

## مطالعه مورفومتری و ایمنوسیتوشیمیایی کیفیت و بلوغ اووسیت‌های موش‌های کوچک آزمایشگاهی دیابتی متعاقب تجویز آلوتئورا

مهسا افروغ<sup>۱</sup>، نعیم عرفانی مجد<sup>۲</sup>، حسین نجف زاده ورزی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۴/۱۲/۰۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۲/۰۴

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** دیابت ملیتوس یک بیماری متابولیک است که موجب افزایش قند خون می‌شود. در زنان مبتلا به دیابت خطر ناهنجاری‌های مادرزادی و سقط زودرس بیشتر است. در مدل دیابت نوع ۱ اختلال رشد فولیکول‌ها، کاهش بلوغ و کیفیت تخمک مشاهده شده است. آلوتئورا گیاهی است که خاصیت آنتی‌دیابتی دارد. هدف از مطالعه حاضر تأثیر ژل آلوتئورا بر روند بلوغ تخمک‌های استحصال‌شده از موش کوچک آزمایشگاهی دیابتی می‌باشد.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه ۲۵ سر موش کوچک آزمایشگاهی به‌طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند: گروه شاهد (نرمال سالین)، گروه آلوتئورا، گروه آلوتئورا (۳۵۰ mg/kg/day)، دیابتی، دیابتی دریافت‌کننده آلوتئورا (۳۵۰ mg/kg/day)، گاواژ، دیابتی دریافت‌کننده انسولین (۱ mg/kg/day)، داخل صفاقی. مدل دیابتی با دریافت ۱۹۰ mg/kg استرپتوزوتوسین ایجاد شد. پس از سه هفته تمام حیوانات سوپراوله شده و تخمک‌های آزاد شده از اویداکت جمع‌آوری و از نظر کیفیت بلوغ هسته و بازآرایی فضایی میتوکندری بررسی شدند.

**یافته‌ها:** دیابت موجب افزایش معنی‌دار ناهنجاری‌های دوک میوز، آرایش کروموزوم‌ها بر روی آن و تغییر در بازآرایی فضایی میتوکندری‌ها در سیتوپلاسم گردید ( $P < 0.05$ ). تجویز آلوتئورا و انسولین توانست تا حدی از این افزایش جلوگیری کند ( $P < 0.05$ ). به‌علاوه نرخ بلوغ می‌وزی نیز در گروه دیابتی کمتر بود و آلوتئورا و انسولین تا حدی از این کاهش ممانعت کردند ( $P < 0.05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که دیابت روند بلوغ تخمک را دچار آسیب کرده و با کاهش نرخ بلوغ و کیفیت تخمک می‌تواند موجب نابرابری یا کاهش باروری گردد.

**کلیدواژه‌ها:** دیابت، آلوتئورا، میتوکندری، تخمک، موش کوچک آزمایشگاهی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره سوم، ص ۱۸۶-۱۷۸، خرداد ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: اهواز، دانشگاه شهید چمران، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، دپارتمان بافت‌شناسی تلفن: ۰۶۱-۳۳۳۳۲۰۴۱

Email: m.afrough@gmail.com

### مقدمه

بیماری و مرگ جنین همچنین ناهنجاری‌های مادرزادی مواجه می‌باشند و علی‌رغم کنترل هیپرگلیسمی در سراسر دوره بارداری مشکلات بارداری در این زنان ۳-۵ بیشتر از زنان سالم است. یافته‌ها نشان می‌دهد دیابت مادری می‌تواند اثرات امبریونی و جنینی پایدار و برگشت‌ناپذیری بر تولیدمثل جنس مؤنث داشته باشد. همچنین اختلال در فولیکولوژنز، استروئیدوژنز، عدم تخمک‌گذاری، سقط خودبه‌خودی، تخمدان پلی‌سیستیک و یائسگی زودرس و غیره گزارش شده است (۲). شیوع بالای اختلالات سیکل قانندگی و باروری در دیابت ملیتوس گزارش شده است. همچنین دیابت می‌تواند از

دیابت ملیتوس یک اختلال متابولیکی است که به دلیل عوارض گسترده آن از اهمیت بالایی برخوردار است. دیابت ملیتوس به دو نوع ۱ و ۲ تقسیم می‌شود. نوع اول به دلیل کاهش تولید انسولین در نتیجه آسیب سلول‌های بتای پانکراس ایجاد می‌شود. دیابت نوع ۲ بر اثر کاهش حساسیت بافت‌های محیطی به اثرات انسولین و به‌عبارت‌دیگر مقاومت به انسولین به وجود می‌آید (۱).

زنانی که به بیماری دیابت نوع ۱ یا ۲ که به میزان ضعیفی کنترل می‌شود، دچار هستند، با مشکلات تولیدمثلی مانند سقط،

۱ دکتری بافت‌شناسی مقایسه‌ای، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲ استاد بافت‌شناسی مقایسه‌ای، دانشگاه شهید چمران اهواز

۳ استاد فارماکولوژی، دانشگاه شهید چمران اهواز

وجود دارد (۱۰، ۱۱). اثرات *آلوئه‌ورا* در کاهش قند خون هم در مشاهدات کلینیکی و هم در حیوانات با دیابت القایی مشاهده شده است (۱۰، ۱۲). اثر مطلوب این گیاه بر روند رشد فولیکولی و محافظت در برابر اثرات دیابت از جمله افزایش تعداد و قطر فولیکول‌های ثانویه و ثالثیه در تخمدان موش صحرایی نشان‌دهنده تأثیر حمایتی ژل *آلوئه‌ورا* بر فولیکولوژن و بافت تخمدان در موش‌های صحرایی دیابتی شده به‌وسیله استرپتوزوتوسین می‌باشد. رسیدن سطح گلوکز خون به حد طبیعی، و افزایش وزن موش‌های صحرایی و تخمدان آن‌ها متعاقب تجویز ژل *آلوئه‌ورا* نیز در مطالعه مذکور گزارش شده است (۱۳). هدف از مطالعه حاضر ارزیابی ژل *آلوئه‌ورا* بر روند بلوغ و کیفیت تخمک‌های استحصال‌شده از موش کوچک آزمایشگاهی دیابتی می‌باشد.

### مواد و روش کار

در این مطالعه ۲۵ سر موش کوچک آزمایشگاهی از جنس ماده به ظاهر سالم به سن ۸-۱۰ هفته با وزن ۲۵-۳۰ گرم از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور تهیه شدند. حیوانات تحت شرایط دمایی  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و سیکلنوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بر اساس قوانین اخلاقی و اصول مراقبت از حیوانات نگهداری شدند. غذای آماده (پلیت) و آب تمیز به صورت آزادانه در اختیار آن‌ها قرار داده شد. موش‌ها به مدت یک هفته پیش از آغاز مطالعه در این شرایط نگهداری و پس از گذشت یک هفته به پنج گروه مساوی تقسیم و به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند: گروه اول به‌عنوان شاهد روزانه نرمال سالین دریافت کرد. گروه دوم روزانه  $350 \text{ mg/kg}$  *آلوئه‌ورا* به صورت گاواژ دریافت کرد. گروه سوم دیابتی (پس از دریافت تک دوز  $190 \text{ mg/kg}$  استرپتوزوتوسین (STZ) دیابتی شدند (۷)، قند خون موش‌ها بالاتر از  $300 \text{ mg/dl}$  به‌عنوان معیار دیابتی شدن در نظر گرفته شد)، گروه چهارم دیابتی دریافت‌کننده *آلوئه‌ورا* (مشابه گروه سوم دیابتی شده و  $350 \text{ mg/kg/day}$  *آلوئه‌ورا* به‌صورت گاواژ دریافت کردند)، گروه پنجم دیابتی دریافت‌کننده انسولین *آلوئه‌ورا* (مشابه گروه سوم دیابتی شده و  $1 \text{ mg/kg/day}$  انسولین به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند). در این مطالعه ژل *آلوئه‌ورا* از شرکت باریج اسانس (ایران) و انسولین NPH (اکسیر، ایران) تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند.

قبل و پس از پایان دوره آزمایش، قند خون با استفاده از دستگاه گلوکومتر (آن کال پلاس، امریکا) در روز ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ اندازه‌گیری شد.

در انتهای دوره آزمایش، با استفاده از هورمون‌های PMSG و hCG به میزان ۱۰ واحد، سوپراواولاسیون صورت گرفت (۷).

پاسخ طبیعی بافت تخمدان به FSH جلوگیری کند. این اختلال از عملکرد طبیعی رشد فولیکولی در پرواستروس جلوگیری می‌کند و می‌تواند منجر به افزایش فولیکول‌های آترزی و کاهش قطر فولیکول‌ها شود (۳، ۴). وقوع ناهنجاری‌های مادرزادی در رویان‌های به‌دست‌آمده از موش‌های دیابتی که به موش غیر دیابتی انتقال داده شده بودند، بیانگر این مطلب است که قرار گرفتن در معرض دیابت مادری در طی اووژن، لقاح و ۲۴ ساعت اول تکامل، برای پایدار شدن برنامه‌ریزی جنین در جهت ایجاد تغییرات مورفولوژیکی کافی می‌باشد (۲). با قرار دادن یافته‌های فوق در کنار سرکوب استروئیدوژن تخمدان، افزایش آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا (۵) و بلوغ تأخیری تخمک (۵، ۶) به نظر می‌رسد که دیابت مادر اثرات قطعی بر تخمک دارد و ممکن است آن را برای ناهنجاری‌های تکاملی پس از لقاح و حتی بیماری‌های متابولیکی نوزاد آتی مستعد سازد. در موش کوچک آزمایشگاهی اغلب اووسیت‌های طبیعی متافاز ۲ دارای دوک بشکه‌ای شکل و کروموزوم‌های ردیف شده بر روی صفحه متافازی می‌باشند. دیابت مادری سبب القای به‌هم‌ریختگی (دیس‌ارگانیزاسیون) دوک و عدم آرایش صحیح کروموزوم‌ها در اووسیت می‌شود (۷) که موجب افزایش ناباروری اووسیت‌های دیابتی می‌شود.

بلوغ اووسیت شامل بلوغ هسته و بلوغ سیتوپلاسمی می‌باشد. این دو فرایند ارتباط نزدیکی با یکدیگر دارند. یکی از ارگانل‌هایی که در فعال‌سازی مسیرهای متابولیکی معین در سنتز پروتئین‌ها و فسفریلاسیون در بلوغ سیتوپلاسمی دخیل است، میتوکندری می‌باشد که نقش بسیار مهمی در تأمین انرژی موردنیاز سلول جهت تکمیل بلوغ دارد. بررسی فراساختاری آرایش و توزیع میتوکندری‌های اووسیت موش نشان می‌دهد که در اووسیت‌های نابالغ که در مرحله GV قرار دارند، میتوکندری‌ها بیشتر در اطراف هسته قرار دارند که به الگوی پری نوکلئار منسوب است. با تکمیل بلوغ می‌وزی توزیع قطبی میتوکندری‌ها در اغلب اووسیت‌های متافاز II با استقرار در اطراف دوک مشخص می‌گردد. مرحله بینابینی مابین نابالغ و بالغ به‌صورت پراکندگی یکنواخت در سیتوپلاسم مشاهده می‌شود (۸، ۹). این الگوی پراکندگی در اووسیت‌های موش‌های دیابتی به هم می‌ریزد. تغییرات الگوی توزیع میتوکندری تغییر مکان تأخیری یا ناکارآمد میتوکندری‌ها را در اووسیت موش‌های دیابتی نشان می‌دهد (۷).

اخیراً به دلیل پیشگیری از اثرات جانبی داروهای سنتتیک، استفاده از گیاهان دارویی طب سنتی در درمان بسیاری از امراض گسترش یافته است. گیاه دارویی *آلوئه‌ورا* یکی از این گونه‌های مهم دارویی است. اجزاء فعال فارموکولوژیک *آلوئه‌ورا*، از جمله آمودین، آلون، باربالونین، استرول‌ها و آسمانان) در ژل و پوست برگ‌های آن

بافر PBS بر روی لام مانت شده و با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت مورد بررسی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های کمی به دست آمده با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و پس از آزمون LSD از نسخه شماره ۲۰ نرم افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در نهایت نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین (SEM) گزارش شد. از آزمون کروسکال والیس به عنوان روش آماری مورد استفاده جهت آنالیز پراکنندگی دستگاه‌های میتوکندری در تخمک‌های مورد ارزیابی، استفاده شد. در مواردی که  $P < 0.05$  بود، تفاوت میانگین‌ها معنی دار تلقی گردید.

### یافته‌ها

قند خون: در این تحقیق قند خون در پایان هفته اول، دوم و سوم دوره آزمایش در سطح معنی داری متفاوت بود ( $P < 0.001$ ). بیشترین میزان قند خون به موش‌های دیابتی تعلق داشت. داده‌ها بیانگر این مطلب است که دریافت آلوهورا و انسولین در موش‌های دیابتی تا حدی از افزایش قند خون جلوگیری کرده است، اما هنوز با گروه شاهد فاصله معنی داری دارد.

بلوغ تخمک: بلوغ تخمک‌های استحصال شده از نظر بلوغ هسته و رسیدن به مرحله متافاز II (MII) در همه گروه‌های مورد مطالعه بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که نرخ بلوغ تخمک‌های استحصال شده از موش‌های گروه دیابتی در مقایسه با گروه شاهد و گروه شاهد دریافت کننده آلوهورا در سطح معنی داری کاهش یافته است. دریافت آلوهورا و انسولین موجب از کاهش نرخ بلوغ تخمک‌های جمع آوری شده از موش‌های دیابتی به طور موفقیت آمیزی ممانعت کرد.

آرایش و سازمان دهی دوک تقسیم و آرایش کروموزوم‌ها بر روی آن: نقایص آرایش و سازمان دهی دوک تقسیم میوز به صورت دوک چندقطبی و گسیختگی در آرایش و سازمان دهی دوک (تصویر ۱ A) مشاهده شدند. بررسی‌ها بیانگر افزایش میانگین نقایص آرایش و سازمان دهی دوک در تخمک‌های استحصال شده از موش‌های گروه‌های دیابتی در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی بود. گروه‌های دیابتی دریافت کننده آلوهورا و انسولین نسبت به گروه شاهد و دیابتی نقایص آرایش و سازمان دهی دوک به ترتیب بیشتر و کمتری را نشان دادند. بین میانگین نقایص سازمان دهی دوک در تخمک‌های استحصال شده از موش‌های دیابتی دریافت کننده آلوهورا و انسولین اختلاف معنی داری مشاهده نشد. نتایج نشان می‌دهد که آلوهورا و انسولین نتوانستند میانگین نقایص آرایش و سازمان دهی دوک تقسیم را در تخمک‌های

به این ترتیب که ابتدا PMSG تزریق شده و پس از ۴۸ ساعت hCG تزریق شد و پس از ۱۶-۱۴ ساعت موش‌ها با رعایت ملاحظات اخلاقی و با بیهوشی با کلروفورم، به روش جابه جایی مهره گردن آسان کشی شده، تخمک‌ها از اویداکت جمع آوری شدند. تخمک‌های استحصال شده پس از جداسازی سلول‌های کومولوس با استفاده از آنزیم هیالورونیداز، از نظر بلوغ میوزی مورد ارزیابی قرار گرفته و نرخ بلوغ در هر گروه آزمایشی تعیین شد. کروموزوم‌ها در تخمک نابالغ مرحله GV اغلب در حالت باز و پراکنده قرار دارند و در حال نسخه برداری می‌باشند و تخمک دارای یک وزیکول ژرمینال با هستک بزرگ می‌باشد. با پیشرفت تقسیم تخمک در مرحله MI دارای کروموزوم‌های همولوگ جفت در وسط دوک میوز بوده و در این مرحله غشاء هسته ناپدید می‌شود و اولین جسم قطبی نیز هنوز خارج نشده است. در ادامه تقسیم میوزی اول، تخمک بالغ (MII) پس از خروج جسم قطبی اول ایجاد می‌شود و در این مرحله کروموزوم‌ها نیز بر صفحه متافازی دوک تقسیم مستقر می‌شوند.

در این مطالعه تخمک‌های بالغ (متافاز II) دارای ظاهر طبیعی جهت آماده سازی برای رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی به محلول ثبوتی پارافرم آلدئید ۴٪ انتقال یافتند.

رنگ آمیزی میکروتوبول و کروموزوم: تخمک‌ها پس از شستشو مدت ۳۰ دقیقه، در بافر آنتی بادی (BSA، PBS) ۳ درصد، Triton-x-100 (۰/۱ درصد) به مدت ۱ ساعت به آنتی بادی اولیه (USA، Santa Cruize، Anti  $\beta$ tubulin) با غلظت ۱/۱۰۰ در انکوباتور ۳۷ درجه انتقال داده شدند. تخمک‌ها پس از ۳ بار شستشو با بافر آنتی بادی، در آنتی بادی ثانویه (Santa Cruize، FITC) به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس شستشو در بافر آنتی بادی انجام و تخمک‌ها به مدت ۵ دقیقه در محلول Hoechst 33342 (USA، Santa Cruize) با غلظت ۱۰  $\mu\text{g/ml}$  جهت رنگ آمیزی کروموزوم‌ها قرار داده شدند. تخمک‌ها پس از شستشوی مجدد در بافر PBS بر روی لام مانت شده و با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنس و با فیلترهای FITC، Hoechst مورد بررسی قرار گرفتند. دوک تقسیم میوز در تخمک‌ها با استفاده از آنتی بادی اولیه و ثانویه به رنگ سبز و کروموزوم‌ها به رنگ آبی قابل مشاهده شد.

رنگ آمیزی میتوکندری و کروموزوم: تخمک‌ها به مدت ۳۰ دقیقه به محیط کشت Ham's F10 حاوی میتوترکر سبزی (UK، Invitrogen)، با غلظت ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  منتقل شدند. پس سه بار شستشو در بافر PBS حاوی BSA ۳ درصد، در محلول Hoechst 33342 با غلظت ۱۰  $\mu\text{g/ml}$  جهت رنگ آمیزی کروموزوم‌ها قرار داده شدند. تخمک‌ها پس از شستشوی مجدد در

استحصال شده از موش‌های دیابتی در سطح گروه شاهد بهبود بخشند (جدول ۲).

نقایص کروموزومی: نقایص کروموزومی از جمله جدانشدن کروموزوم‌ها به شیوه صحیح، باقی ماندن یک یا چند کروموزوم (تصویر D, F) یا عدم قرارگیری بر صفحه متافازی دوک تقسیم (تصویر E) مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه این نقایص در گروه‌های مختلف، افزایش معنی‌داری در موش‌های دیابتی نشان داد ( $P < 0.05$ ). بررسی داده‌ها حاکی از این است که نقایص کروموزومی پس از تجویز آلونهورا و انسولین به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد اما به سطح گروه شاهد نمی‌رسد (جدول ۲). بازآرایی فضایی دستگاه‌های میتوکندری: افزایش درصد تخمک‌های واجد الگوی تجمعی دستگاه‌های میتوکندری (تصویر

A ۲) در موش‌های دیابتی در مقایسه با سایر گروه‌ها مشاهده شد. دریافت آلونهورا و انسولین توانست درصد این تخمک‌ها را در موش‌های دیابتی به سطح گروه شاهد برگرداند. بررسی‌های آماری تفاوت معنی‌داری در درصد الگوی تخمک‌های واجد دستگاه‌های میتوکندری با الگوی همگن (تصویر B ۲) نشان نداد، اما درصد تخمک‌های واجد دستگاه‌های میتوکندری با الگوی پری‌توبولار (تصویر C ۲) در موش‌های دیابتی در سطح معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها بود. بررسی‌های آماری حاکی از این است که دریافت آلونهورا و انسولین توانست درصد تخمک‌های واجد دستگاه‌های میتوکندری با الگوی پری‌توبولار را در سطح موش‌های گروه شاهد بهبود بخشند (جدول ۳).

جدول (۱): میانگین و خطای استاندارد قند خون در گروه‌های مورد مطالعه

گروه	قند خون پیش از تجویز STZ	قند خون یک هفته پس از تجویز STZ (شروع دیابتی شدن)	قند خون یک هفته پس از دیابتی شدن	قند خون دو هفته پس از دیابتی شدن	قند خون سه هفته پس از دیابتی شدن
شاهد	۱۱۳/۷۳±۶/۷۲ <sup>a</sup>	۱۱۳/۸۷±۶/۶۹ <sup>b</sup>	۱۰۴/۴۶±۴/۴۹ <sup>a</sup>	۱۰۵/۶۶±۵/۹۶ <sup>a</sup>	۱۰۷/۲۷±۴/۷۱ <sup>a</sup>
آلونهورا	۱۰۶/۸۶±۵/۲۹ <sup>a</sup>	۱۱۸/۷۱±۶/۵۳ <sup>b</sup>	۱۰۵/۷۱±۲/۸۹ <sup>a</sup>	۱۰۷/۹۲±۳/۱۷ <sup>a</sup>	۹۴/۴۳±۴/۲۲ <sup>a</sup>
دیابتی	۱۰۴/۱۱±۷/۷۸ <sup>a</sup>	۵۲۵/۷۸±۲۴/۶۵ <sup>a</sup>	۵۱۶/۳۳±۲۵/۰۵ <sup>b</sup>	۴۸۸/۸۸±۳۰/۱۰ <sup>b</sup>	۵۵۰±۲۵/۶۷ <sup>b</sup>
دیابتی+آلونهورا	۱۰۵±۶/۸۴ <sup>a</sup>	۵۱۷/۰۸±۱۷/۹۲ <sup>a</sup>	۳۰۹/۵۵±۱۷/۵۴ <sup>c</sup>	۲۸۶/۸۸±۲۳/۰۰ <sup>c</sup>	۳۴۷±۱۲/۳۶ <sup>c</sup>
دیابتی+انسولین	۱۱۳/۲۲±۱۰/۰۵ <sup>a</sup>	۵۶۵/۷۸±۴۲/۷۳ <sup>a</sup>	۲۵۶/۴±۲۶/۶۹ <sup>d</sup>	۲۷۰/۰۰±۲۷/۷۴ <sup>c</sup>	۴۰۱±۱۵/۰۳ <sup>d</sup>

حروف a تا d در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.01$ ).

جدول (۲): میانگین درصد اووسیت‌های بالغ طبیعی و غیرطبیعی (ناهنجاری‌های دوک تقسیم و آرایش کروموزومی) بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و ایمنوسیتوشیمی در گروه‌های مورد مطالعه

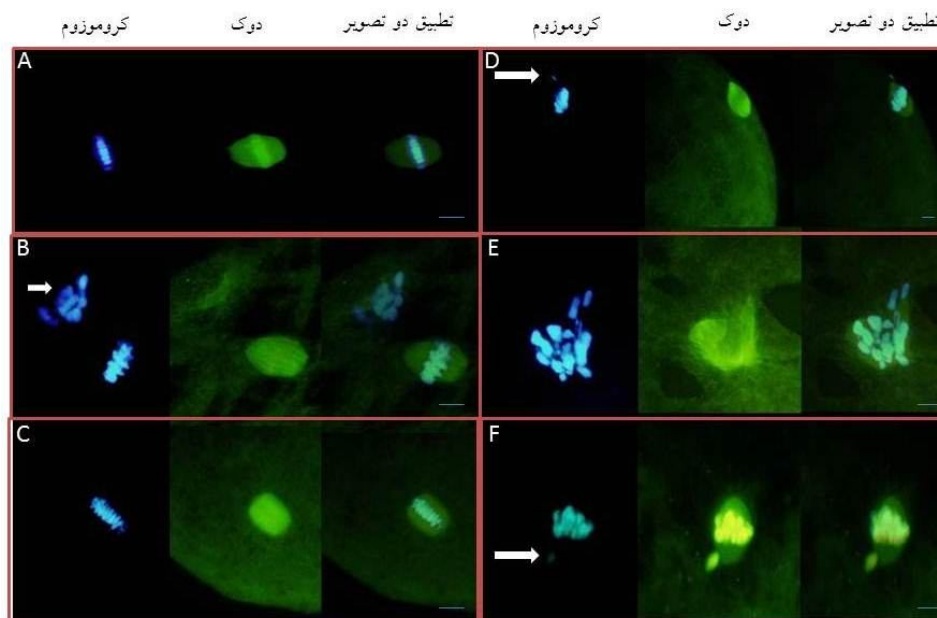
گروه	شاهد	آلونهورا	دیابتی	دیابتی+آلونهورا	دیابتی+انسولین
اووسیت MII طبیعی	۹۴/۲۳±۹۵/۱۴ <sup>a</sup>	۹۱/۳۷±۱۷/۷۷ <sup>a</sup>	۵۱/۱۱±۸/۸۹ <sup>b</sup>	۸۴/۰۵±۲/۷۲ <sup>c</sup>	۸۲/۵۹±۲/۰۱ <sup>c</sup>
اووسیت MII غیرطبیعی	۵/۷۶±۲/۱۳ <sup>a</sup>	۶/۵۶±۰/۶۱ <sup>a</sup>	۴۳/۴۵±۳/۶۲ <sup>b</sup>	۲۲/۶۶±۲/۲۸ <sup>c</sup>	۲۹/۸۱±۸/۴۹ <sup>c</sup>
نقص در آرایش کروموزومی	۳/۲۲±۱/۲۷ <sup>a</sup>	۵/۳۱±۱/۸۰ <sup>a</sup>	۳۵/۵۵±۱۵/۵۵ <sup>b</sup>	۱۰/۷۶±۰/۵۲ <sup>a</sup>	۱۲/۴۵±۲/۴۰ <sup>a</sup>
نقص در آرایش و سازمان‌دهی دوک	۳/۲۵±۱/۲۷ <sup>a</sup>	۳/۳۹±۱/۱۷ <sup>a</sup>	۲۴/۴۴±۴/۴۴ <sup>b</sup>	۱۲/۵۱±۱/۷۱ <sup>c</sup>	۱۵/۰۱±۱/۳۶ <sup>c</sup>

حروف a تا d در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).

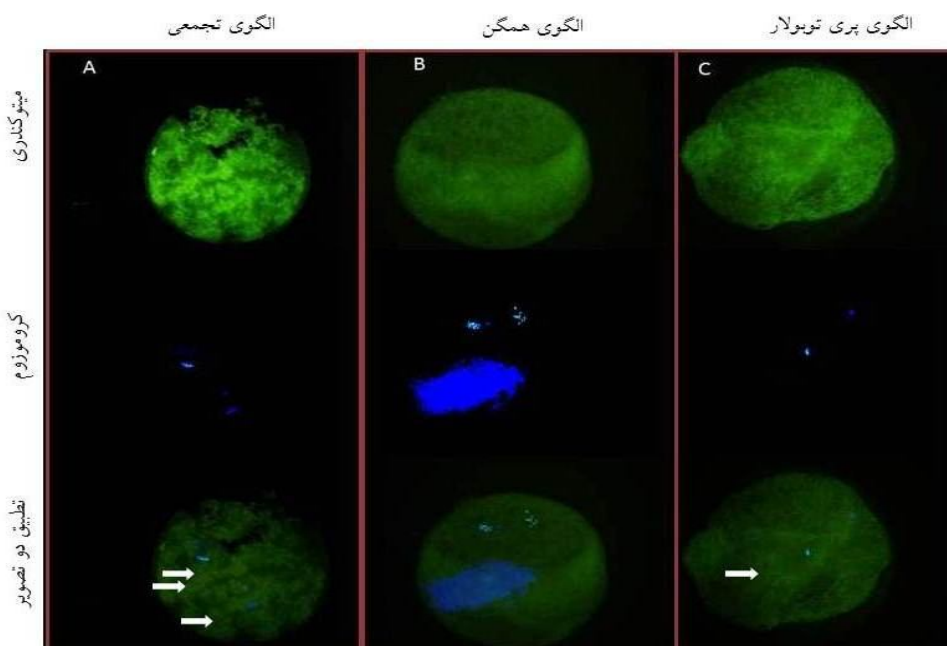
جدول (۳): مقادیر میانگین درصد الگوی پراکندگی میتوکندری در اووسیت ± خطای معیار در گروه‌های مورد مطالعه

گروه	تجمعی	همگن	پری‌توبولار
شاهد	۷/۱۴±۴/۱۲ <sup>a</sup>	۲۳/۲۱±۵/۵۹ <sup>a</sup>	۶۹/۶۴±۵/۴۰ <sup>a</sup>
آلونهورا	۷/۱۴±۵/۱۲ <sup>a</sup>	۲۷/۳۸±۴/۵۰ <sup>a</sup>	۶۵/۴۷±۲/۲۹ <sup>a</sup>
دیابتی	۳۰/۵۵±۲/۷۰ <sup>b</sup>	۳۸/۸۸±۵/۵۵ <sup>a</sup>	۳۰/۵۵±۴/۱۲ <sup>b</sup>
دیابتی+آلونهورا	۴/۵۰±۴/۵ <sup>a</sup>	۴۰/۸۱±۵/۰۸ <sup>a</sup>	۵۴/۶۸±۲/۹۰ <sup>a</sup>
دیابتی+انسولین	۰ <sup>a</sup>	۳۳/۳۳±۰/۰ <sup>a</sup>	۶۶/۶۶±۰/۰ <sup>a</sup>

حروف a تا b در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).



**تصویر (۱):** مقایسه دوک تقسیم میوز و نحوه قرار گرفتن کروموزوم‌ها بر روی آن، در تخمک موش سالم (A)، سالم دریافت‌کننده آلوتئورا (B)، سالم دریافت‌کننده انسولین (C) و موش دیابتی (D، E، F). در تخمک MII آزاد شده از موش‌های گروه شاهد، دوک تقسیم بشکله‌ای شکل، که کروموزوم‌ها در وسط آن، بر روی صفحه متافازی آرایش یافته‌اند، قابل مشاهده است (A، B و C). پیکان در تصویر B جسم قطبی را نشان می‌دهد. در تخمک MII موش دیابتی، از هم‌گسیختگی دوک تقسیم (E) و آرایش غیرطبیعی و جدا شدن بخشی از کروموزوم‌ها (پیکان سفیدرنگ در D و F) قابل مشاهده می‌باشد (رنگ‌آمیزی آنتی‌بادی بتا توبولین، جهت قابل مشاهده شدن دوک تقسیم (سبز) و رنگ‌آمیزی hoechst، جهت قابل مشاهده شدن کروموزوم‌ها (آبی)، بار =  $10 \mu\text{m}$ ).



**تصویر (۲):** نمای میکروسکوپی الگوی پراکندگی دستگاه‌های میتوکندری و کروموزوم‌ها در تخمک‌های MII در موش‌های سالم (C) و دیابتی (A و B). شکل غیرطبیعی قرار گرفتن دستگاه‌های میتوکندری به شکل تجمعی (پیکان‌های سفیدرنگ در تصویر A) و همگن (B) در تخمک موش‌های دیابتی در مقایسه با آرایش طبیعی پری توبولار (پیکان سفیدرنگ در تصویر C) در تخمک متافاز II موش سالم قابل توجه می‌باشد. ضمناً موقعیت کروموزوم‌ها نیز در هر یک قابل مشاهده می‌باشد (رنگ‌آمیزی میتوترکر سبز جهت قابل مشاهده شده دستگاه‌های میتوکندری (سبز) و رنگ‌آمیزی hoechst، جهت قابل مشاهده شدن کروموزوم‌ها (آبی)،  $200 \times$ ).

## بحث و نتیجه گیری

در سال‌های اخیر مطالعات متعددی بر روی اثربخشی گیاهان مختلف از جمله آلوئه‌ورا بر بیماری دیابت انجام شده است، اما اثرات در مانی گیاه آلوئه‌ورا بر کیفیت تخمک و قدرت باروری آن مورد بررسی قرار نگرفته است. در مطالعه حاضر مصرف ژل آلوئه‌ورا به میزان کمی موجب کاهش میزان قند خون در موش‌های کوچک آزمایشگاهی دیابتی شده است. گزارش شده که مصرف خوراکی ژل آلوئه‌ورا به میزان  $500 \text{ mg/kg}$  در روز موجب کاهش قند خون در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط آلوکسان می‌گردد (۱۲). مطالعه Noor و همکاران (۲۰۰۸) و Erfani Majd و همکاران (۱۳۹۱) نشان داد که مصرف خوراکی ژل آلوئه‌ورا به میزان  $\text{mg/kg}$  ۳۰۰ قند خون را به ترتیب در موش صحرایی نر و ماده دیابتی به میزان کمی پایین می‌آورد که با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد (۱۴ و ۱۵). آلوئه‌ورا می‌تواند با بازسازی سلول‌های بتا تخریب‌شده، یا تکثیر سلول‌های بتا باقیمانده در پانکراس (۱۴) یا افزایش ترشح انسولین از سلول‌های بتا باقیمانده در پانکراس (۱۰) موجب کاهش قند خون گردد. به‌علاوه آلوئه‌ورا می‌تواند خاصیت شبه انسولینی داشته باشد یا باعث افزایش برداشت گلوکز از بافت‌های محیطی یا مهار تولید آن از طریق گلوکونوزن کبدی (۱۴) و در نتیجه کاهش قند خون گردد.

در مطالعات پیشین نیز تأخیر در بلوغ تخمک در تخمک‌های موش‌های مبتلا به هر دو نوع دیابت مشاهده شده است (۱۶ و ۱۷). کاهش ۶۰ درصدی در اتصالات روزنه دار، در کمپلکس کومولوس و تخمک مشاهده شده است، که می‌تواند به‌نوبه خود از دلایل تأخیر و کاهش نرخ بلوغ و به‌علاوه کاهش کیفیت تخمک نیز شود، زیرا که با آسیب به متابولیسم انرژی، کیفیت و شایستگی بلوغ می‌وزی در تخمک کاهش می‌یابد (۱۸). مشخص‌شده که دیابت باعث کاهش قابل‌ملاحظه روند تخمک‌گذاری و یا قطع روند رشد فولیکولی در تخمدان می‌شود. تغییرات اعمال شده توسط دیابت در سطح فیزیولوژی سلول تخمک نیز قابل‌مشاهده است (۵).

یافته‌های مطالعه حاضر نشان‌دهنده تأخیر در بلوغ تخمک‌ها و کاهش نرخ بلوغ می‌وزی آن‌ها در موش‌های دیابتی است و آلوئه‌ورا تأثیرات سودمندی بر روند بلوغ می‌وزی در موش‌های دیابتی دارد. کاهش بلوغ تخمک در گروه‌های دیابتی می‌تواند به علت تغییرات هورمون‌های جنسی رخ دهد، درحالی‌که در گروه‌های سالم تکامل طبیعی سلول جنسی طی می‌شود (۴). محققان بر این باور هستند که شکل‌گیری دوک و ارگانیزه شدن کروماتین خصوصاً به ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و اندوکرینی محیط حساس است به طوری که ناهنجاری‌های دوک می‌وزی مشاهده شده و

کروموزوم‌ها قادر به جدا شدن صحیح نمی‌باشند (۵، ۱۹ و ۷). به نظر می‌رسد آلوئه‌ورا با کاهش نسبی قند خون توانسته تا حدی بر این مورد تأثیرات مثبت بگذارد. به‌علاوه گیاه آلوئه‌ورا حاوی ترکیباتی از جمله بتا سیتواسترول و فیتواستروژنی است که استروئیدوژن را در تخمدان و غلظت استروژن را در سرم افزایش می‌دهد (۲۰، ۲۱). همچنین اثرات مشابه عصاره گیاه آلوئه‌ورا با FSH، بر تخمدان مشاهده شده است (۲۲). بنابراین عصاره این گیاهی تواند موجب افزایش ر شد و تکامل فولیکول‌های تخمدانی و متعاقباً افزایش ترشح استروژن از سلول‌های فولیکولی، جلوگیری از آترزی فولیکولی و متعاقباً افزایش کیفیت تخمک در گروه موش‌های دیابتی دریافت‌کننده آلوئه‌ورا شود.

مطالعه ایمنوسیتوشیمیایی تخمک‌های استحصال‌شده از موش‌های پنج گروه آزمایشی، نشان داد که دیابت مادری موجب القای به‌هم‌ریختگی (دیس‌ارگانیزاسیون) دوک و عدم آرایش صحیح کروموزوم‌ها در تخمک می‌شود که با یافته‌های Qiang و همکاران همخوانی دارد. این واقعیت می‌تواند موجب افزایش نابرابری تخمک‌های دیابتی گردد (۷).

در این مطالعه بررسی بازآرایی فضایی دستگاه‌های میتوکندری در طی بلوغ می‌وزی، افزایش معنی‌دار درصد تخمک‌های واجد الگوی تجمعی دستگاه‌های میتوکندری را در تخمک‌های در موش‌های دیابتی نشان داد. نتایج حاکی از اثربخشی آلوئه‌ورا و انسولین در جلوگیری از تجمع این دستگاه‌ها در تخمک‌های موش‌های دیابتی می‌باشد. همچنین در تخمک‌های موش‌های دیابتی، دریافت آلوئه‌ورا و انسولین، توانستند درصد پراکندگی سلول‌های تخمک واجد دستگاه‌های میتوکندری با الگوی پری‌توبولار را به سطح گروه شاهد برگردانند. Qiang و همکاران (۲۰۰۹) اظهار کردند که الگوی توزیع میتوکندری‌ها در طی بلوغ می‌وزی در تخمک‌های موش‌های دیابتی نامنظم است، به‌علاوه درصد تجمع این اندامک‌ها هم در تخمک‌های مرحله GV و هم در تخمک‌های مرحله MII در موش‌های دیابتی، در مقایسه با گروه شاهد بیشتر گزارش شده است. این امر با افزایش عدم انسجام دوک تقسیم و آرایش صحیح کروموزوم‌ها بر روی آن در تخمک موش‌های دیابتی همراه می‌باشد (۷) که با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد. تیمار سلول‌های PC12 با آلوئه‌ورا نیز نشان داد که آسیب میتوکندریایی القاء شده با سدیم آزید تحت تأثیر این گیاه بهبود می‌یابد و آلوئه‌ورا می‌تواند حیات سلول‌هایی را که در معرض سدیم آزید قرار گرفته‌اند، افزایش دهد. همچنین آلوئه‌ورا از ساختار و عملکرد دستگاه‌های میتوکندری در مغز موش صحرایی محافظت می‌کند (۲۱). مشخص شده که ترکیب امودین موجود در آلوئه‌ورا،

و تخمک‌ها را در موش‌های دیابتی افزایش دهد. این ماده می‌تواند درصد سلول‌های تخمک آماده باروری را بالا برده و تأثیر دیابت بر تأخیر بلوغ این سلول‌ها را کاهش دهد. این نقایص در تخمک به دو روش می‌تواند به جنین آینده انتقال پیدا کند: در درجه اول، توسط نقایص دوک تقسیم و کروموزوم‌ها، که احتمالاً به دلیل تغییرات غیرطبیعی در ساختار و پراکندگی دستگاه‌های میتوکندری روی می‌دهد و می‌تواند منجر به آنوپلوئیدی در جنین شود. در درجه دوم، تغییرات در دستگاه‌های میتوکندری در تخمک که به جنین انتقال می‌یابد. بنابراین به دلیل نقش میتوکندری در تأمین انرژی سلول، رشد و تکوین جنین نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد. نقص در عملکرد دستگاه‌های میتوکندری و نقایص می‌وزی در سلول‌های تخمک، احتمالاً با مشکلات تولیدمثلی در موش و همچنین زنان مبتلا به دیابت تیپ II ارتباط تنگاتنگی دارد. با توجه به تأثیر آلوتهورا در تصحیح این نواقص، یافته‌های مطالعه حاضر می‌تواند پیامدهای بالینی برای بهبود کیفیت تخمک به دست آمده از زنان دیابتی داشته باشد، که البته استفاده از این نتایج به تحقیقات گسترده‌تر انسانی نیاز دارد.

## References:

1. Nelson RW. The text book of veterinary internal medicine disease of the Dog and Cat. 6<sup>th</sup> ed. Toronto: Saunders; 2005.P. 1563-91.
2. Wyman A, Pinto AB, Sheridan R, and Moley KH. One-cell zygote transfer from diabetic to nondiabetic mouse results in congenital malformations and growth retardation in offspring. *Endocrinology* 2008; 149(2): 466-9.
3. Garris DR, Garris BL. Diabetes (db/db) mutation-induced ovarian involution: progressive hypercytolipidemia. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228(9):1040-50.
4. Garris DR, Foreman D. Follicular growth and atresia during the last half of the luteal phase of the guinea pig estrous cycle: Relation to serum progesterone and estradiol levels and utero-ovarian blood flow. *Endocrinology* 1984; 115: 73-7.

موجب افزایش ظرفیت میتوکندری در جهت تولید ATP، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و همچنین حساسیت به آسیب رپرفیوژن بافتی-ایسکمی در قلب موش صحرائی می‌شود (۲۳). ترکیباتی از جمله ویتامین E و C، ترکیبات فنولی، ساپونین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در آلوتهورا وجود دارد که می‌تواند مسئول اثرات مهاری بر استرس اکسیداتیو ناشی از تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن متعاقب دیابت (۲۳) و در نتیجه مسئول بخشی از اثرات محافظتی آن بر کیفیت تخمک موش‌های دیابتی باشد.

به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عصاره ژل تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های کمی به دست آمده با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و پس‌آزمون LSD از نسخه شماره ۲۰ نرم‌افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در نهایت نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین (SEM) گزارش شد. از آزمون کروسکال والیس به‌عنوان روش آماری مورد استفاده جهت آنالیز پراکندگی دستگاه‌های میتوکندری در تخمک‌های مورد ارزیابی، استفاده شد. در مواردی که  $P < 0.05$  بود، تفاوت میانگین‌ها معنی‌دار تلقی گردید.

آلوتهورا می‌تواند هیپرگلیسمی ایجاد شده در اثر دیابت را تا حدودی تعدیل نماید. همچنین آلوتهورا می‌تواند تا حدودی کیفیت

5. Colton SA, Pieper GM, Downs SM. Altered meiotic regulation in oocytes from diabetic mice. *Biol Reprod* 2002;67(1):220-31.
6. Chang AS, Dale AN, Moley KH. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 2005;146(5):2445-53.
7. Qiang W, Ratchford AM, Chi MY, Schoeller E, Frolova A, Schedl T, et. al. Maternal Diabetes Causes Mitochondrial Dysfunction and Meiotic defects in murine oocytes. *Molecular Endocrinology* 2009; 23(10): 1603-12.
8. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence, *Theriogenology* 2009; 71: 836-48.
9. Van Blerkom J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of

- metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 2004;128(3):269–80.
10. Rajasekaran S, Ravi K, Sivagnanam K, Subramanian S. Beneficial effects of aloe vera leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33(3):232–7.
  11. Davis RH, Leitner MG, Russo JM. Aloe vera. A natural approach for treating wounds, edema, and pain in diabetes. *J Am Podiatr Med Assoc* 1988;78(2):60–8.
  12. Bolkent S, Akev N, Ozsoy N, Sengezer-Inceli M, Can A, Alper O, et al. Effect of Aloe vera (L.) *Burm. fil.* leaf gel and pulp extracts on kidney in type-II diabetic rat models. *Indian J Exp Biol* 2004;42(1):48–52.
  13. Hosseinifar S, Erfanimajid N, Morovvati H, Najafzadeh H. Aloe Vera Gel Protects Ovarian Structure in Diabetic Rat, American-Eurasian. *J Toxicol Sci* 2011; 3 (3): 197-203.
  14. Noor A, Gunasekaran S, Soosai MA, Vijayalakshmi MA. Antidiabetic activity of Aloe vera and histology of organs in streptozotocin-induced diabetic rats. *Current Sci Assoc* 2008; 94: 1070-6.
  15. Erfani Majd N, Bahrami M. Najafzadeh, H, Morovati H. The protective effect of aloe vera on histological and histometrical structure of diabetic rat testis. *Sci Res Iran Veterinary J* 2013;9(2):78–87.
  16. Podesta F, Romeo G, Liu WH, Krajewski S, Reed JC, Gerhardinger C, et al. Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 2000; 156: 1025–32.
  17. Romeo G, Liu WH, Asnaghi V, Kern TS, Lorenzi M. Activation of nuclear factor- $\kappa$ B induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes* 2002; 51: 2241-8.
  18. Aimee S, Chang A, Dale A and Moley KH. Maternal Diabetes Adversely Affects Preovulatory Oocyte Maturation, Development, and Granulosa Cell Apoptosis. *Endocrinology* 2005; 146(5): 2445–53.
  19. Cheng PP, Xia J, Wang HL, Chen JB, Wang FY, Zhang Y, et al. Islet transplantation reverses the effects of maternal diabetes on mouse oocytes. *Reproduction* 2011; 141: 417-24.
  20. Telefo PB, Moundipa FM, Tchouanguep FM. Inductive effect of the leaf mixture extract of *Aloe buettnei*, *Justicia insularis*, *Dicliptera verticillata* and *Hibiscus macranthus* on in vitro production of estradiol. *J Ethnopharmacol* 2004; 91(2): 225-30.
  21. Wang Y, Cao L, Du G. Protective effects of Aloe vera extract on mitochondria of neuronal cells and rat brain. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2010;35(3):364–8.
  22. Rengin K, Gullan A. Investigation of the effects of *Aloe barbadensis* on rat ovaries *J Med Food* 2009; 2(6): 1393-7.
  23. Sivagnanam S, and Subramanian KS. Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacolo Report* 2005; 57(1): 90-6.



## MORPHOMETRIC AND IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY OF OOCYTE MATURATION AND QUALITY OF DIABETIC MICE FOLLOWING ALOE VERA ADMINISTRATION

Mahsa Afrough<sup>1\*</sup>, Naeem Erfani Majd<sup>2</sup>, Hossein Najafzadeh Varzi<sup>3</sup>

Received: 20 Feb, 2016; Accepted: 24 Apr, 2016

### Abstract

**Background & Aims:** Diabetes mellitus is a metabolic disease which causes congenital anomalies and misabortion in females. Decrease in follicle growth and maturation and quality of oocytes occur in type 1 diabetes. The antidiabetic effect of Aloe vera is reported by several investigators. In this study, the effects of Aloe vera gel on diabetic mice oocyte were examined.

**Materials & Methods:** First, 25 mice were randomly divided into five groups including: control group (normal saline), Aloe vera group (350 mg/kg/day, by gavage), diabetic group (single dose of 190 mg/kg streptozotocin, IP), diabetic receiving Aloe vera (350 mg/kg/day, by gavage), and diabetic receiving insulin (1 IU/day, SC). All animals were superovulated after 3 weeks. Ovulated oocytes were collected from oviduct. Oocyte nuclear maturation and mitochondrial redistribution were investigated by microscopy and immunocytochemical methods.

**Results:** Diabetes led to a significant increase in spindle defects, chromosome misalignment, and mitochondrial redistribution changes ( $P < 0.05$ ). Aloe vera and insulin administration decreased these defects significantly ( $P < 0.05$ ). Maturation rate decreased in diabetic mice, but Aloe vera and insulin administration prevented the decrease significantly ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results show that diabetes damages oocyte maturation process and reduces maturation rate and oocyte quality which can cause infertility or subfertility, but Aloe vera administration reduced these defects significantly.

**Keywords:** Diabetes, Aloe vera, Mitochondria, Oocyte, Mice

**Address:** Shahid Chamran University of Ahvaz, Veterinary Faculty, Department of Histology

**Tel:** +986133332041

**Email:** m.afrough@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2016; 27(3): 186 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> PhD, Department of Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (Corresponding Author)

<sup>2</sup> Professor, Department of Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>3</sup> Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran