارت بودند از: آثار دیابت بر لقاح آزمایشگاهی و نیز آثار لیراگلوتاید بر تولید بلاستوسیست‌ها در موش‌های ماده دیابتی.

لیراگلوتاید (Victoza) یکی از داروهای رده آگونیست GLP-1R است که در درمان دیابت به کار برده می‌شود. این دارو در سال ۲۰۰۹ در اروپا مورد تأیید قرار گرفت و از چند سال گذشته وارد برنامه‌های کنترل و درمان بیماری دیابت در ایران شده است که به نظر می‌رسد آثار آن در تولید مثل جنسی نر و ماده حائز اهمیت باشد.

در این مطالعه برای شناسایی اثرات لیراگلوتاید بر توان باروری، لقاح آزمایشگاهی در موش سوری مورد بررسی قرار گرفت. مدل تجربی القای دیابت به وسیله استرپتوزوتوسین به طور متداول در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته و تغییرات سیستم تولید مثل به عنوان بخشی از بیماری دیابت را توضیح می‌دهد.

مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که دیابت در زنان موجب اختلال در عملکرد تخمدان‌ها از جمله تغییر در چرخه جنسی، رشد فولیکولی، بلوغ اووسیت‌ها و کاهش یا عدم تخمک‌گذاری می‌گردد (۱۸،۱۹). علاوه بر موارد مذکور موجب کاهش جسم زرد و ایجاد فولیکول‌های آترتیک می‌شود (۱۹).

نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن بودند که در گروه‌های دیابتی، کاهش معناداری در تعداد اووسیت‌ها، درصد لقاح، درصد جنین‌های دو سلولی و چهارسلولی، بلاستوسیست، مورولا و هچ شده نسبت به گروه کنترل رخ داده است. در گروه‌های دیابتی تحت درمان با لیراگلوتاید، افزایش در پارامترهای مذکور مشاهده گردید. اطلاعات حیوانی جدید پیشنهاد می‌کنند که لیراگلوتاید نقش تنظیمی را در محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- تخمدان ایفا می‌کند و این کار را از طریق نوسانات در رهاسازی هورمون‌های آزادکننده گنادوتروپین از نوروآندوکرین‌ها انجام می‌دهد (۲۳). با توجه به اینکه لیراگلوتاید یک عامل حساس‌کننده انسولین بوده و از سوی دیگر عاملی است که در تنظیم محور هیپوتالاموسی- هیپوفیزی- تخمدانی (HPOA: Hypothalamus- Pituitary-Ovary Axis) از طریق تعدیل نوروآندوکرینی هورمون GnRH (Gonadotropin - releasing hormone) (هورمون آزادکننده گنادوتروپینی) نقش دارد (۲۳)، این احتمال وجود دارد که این محور در افراد مبتلا به دیابت مختل شده و چرخه جنسی و همچنین اووژنز دچار مشکل گردد. از سوی دیگر، اووسیت‌های آزاد شده ممکن است دچار اختلالاتی باشند که باعث بروز مشکلات در فرایند لقاح گردند. مشخص شده است که لیراگلوتاید دارای اثرات تنظیمی بر محور هیپوتالاموسی- هیپوفیزی- تخمدانی می‌باشد (۲۲).

در گزارشی مشخص شده است که در افراد مبتلا به دیابت، کنترل بهینه گلیسمیک (قند خون) و جلوگیری از وخامت وضعیت دیابت موجب تنظیم بی‌نظمی‌های تولید مثلی و افزایش میزان باروری (نزدیک به حالت طبیعی) می‌گردد. چنین وضعیتی به دنبال تنظیم محور هیپوتالاموسی- هیپوفیزی- تخمدانی رخ می‌دهد. این احتمال وجود دارد که در افراد مبتلا به دیابت درمان شده با استفاده از لیراگلوتاید، چنین تنظیمی رخ دهد (۲۴). نتایج نشان داده‌اند که به دنبال القای دیابت تجربی در موش‌های صحرایی، تغییرات فوق ریزبینی در ساختار اووسیت‌ها ایجاد می‌شود. ساختارهایی که بیشتر تحت تأثیر دیابت قرار می‌گیرند، شامل: پرده شفاف و خود اووسیت فولیکول‌های تخمدانی می‌باشند. این تغییرات عباتند از نازک‌تر شدن پرده شفاف، چروکیده شدن اووسیت‌ها و کاهش تعداد میکروویلی‌های اووسیت و سلول‌های تاج شعاعی وارد شده به پرده شفاف میباشند. با توجه به اینکه پرده شفاف به طور عمده توسط اووسیت سنتز می‌گردد، نازک‌تر شدن آن مبین کاهش فعالیت زیستی اووسیت می‌باشد. از سوی دیگر، اتصالات منفذدار بین میکروویلی‌های اووسیت و سلول‌های تاج شعاعی در پرده شفاف، نقش مهمی در تغذیه و تکامل اووسیت دارند. بر این اساس در فولیکول‌های تخمدانی گروه دیابتی، کاهش معناداری در ضخامت پرده شفاف و تعداد میکروویلی‌های درون آن در واحد سطح رخ می‌دهد. در این راستا، نشان داده شده است که عوارض فوق در گروه‌های دیابتی درمان شده با متفورمین کمتر می‌باشد (۲۵). در ارتباط با تغییرات فوق ریزبینی ایجاد شده در اثر دیابت می‌توان به تغییر در میتوکندری‌ها شامل: کاهش تعداد آن‌ها، یکنواخت شدن ماتریکس، از بین رفتن تیغه‌های میتوکندریایی و نیز بالونی شدن آن‌ها در تعدادی از میتوکندری‌ها اشاره کرد؛ بنابراین در دیابت،

International License Creative Commons Attribution License 4.0

تغییرات تحلیلی در میتوکندری‌های اووسیت‌ها محتمل می‌باشد. نقص در میتوکندری‌ها موجب بر هم خوردن تعادل انرژی (تولید و ذخیره) گشته و اووسیت را در جهت از دست دادن کارایی خود پیش می‌برد (۲۶).

انتظار می‌رود به دنبال درمان با لیراگلوتاید، اختلالاتی که ذکر شد در افراد دیابتی کاهش یابد. یافته‌های پژوهش حاضر تا حدودی این موضوع را مورد تأیید قرار می‌دهند؛ زیرا در گروه‌های دیابتی درمان شده با لیراگلوتاید، برآیند و راندمان IVF (*In vitro fertilization*) بهتر شده است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد که در موش‌های ماده مبتلا به دیابت تجربی، تمامی پارامترهای باروری مورد مطالعه شامل: جمعیت تخمک‌های استحصالی، درصد لقاح، درصد رویان‌های دو سلولی، چهار سلولی، بلاستوسیست‌ها و رویان‌های هچ شده کاهش یافته است؛ اما تمامی پارامترهای باروری مذکور با به کارگیری داروی لیراگلوتاید در هر دوز پایین و بالا بهبود پیدا نموده است.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه دکتری تخصصی بوده و با مساعدت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه انجام شده است. بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و اعضای آزمایشگاه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی دانشکده دامپزشکی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1. Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. Philadelphia: Saunders; 2013. p. 96. Link

2. Codner E, Merino PM, Tena-Sempere M. Female reproduction and type 1 diabetes: from mechanisms to clinical findings. Hum Reprod Update 2012;18(5):568-85. PMID: 22709979

3. Wellons MF, Matthews JJ, Kim C. Ovarian aging in women with diabetes: an overview. Maturitas 2017;96:109-13. PMID: 28041589

4. Inman TR, Plyushko E, Austin NP, Johnson JL. The role of basal insulin and GLP-1 receptor agonist combination products in the management of type 2 diabetes. Ther Adv Endocrinol Metab 2018;9(5):151-5. PMID: 29796245

5. Parks M, Rosebraugh C. Weighing risks and benefits of liraglutide--the FDA's review of a new antidiabetic therapy. New Engl J Med 2010;362(9):774-7. PMID: 20164475

6. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. Gastroenterology 2007;132(6):2131-57. PMID: 17498508

7. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide-1. Physiol Rev 2007;87(4):1409-39. PMID: 17928588

8. Li PC, Liu LF, Jou MJ, Wang HK. The GLP-1 receptor agonists exendin-4 and liraglutide alleviate oxidative stress and cognitive and micturition deficits induced by middle cerebral artery occlusion in diabetic mice. BMC Neurosci 2016;17(1):37. PMID: 27296974

9. D'Alessio D, Häring HU, Charbonnel B, de Pablos-Velasco P, Candelas C, Dain MP, et al. Comparison of insulin glargine and liraglutide added to oral agents in patients with poorly controlled type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab 2015;17(2):170-8. PMID: 25359159

10. Maiorino M, Chiodini P, Bellastella G, Capuano A, Esposito K, Giugliano D. Insulin and glucagon-like peptide 1 receptor agonist combination therapy in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Diabetes Care 2017;40(4):614-24. PMID: 28325801

International License Creative Commons Attribution License 4.0

11. Pratley RE, Nauck M, Bailey T, Montanya E, Cuddihy R, Filetti S, et al. Liraglutide versus sitagliptin for patients with type 2 diabetes who did not have adequate glycaemic control with metformin: a 26-week, randomised, parallel-group, open-label trial. Lancet 2010;375(9724):1447-56. PMID: 20417856

12. Fadini GP, Avogaro A. Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: beyond GLP-1. Vascul Pharmacol 2011;55(1-3):10-6. PMID: 21664294

13. Product Monograph. Solution for injection in a pre-filled pen human glucagon like peptide-1 (GLP-1). Mississauga, Ontario: Novo Nordisk Canada Inc; 2017. Link

14. Babaei M, Najafi G, Jalali AS, Behfar M. Effects of unilateral iatrogenic vas deferens trauma on fertility: An experimental in vitro fertilization mice model study. Bull Emerg Trauma 2015;3(4):122-7. PMID: 27162916

15. Roghani M, Baluchnejadmojarad T. Antinociceptive effect of Allium schoenoprasum L. oral feeding in male diabetic rats. J Shahrekord Univ Med Sci 2011;12(4):64-70. Link

16. Ebadi Manas GE, Hasanzadeh S, Najafi G, Parivar K, Yaghmaei P. The effects of pyridaben pesticide on the DNA integrity of sperms and early in vitro embryonic development in mice. Iran J Reprod Med 2013;11(8):605-10. PMID: 24639796

17. Shalizar Jalali A, Najafi G, Hosseinchi M, Sedighnia A. Royal Jelly alleviates sperm toxicity and improves in vitro fertilization outcome in Stanozolol-treated mice. Iran J Reprod Med 2015;13(1):15-22. PMID: 25653671

18. Ballester J, Muñoz MC, Domínguez J, Palomo MJ, Rivera M, Rigau T, et al. Tungstate administration improves the sexual and reproductive function in female rats with streptozotocin-induced diabetes. Hum Reprod 2007;22(8):2128-35. PMID: 17588954

19. McLean MP, Warden KJ, Sandhoff TW, Irby RB, Hales DB. Altered ovarian sterol carrier protein expression in the pregnant streptozotocin-treated diabetic rat. Biol Reprod 1996;55(1):38-46. PMID: 8793056

20. Ding GL, Liu Y, Liu ME, Pan JX, Guo MX, Sheng JZ, et al. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. Asian J Androl 2015;17(6):948-53. PMID: 25814158

21. Hoang V, Bi J, Mohankumar SM, Vyas AK. Liraglutide improves hypertension and metabolic perturbation in a rat model of polycystic ovarian syndrome. PLoS One 2015;10(5):e0126119. PMID: 26010091

22. Salamun V, Jensterle M, Janez A, Bokal EV. Liraglutide increases IVF pregnancy rates in obese PCOS women with poor response to first-line reproductive treatments: a pilot randomized study. Eur J Endocrinol 2018;179(1):1-11. PMID: 29703793

23. Outeiriño-Iglesias V, Romaní-Pérez M, González-Matías LC, Vigo E, Mallo F. GLP-1 increases preovulatory LH source and the number of mature follicles, as well as synchronizing the onset of puberty in female rats. Endocrinology 2015;156(11):4226-37. PMID: 26252058

24. Livshits A, Seidman DS. Fertility issues in women with diabetes. Womens Health 2009;5(6):701-7. PMID: 19863473

25. Pournaghi P, Sadrkhanlou R, Hasanzadeh S, Farshid AA. The ultrastructural study of oocyte and zona pellucida in ovarian follicles of untreated and and metformin-treated diabetic rats subsequent to induction of experimental diabetes. Tehran Univ Med J 2011;69(6):366-73. Link

26. Ghadially FN. Ultrastructural pathology of the cell. 4th ed. Boston: Butterworths; 1997. p. 246-9. Link

International License Creative Commons Attribution License 4.0