Archive of SID

دوره ی دوم/ شماره ی ۲/ زمستان ۱۳۸۲

بررسی استریولوژیک آسینی سروزی و موکوسی غده ی تحت فکی در موش های صحرایی دیابتی نر و ماده

چکیده

مقدمه: خشکی دهان، یکی از عوارض دیابت شیرین است، که بررسی هایی محدود درباره ی تغییرات ریخت شناسی (مورفولوژی) آن انجام گرفته است. پژوهش کنونی اثرات دیابت را بر حجم آسینی سروزی و موکوسی غده ی تحت فکی موش های صحرایی (Rat) دیابتی نر وماده، در زمان های یک و سه ماه پس از آغاز دیابت بررسی می کند. **روش کار**: در آغاز، موش های صحرایی نر و ماده به دو گروه آزمایش و شاهد بخش شده و دیابت در گروه آزمایش، با تزریق استرپتوزوتوسین ایجاد گشت. در پایان هفته های چهارم و دوازدهم، غدد ی تحت فکی بیرون آورده شده، برش های تصادفی ایزوتروپیک به ضخامت پنج میکرومتر از آن فراهم گردید و میانگین حجم آسینی به صورت حجم بر پایه ی حجم ذره و به روش Point–Sampled Intercepts به دست آمد. **یافته ها:** حجم آسینی سروزی موش های دیابتی نر و ماده، پس از سه ماه کاهش یافته و در ماه نخست و یا در آسینی موکوسی تغییراتی مشاهده نگردید. همچنین، تفاوتی در حجم آسینی در میان دو جنس نر و ماده دیده نشد. **نتیجه:** پژوهش کنونی با کمک روش های استریولوژیک نشان می دهد که، دیابت شیرین باعث تغییرات ریخت شناسی، به صورت کاهش حجم در آسینی سروزی می شود، که بخش بیشتر برون ریز غده ی تحت فکی را تشکیل می دهد.

کلید واژه ها: دیابت شیرین، استریولوژی، غده ی تحت فکی، موش صحرایی، خشکی دهان

دکتر علی نورافشان،
دانشیار گروه علوم تشریحی،
دانشگاه علوم پزشکی شیراز

نویسنده مسوول:
دکتر علی نورافشان،
شیراز، دانشکده پزشکی،
بخش علوم تشریحی
تلفن: ۰۷۱۱-۲۳۰۴۳۷۲
E-mail:
noora@sums.ac.ir

مقدمه

خشکی دهان، یکی از عوارض دیابت شیرین بوده و نشان داده شده است که، افرادی که دیابت آنها کمتر مهار شده باشد، ممکن است به کاهش ترشح بزاق دچار شوند [۳-۱]. به نظر می رسد که، در ایجاد این امر مجموعه ای از عوامل گوناگون در سطح بافتی تا سطح مولکولی دخالت دارند. این عوامل عبارت هستند: تغییر در سوخت و ساز

www.SID.ir

Archive of SID

کلی بدن در طی دیابت، که خود به طور اولیه یا ثانویه، بر بافت های گوناگون، مانند غدد بزاقی اثر می گذارد [۴]، نارسایی در دستگاه اعصاب خودکار، که کنترل کننده ی ترشح غدد بزاقی هستند [۵]، تجمع پروتئین های ترشحی درون سلول و در پی آن، تغییرات تحلیل برنده ی سلول های واقع در آسینی بزاقی [۶]، تغییرات آسیب شناختی در غشای پایه ی آسینی، کاهش شمار گیرنده های موسکارینی در سطح سلول های آسینی و کاهش توانایی تولید cAMP در سلول های دیابتی [۴]. بیشتر بررسی های انجام شده در زمینه ی اثر دیابت بر غده بزاقی به جنبه های بیوشیمیایی، فیزیولوژی و آسیب شناسی [۸،۷] آن پرداخته، در حالی که، بررسی هایی محدود تغییرات ریخت شناسی و مورفومتریک ساختمان غدد بزاقی را بررسی کرده اند. در این بررسی ها به آسینی سروزی و موکوسی نیز، به تفکیک توجه شده و حجم آنها، به صورت حجم نسبی یا کلی بیان گردیده است. همچنین، میان دو جنس نر و ماده مقایسه ای انجام نگرفته است [۹]. این در حالی است که، در برخی موارد، مانند بیماری شوگرن (Sjogren)، غدد بزاقی در زنان بیشتر به آسیب دچار می شود [۱۰]. در حالی که، غدد بزاقی متعدد، مانند غده ی بناگوشی، زیر زبانی و غدد پراکنده در حفره ی دهانی، در ترشح بزاق نقش دارند، علت انتخاب غده ی زیر فکی، آن بود که هر دو گونه ی آسینی سروزی و موکوسی در آن یافت می شود. در پژوهش کنونی، میانگین حجم آسینی سروزی و موکوسی بر پایه ی حجم ذره، در غده تحت فکی موش های صحرایی دیابتی نر و ماده و در زمان های گوناگون از آغاز دیابت بررسی شده تا اثر دیابت بر هر دوگونه ی آسینی، دو جنس نر وماده و در زمان های گوناگون (یک و سه ماه پس از ایجاد دیابت) آشکار شود. بر پایه ی تعریف های استریولوژیک، میانگین حجم بر پایه ی حجم ذره (Volume-Weighted Mean Particle Volume) به این معناست که در برش های میکروسکوپی، یک ذره، در آغاز بر پایه ی کوچکی یا بزرگی سطح برش آن انتخاب شده و سپس، اندازه گیری می شود.

مواد و روش

شمار بیست سر موش صحرایی نر و بیست سر موش صحرایی ماده از نژاد Sprague–Dawley با دامنه ی وزنی ۲۲۰ تا ۲۸۰ گرم، به طور تصادفی انتخاب و به دو زیر گروه آزمایش و شاهد بخش شدند. دمای محیط و چرخه ی روشنایی و تاریکی محیط نگهداری آنها در مدت آزمایش ثابت نگه داشته شد. دیابت شیرین با تزریق درون صفاقی یک اندازه ی ٦٥ میلی گرم برای هر کیلو گرم وزن از داروی استرپتوزوتوسین (Streptozotocin) [۹] در گروه آزمایش ایجاد گشت. نمونه ی خون از سیاهرگ دمی پیش از ایجاد دیابت و نیز دو روز و دو هفته پس از آن گرفته شد تا وضعیت قند خون آنها

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی شود. قند خون در همه ی موش های دیابتی بیشتر از ۳۵۰ میلی گرم در دسی لیتر بود.

آماده سازی بافتی: جانداران با اتر بیهوش شده، به سرعت قفسه ی سینه آنها باز شد و از راه بطن چپ، ۵۰۰ میلی لیتر محلول بافر شده ی فرمالدیید (چهار درصد) در مدت ده دقیقه با فشار ۱۲۰ میلی متر جیوه به دستگاه گردش خون جاندار وارد شد. برای خروج خون و محلول، دهلیز راست جاندار نیز باز گردید. پس از ثبوت کامل بافت ها، غده بزاقی تحت فکی بیرون آورده شده و در همان محلول ثابت کننده گذاشته شد. بر پایه ی روش انتخاب قطعات بافتی به روش نمونه برداری تصادفی، هر غده، به قطعاتی در حدود ۲×۲×۲ میلی متر بخش شد. پنج قطعه، بر پایه ی روش نمونه برداری تصادفی منظم انتخاب و بافت در قالب پارافینی قرار داده شد. بر پایه ی بررسی های پیشین [۱۱]، این روش، موقعیت تصادفی و ایزوتروپی لازم برای محاسبات استریولوژیک را فراهم می سازد. سپس، برش های بافتی با ضخامت پنج میکرومتر فراهم شده و به روش " هایدن هاین آزان " (Heidenhain Azan) رنگ آمیزی گردید.

بررسی های استریولوژیک: پنج برش از هر غده انتخاب و به وسیله ی یک میکروسکوپ مجهز به صفحه ی بازتاب کننده (Projection) از گونه ی Visopan–Austria محاسبات انجام شد. در هر برش پنج ناحیه ی میکروسکوپی به صورت نمونه برداری تصادفی منظم با حرکت صفحه ی نگاه دارنده ی لام میکروسکوپ در جهت های X و Y، با کمک مقیاس های درج شده در لبه های صفحه ی میکروسکوپ و در بزرگ نمایی نهایی ۵۰۰، انتخاب شده و محاسبات صورت گرفت. برای انتخاب ذرات (آسینی) در هر میدان میکروسکوپی یک دستگاه آزمون نقطه – خط (Point–line Test System) قرار داده شد [۱۳،۱۲] و آسینی هایی که، نقاط به طور تصادفی روی آنها قرار گرفته، انتخاب شده و قطاع l_0 (Intercepts) آنها را اندازه گیری کرده و با کمک فرمول $V_v = \frac{\pi}{3} \cdot \overline{l_o^3}$ ، میانگین حجم بر پایه ی حجم ذره محاسبه گردید.

واکاوی آماری: برای مقایسه متغیرهای دوگروه در سطح $p<۰/۰۵$ از آزمون Mann–Whitney U بهره جویی گردید.

یافته ها

میانگین حجم آسینی سروزی و موکوسی در موش های صحرایی نر و ماده در پایان ماه های نخست و سوم از آغاز دیابت محاسبه گردید، که یافته های آن در جدول های ۱ و ۲ آورده شده است. یافته ها نشان می دهد که، میانگین حجم آسینی سروزی در ماه نخست، به گونه ای معنی دار کاهش نمی یابد (در حدود ۲۵ درصد در جانداران نر و ۱۸ درصد در جانداران ماده) و میانگین حجم آسینی موکوسی، حتی در پایان ماه سوم نیز، تغییر نمی کند، اما در پایان ماه سوم، میانگین حجم آسینی سروزی به گونه ای معنی دار

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: میانگین حجم (μm^3) بر مبنای حجم آسینی سروزی و موکوسی در موش های صحرایی دیابتی و شاهد نر و ماده یک ماه بعد از القاء دیابت

گروه های مورد بررسی	اجزاء	
	آسینی سروزی (μm^3)	آسینی موکوسی (μm^3)
شاهد نر	۳۲۴۱۵/۲۴ ± ۱۱۱۲۷/۴۷	۱۳۶۳۵۸/۷۶ ±۴۵۳۹۰/۱۴
آزمودنی نر	۲۴۱۷۳/۱۳± ۵۷۸۲/۰۹	۱۴۶۸۵۵/۶۳ ± ۳۶۷۸۰/۰۹
شاهد ماده	۳۷۵۱۸/۰۶ ± ۹۲۶۵/۳۱	۱۵۲۴۸۱/۳۰ ± ۳۵۷۱۱/۰۴
آزمودنی ماده	۳۰۴۳۷/۰۲ ± ۳۱۲۴/۹۹	۱۸۳۱۰۷/۷۴ ± ۵۰۰۷۱/۷۲

مقادیرفوق میانگین ± انحراف معیار می باشد.

کاهشی در حدود ۳۸ درصد ($p<۰/۰۰۱$) در موش های نر و ٤٤ درصد ($p<۰/۰۳$) در موش های ماده را نشان می دهند، که این تفاوت در میان دو جنس معنی دار نیست. یافته ی دیگر، که در این پژوهش دیده می شود، آن است که، با گذشت زمان، حجم آسینی سروزی و موکوسی، به طور میانگین، ۵۸ درصد ازماه نخست تا ماه سوم در جانداران شاهد نر افزایش می یابد ($p<۰/۰۱$)، اما در جانداران دیابتی نر، افزایش حجم در حدود ۳۱ درصد ($p<۰/۰۵$) است. در موش های صحرایی شاهد یا دیابتی ماده افزایش حجم، معنی دار نیست.

بحث

در این بررسی، روش Point–Sampled Intercepts برای آشکار ساختن اثر دیابت شیرین بر آسینی سروزی و موکوسی به کار رفت. این روش، یک راه کارآمد برای برآورد حجم، بر پایه ی حجم ساختارهای گوناگون است و به علت توانایی این روش در نشان دادن تغییرات در حجم اجزای بافت ها، در بررسی های استریولوژیک به کار می رود [۱۷-۱۴]. گرچه برخی پژوهشگران گزارش کرده اند که، آسینی موکوسی در طی دیابت، به وسیله لنفوسیت ها احاطه شده و تغییرات تخریبی در غده ی تحت فکی موش های دیابتی آغاز می شود [۱۸]، این بررسی نشان می دهد که، میانگین حجم آسینی موکوسی، تغییراتی معنی دار را، حتی پس از گذشت سه ماه از آغاز دیابت، نشان نمی دهد.

یافته ی اصلی این بررسی، بیانگر اثر دیابت بر آسینی سروزی موش های صحرایی نر و ماده پس از سه ماه است. آسینی سروزی بخش اصلی غده ی تحت فکی را تشکیل می دهد و اثر دیابت بر آنها، بیشتر از آسینی موکوسی است. این امر می تواند از سطوح گوناگون فعالیت سوخت و سازی یا انتشار نابرابر گیرنده های انسولین در این

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲: میانگین حجم بر مبنای حجم آسینی سروزی و موکوسی در موش های صحرایی دیابتی و شاهد نر و ماده سه ماه بعد از القاء دیابت

گروه های مورد بررسی	اجزاء	
	آسینی سروزی	آسینی موکوسی
شاهد نر	۵۱۳۹۶/۲۵ ± ۶۲۵۴/۱۸	۲۱۶۲۴۷/۸۸ ± ۳۹۲۵۶/۰۰
آزمودنی نر	۳۱۷۸۹/۲۵ ± ۲۵۱۱/۶۶ *	۱۹۴۸۲۴/۷۰ ± ۳۰۹۹۸/۳۰
شاهد ماده	۴۹۳۶۴/۷۶ ±۱۵۸۸۴/۲۷	۱۷۰۰۳۱/۱۰ ± ۳۱۴۱۰/۷۴
آزمودنی ماده	۲۷۲۶۷/۶۹ ± ۴۵۵۲/۱۱ **	۱۷۲۴۳۰/۷۷ ± ۴۸۹۸۰/۸۵۰

مقادیر فوق میانگین ± انحراف معیار می باشد

* گروه شاهد در مقابل گروه آزمودنی ($p<۰/۰۰۱$)

** گروه شاهد در مقابل گروه آزمودنی ($p<۰/۰۳$)

دو ساختار ناشی باشد. به نظر می رسد که در ایجاد این امر، مجموعه ای از عوامل گوناگون در سطح بافتی تا سطح مولکولی دخالت داشته باشند.

یافته های این پژوهش مبنی بر کاهش حجم آسینی سروزی پس از سه ماه از آغاز دیابت، با یافته های برخی پژوهشگران، که حجم مطلق کل آسینی سروزی و موکوسی را در طی دیابت محاسبه [۹] و کاهش حجم آنها را گزارش کرده اند، همخوانی دارد. گروهی نیز، گزارش کرده اند که، نسبت حجمی آسینی در دیابت افزایش می یابد [۱۹]. با توجه به گزارش های گوناگون محاسبه نسبت های حجمی ممکن است یافته ها را به خطایی به نام "Reference Trap" دچار کند، که در این وضعیت، نبود محاسبه ی حجم کل یک ساختار، باعث می شود تا افزایش یا کاهش نسبت ها، واقعی نباشند و بنابراین، برای دوری از این اشتباه، می بایست نسبت حجمی در حجم کل غده ضرب شود [۱۳،۱۲]، بنابراین، انتخاب روش حجم بر پایه ی حجم کل، روشی بهتر از محاسبه نسبت حجمی است و شاید بتوان بیشتر به این یافته ها اعتماد کرد.

بررسی های فراساختاری پژوهشگران نشان دهنده ی آن است که، تغییرات در سلول های آسینی شامل تجمع مواد ترشحی درون سیتوپلاسم است. در پی تجمع پروتئین های ترشحی، تغییرات تخریبی در سلول های آسینی انجام می گیرد، که باعث مرگ سلولی شده و در پایان، جایگزینی آنها با بافت همبند انجام می پذیرد [۸]. بنابراین، این یافته ی فرا ساختاری می تواند دلیلی خوب برای کاهش حجم آسینی باشد.

یافته ی دیگر این بررسی نشان دهنده ی آن است که، افزایشی در حجم آسینی سروزی و موکوسی در جانداران شاهد نر در پایان ماه سوم نسبت به ماه نخست دیده می شود، که ممکن است، نتیجه ی رشد آسینی بوده، که این رشد، در

www.SID.ir

Archive of SID

جانداران دیابتی کمتر است. به نظر می رسد که، کاهش سطح انسولین باعث کاهش رشد آسینی گردیده است.

نتیجه گیری

این بررسی اطلاعاتی دقیق رافراهم می کند، که نشان می دهد، از دو گونه ی آسینی سروزی و موکوسی، بخش اصلی برون ریز غده ی تحت فکی، یعنی آسینی سروزی سه ماه پس از آغاز دیابت، در هر دو جنس نر و ماده، به کاهش حجم دچار شده و این امر، می تواند دلیلی بر ایجاد خشکی دهان (Xerostomia) باشد، که یکی از عوارض دیابت است.

سپاسگزاری

نویسنده از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز که با حمایت خود و با تصویب طرح شماره ی ۹۲۹-۷۹ امکان اجرای این بررسی را فراهم آورده است، صمیمانه سپاسگزاری کرده و نیز، از زحمات سرکار خانم پیرسلامی، که در فراهم آوردن لام های میکروسکوپی و رنگ آمیزی بافت ها، همکاری کرده اند، قدردانی می کند.

A Stereological Evaluation of Serous and Mucous Acini of the Submandibular Gland in Male and Female Diabetic Rats

A. Noorafshan, Ph.D.
Associate Professor of Anatomy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Correspondence:
A. Noorafshan
Department of Anatomy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
Tel: *+98-711-2304372*
E-mail:
noora@sums.ac.ir

Background: Dry mouth (xerostomia) is one of the complications of diabetes mellitus but little work has been done on morphological changes of the salivary gland in this condition. In this study, the effect of diabetes mellitus on the serous and mucous acini of the submandibular gland of male and female rats, one and three months after diabetes induction, were studied. **Materials and Methods:** Male and female rats were divided into experimental and control subgroups. Diabetes was induced in experimental rats by streptozotocin. One and three months after diabetes induction, the submandibular glands were removed and random sections were obtained. Then, volume-weighted mean acini volumes were estimated by the point-sampled intercepts method. **Results:** The results showed that volume reduction occurred only in serous acini in both male and female rats three months after diabetes mellitus induction and the mucous acini remained unchanged. **Conclusion:** This study, in which stereological methods were used, demonstrated that diabetes mellitus causes morphological changes in serous acini, the main exocrine part of the rat submandibular gland.

www.SID.ir

Archive of SID

Keywords: Diabetes mellitus, Stereology, Submandibular gland, Rat, Xerostomia

منابع

[1]Chavez EM, Borrell LN, Taylor GW, et al.: A longitudinal analysis of salivary flow in control subjects and older adults with type 2 diabetes. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 2001;91(2):166-73.
[2]Chavez EM, Taylor GW, Borrell LN, et al.: Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 2001;89(3):305-11.
[3]Greenspan D: Xerostomia: Diagnosis and management. ***Oncology (Huntingt)*** 1996;10(3 suppl):7-11.
[4]Murrah VA: Diabetes mellitus and associated oral manifestations: A review. ***J Oral Pathol*** 1985;14(4):271-81.
[5]Meurman JH, Collin HL, Niskanen L, et al.: Saliva in non-insulin-dependent patient and control subjects: The role of autonomic nervous system. ***Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*** 1998;86(1):69-76.
[6]Culter LS, Pinney HE, Christian C, et al.: Ultrastructural studies of rat submandibular gland in sterptozotocin induced diabetes mellitus. ***Virchows Arch A Pathol Anat Histol*** 1979;382(3):301-11.
[7]Pinkstaff CA: Salivary glands, glycoconjugates and diabetes mellitus. ***Eur J Morphol*** 1996;34(3):187-90.
[8]Sugihara T, Yoshimura Y, Tanaka O: Ultrastructural and immunoelectron microscopic studies on infiltrating mononuclear cells in lymphocytic submandibulitis in NOD mice. ***Histol Histopathol*** 1989;4(4):397-404.
[9]High AS, Sutton J, Hopper AH: A morphometric study of submandibular gland changes in streptozotocin-induced diabetic rats. ***Arch Oral Biol*** 1985;30(9):667-71.
[10]Toda I, Sullivan BD, Rocha EM, et al.: Impact of gender on exocrine gland inflammation in mouse model of Sjogren syndrome. ***Exp Eve Res*** 1999;69(4):355-66.
[11]Mayhew TM: Quantitative description of the spatial arrangement of organelles in a polarized secretory epithelial cell: The salivary gland acinar cell. ***J Anat*** 1999;194:279-85.
[12]Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, et al.: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. ***APMIS*** 1988;96:379-94.
[13]Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, et al.: The new stereological tools, disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. ***APMIS*** 1988,96:857-81.
[14]Nielsen K, Colstrup H, Nilsson T, et al.: Stereological estimates of nuclear volume correlated with histopathological grading and prognosis of bladder tumour. ***Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*** 1986;52:41-54.
[15]Nielsen K, Petersen SE, Orntoft T: A comparison between stereological estimates of mean nuclear volume and DNA flow cytometry in bladder tumors. ***APMIS*** 1989;97(97):949-56.
[16]Noorafshan A: Stereological study on the submandibular gland in hypothyroid rats. ***APMIS*** 2001,109:223-7.
[17]Artacho-Perula E, Roldan-Villalobos R, Salcedo-Leal I, et al.: Stereological estimates of volume-weighted mean glomerular volume in streptozotocin diabetic rats. ***Lab Invest*** 1993;68(1):56-61.
[18]Miyagawa J, Hanafusa T, Miyazaki A, et al.: Ultrastructural and immunocytochemical aspects of lymphocytic submandibulitis in the non-obese diabetes (NOD) mouse. ***Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*** 1986;51(3):215-25.
[19]Anderson LC, Suleiman AH, Garrett JR:. Morphological effects of diabetes on the granular ducts and acini of the rat submandibular gland. ***Microsc Res Tech*** 1994;27(1):61-70.

www.SID.ir