

## مطالعه مورفومتری و اینتوسیتیوشیمیایی کیفیت و بلوغ اwooسیت‌های موش‌های کوچک آزمایشگاهی دیابتی متعاقب تجویز آلوئه‌ورا

مهسا افروغ<sup>۱</sup>, نعیم عرفانی مجده<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 زوردرس بیشتر است. در مدل دیابت نوع ۱ اختلال رشد فولیکول‌ها، کاهش بلوغ و کیفیت تخمک مشاهده شده است. آلوئه‌ورا گیاهی است که خاصیت آنتی دیابتی دارد. هدف از مطالعه حاضر تأثیر ژل آلوئه‌ورا بر روند بلوغ تخمک‌های استحصال شده از موش کوچک آزمایشگاهی دیابتی می‌باشد.

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

**یافته‌ها:** دیابت موجب افزایش معنی‌دار ناهنجاری‌های دوک میوز، آرایش کروموزوم‌ها بر روی آن و تغییر در بازارایی فضایی میتوکندری‌ها در سیتوپلاسم گردید ( $P<0.05$ ). تجویز آلوئه‌ورا و انسولین توانست تا حدی از این افزایش جلوگیری کند ( $P<0.05$ ). به علاوه نرخ بلوغ می‌وزی نیز در گروه دیابتی کمتر بود و آلوئه‌ورا 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 ناباروری یا کاهش باروری گردد.

**کلیدواژه‌ها:** دیابت، آلوئه‌ورا، 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.afroug@gmail.com

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. یافته‌های نشان می‌دهد دیابت مادری می‌تواند اثرات امбриونی و جنینی پایدار و برگشت‌ناپذیری بر تولیدمثل جنس مؤنث داشته باشد. همچنین اختلال در فولیکولوژن، استروئیدوژن، عدم تخمک‌گذاری، سقط خودبه‌خودی، تخدمان پلی سیستیک و یائسگی زوردرس و غیره گزارش شده است<sup>(۲)</sup>. شیوع بالای اختلالات سیکل قائدگی و باروری در دیابت ملیتوس گزارش شده است. همچنین دیابت می‌تواند از

### مقدمه

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 درنتیجه آسیب سلول‌های بتای پانکراس ایجاد می‌شود. دیابت نوع ۲ براثر کاهش حساسیت بافت‌های محیطی به اثرات انسولین و به عبارت دیگر مقاومت به انسولین به وجود می‌آید<sup>(۱)</sup>.

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 تخدمان موش صحرایی نشان‌دهنده تأثیر حمایتی ژل آلوئهورا بر فولیکولوزنر و بافت تخدمان در مosh‌های صحرایی دیابتی شده به وسیله استرپتوزوتوسین می‌باشد. رسیدن سطح گلوکز خون به حد طبیعی، و افزایش وزن مosh‌های صحرایی و تخدمان آن‌ها متعاقبت تجویز ژل آلوئهورا نیز در مطالعه مذکور گزارش شده است(۱۳). هدف از مطالعه حاضر ارزیابی ژل آلوئهورا بر روند بلوغ و کیفیت تخمک‌های استحصال شده از مosh کوچک آزمایشگاهی دیابتی می‌باشد.

## مواد و روش کار

در این مطالعه ۲۵ سر مosh کوچک آزمایشگاهی از جنس ماده به ظاهر سالم به سن ۸-۱۰ هفته با وزن ۳۰-۲۵ گرم از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور تهیه شدند. حیوانات تحت شرایط دمایی  $22\pm 2$  درجه سانتی گراد 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. مosh‌ها 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 به عنوان شاهد روزانه نرمال سالین دریافت کرد. گروه دوم روزانه  $350 \text{ mg/kg}$  آلوئهورا به صورت گاواز دریافت کرد. گروه سوم دیابتی (پس از دریافت تک دوز  $190 \text{ mg/kg}$  استرپتوزوتوسین (STZ) دیابتی شدند(۷)، قند خون مosh‌ها بالاتر از  $300 \text{ mg/dl}$  به عنوان معیار دیابتی شدن در نظر گرفته شد)، گروه چهارم دیابتی دریافت‌کننده آلوئهورا (مشابه گروه سوم دیابتی، شده و  $350 \text{ mg/kg/day}$  آلوئهورا به صورت گاواز دریافت کردند)، گروه پنجم دیابتی دریافت‌کننده انسولین آلوئهورا (مشابه گروه سوم دیابتی شده و  $1 \text{ mg/kg/day}$  انسولین به صورت داخل صفاقی دریافت کردند). در این مطالعه ژل آلوئهورا از شرکت باریج انسانس (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 اندازه گیری شد. در انتهای دوره آزمایش، با استفاده از هورمون‌های PMSG و hCG به میزان ۱۰ واحد، سوپراولولاسیون صورت گرفت(۷).

پاسخ طبیعی بافت تخدمان به FSH جلوگیری کند. این اختلال از عملکرد طبیعی رشد فولیکولی در پرواستروس جلوگیری می‌کند و می‌تواند منجر به افزایش فولیکول‌های آتزی و کاهش قطر فولیکول‌ها شود(۳،۴). موقع ناهنجاری‌های مادرزادی در رویان‌های بدست‌آمده از مosh‌های دیابتی که به مosh غیر دیابتی انتقال داده شده بودند، بیانگر این مطلب است که قرار گرفتن در معرض دیابت مادری در طی اوزن، لقاد 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 استرولیدوزنر تخدمان، افزایش آپوپتوس 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 لقاد و حتی بیماری‌های متابولیکی نوزاد آتی مستعد سازد. در مosh کوچک آزمایشگاهی اغلب اوسوستیت‌های طبیعی متافاز ۲ دارای دوک بشکه‌ای شکل و کروموزوم‌های ردیف شده بر روی صفحه متافازی می‌باشند. دیابت مادری سبب القای بهم‌ریختگی (دیس‌ارگانیزاسیون) دوک و عدم آرایش صحیح کروموزوم‌ها در اوسوستیت می‌شود(۷) که موجب افزایش ناباروری اوسوستیت‌های دیابتی می‌شود.

بلوغ اوسوستیت شامل بلوغ هسته و بلوغ سیتوپلاسمی می‌باشد. این دو فرایند ارتباط نزدیکی با یکدیگر دارند. یکی از ارگانلهایی که در فعل سازی مسیرهای متابولیکی معین در سنتز پروتئین‌ها و فسفوپلاسیون 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 اوسوستیت مosh نشان می‌دهد که در اوسوستیت‌های 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 اوسوستیت‌های متافاز II با استقرار در اطراف دوک مشخص می‌گردد. مرحله بینابینی مابین نابالغ و بالغ به صورت پراکنده یکنواخت در سیتوپلاسم مشاهده می‌شود(۸،۹). این الگوی پراکنده در اوسوستیت‌های مosh‌های دیابتی به هم می‌ریزد. تغییرات الگوی توزیع میتوکندری تغییر مکان تأخیری یا ناکارآمد میتوکندری‌ها را در اوسوستیت مosh‌های دیابتی نشان می‌دهد(۷).

اخیراً به دلیل پیشگیری از اثرات جانبی داروهای سنتیک، 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 آmodin، آلوئه، باربالوئین، استرولوها و آسمانان) در ژل و پوست برگ‌های آن

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

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های کمی به دست آمده با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (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 کروスکال والیس به عنوان روش آماری مورداستفاده جهت آنالیز پراکنده‌ی دستگاه‌های میتوکندری در تخمک‌های مورد ارزیابی، استفاده شد. در مواردی که  $P < 0.05$  بود، تفاوت میانگین‌ها معنی‌دار تلقی گردید.

### یافته‌ها

قند خون: در این تحقیق قند خون در پایان هفته اول، دوم و سوم دوره آزمایش در سطح معنی‌داری متفاوت بود ( $P < 0.01$ ). بیشترین میزان قند خون به موش‌های دیابتی تعلق داشت. داده‌ها بیانگر این مطلب است که دریافت آلوئه‌ورا و انسولین در موش‌های دیابتی تا حدی از افزایش قند خون جلوگیری کرده است، اما هنوز با گروه شاهد فاصله معنی‌داری دارد.

بلغ تخمک: بلوغ تخمک‌های استحصلال شده از نظر بلوغ هسته و رسیدن به مرحله متافاز II (MII) در همه گروه‌های موردمطالعه بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که نرخ بلوغ تخمک‌های استحصلال شده از موش‌های گروه دیابتی در مقایسه با گروه شاهد و گروه شاهد دریافت کننده آلوئه‌ورا در سطح معنی‌داری کاهش یافته است. در یافت آلوئه‌ورا و انسولین موجب از کاهش نرخ بلوغ تخمک‌های جمع آوری شده از موش‌های دیابتی به طور موقفيت‌آمیزی ممانعت کرد.

آرایش و سازمان‌دهی دوک تقسیم و آرایش کروموزوم‌ها بر روی آن: نقايس آرایش و سازمان‌دهی دوک تقسیم میوز به صورت دوک چندقطبی و گسیختگی در آرایش و سازمان‌دهی دوک (تصویر A) مشاهده شدند. بررسی‌ها بیانگر افزایش میانگین نقايس آرایش و سازمان‌دهی دوک در تخمک‌های استحصلال شده از موش‌های گروه‌های دیابتی در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی بود. گروه‌های دیابتی دریافت کننده آلوئه‌ورا و انسولین نسبت به گروه شاهد و دیابتی نقايس آرایش و سازمان‌دهی دوک به ترتیب بیشتر و کمتر را نشان دادند. بین میانگین نقايس سازمان‌دهی دوک در تخمک‌های استحصلال شده از موش‌های دیابتی دریافت کننده آلوئه‌ورا و انسولین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج نشان می‌دهد که آلوئه‌ورا و انسولین نتوانستند میانگین نقايس آرایش و سازمان‌دهی دوک تقسیم را در تخمک‌های

بهاین 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 کلروفرم، به روش جابه‌جایی مهره گردن آسان کشی شده، تخمک‌ها از اویداکت جمع‌آوری شدند. تخمک‌های استحصلال 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 نبالغ مرحله GV اغلب در حالت باز و پراکنده قرار دارند و در حال نسخه‌برداری می‌باشند و تخمک دارای یک وزیکول ژرمنیال 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 متألف از دوک تقسیم مستقر می‌شوند.

در این مطالعه تخمک‌های بالغ (متافاز II) دارای ظاهر طبیعی جهت آماده‌سازی برای رنگ‌آمیزی اینتوسیتوشیمی به محلول ثبوتی پارافرم آلدھید ۴٪ انتقال یافتند. رنگ‌آمیزی میکروتوبول و کروموزوم؛ تخمک‌ها پس از شستشو مدت ۳۰ دقیقه، در بافر آنتی بادی PBS، ۳ درصد، Tritonx-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, FITC, USA) 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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  جهت رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها قرار داده شدند. تخمک‌ها پس از شستشوی مجدد در بافر PBS بر روی لام مانت شده و با FITC از میکروسکوپ فلوروسنس و با فیلترهای Hoechst موردنبررسی 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.

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

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

استحسان شده از موش‌های دیابتی در سطح گروه شاهد بهبود بخشدند (جدول ۳).

نقایص کروموزومی: نقایص کروموزومی از جمله جدانشدن کروموزوم‌ها به شیوه صحیح، باقی ماندن یک یا چند کروموزوم (D, F) یا عدم فرارگیری بر صفحه متافازی دوک ته سیم (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 آلوئه‌ورا و انسولین به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد اما به سطح گروه شاهد نمی‌رسد (جدول ۳).

با آرایی فضایی دستگاه‌های میتوکندری: افزایش درصد تخمک‌های واحد الگوی تجمعی دستگاه‌های میتوکندری (تصویر

**جدول (۱): میانگین و خطای استاندارد قند خون در گروه‌های موردمطالعه**

گروه	قند خون پیش از تجویز STZ (شروع دیابتی)	قند خون پیش از تجویز STZ (ماند)	قند خون یک هفته پس از پس از دیابتی شدن	قند خون یک هفته پس از 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>	۱۰/۴/۴۶±۴/۴۹ <sup>a</sup>	۱۰/۵/۶۶±۵/۹۶ <sup>a</sup>	۱۰/۷/۲۷±۴/۷۱ <sup>a</sup>
آلوئه‌ورا	۱۰/۶/۸۶±۵/۲۹ <sup>a</sup>	۱۱۸/۷۱±۶/۵۳ <sup>b</sup>	۱۰/۵/۷۱±۲/۸۹ <sup>a</sup>	۱۰/۷/۹۲±۲/۱۷ <sup>a</sup>	۹/۴/۴۳±۴/۲۲ <sup>a</sup>
دیابتی	۱۰/۴/۱۱±۷/۷۸ <sup>a</sup>	۵/۲۵/۷۸±۲۴/۶۵ <sup>a</sup>	۵/۱۶/۳۳±۲۵/۰۵ <sup>b</sup>	۴/۸۸/۸۸±۳۰/۱۰ <sup>b</sup>	۵/۵۰/±۲۵/۶۷ <sup>b</sup>
دیابتی+آلوئه ورا	۱۰/۵±۶/۸۴ <sup>a</sup>	۵/۱۷/۰۸±۱۷/۹۲ <sup>a</sup>	۳/۰/۹۵±۱۷/۵۴ <sup>c</sup>	۲/۸۶/۸۸±۲۳/۰۰ <sup>c</sup>	۳/۴۷±۱۲/۳۶ <sup>c</sup>
دیابتی+انسولین	۱۱۳/۲۲±۱۰/۰۵ <sup>a</sup>	۵/۶۵/۷۸±۴۲/۷۳ <sup>a</sup>	۲/۵۶/۴±۲۶/۶۹ <sup>d</sup>	۲/۷۰/۰۰±۲۷/۷۴ <sup>c</sup>	۴/۰/۱±۱۵/۰۳ <sup>d</sup>

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

**جدول (۲): میانگین درصد اوسویت‌های بالغ طبیعی و غیرطبیعی (ناهنجاری‌های دوک تقسیم و آرایش کروموزومی) بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و ایمنوستوشاپیمی در گروه‌های موردمطالعه**

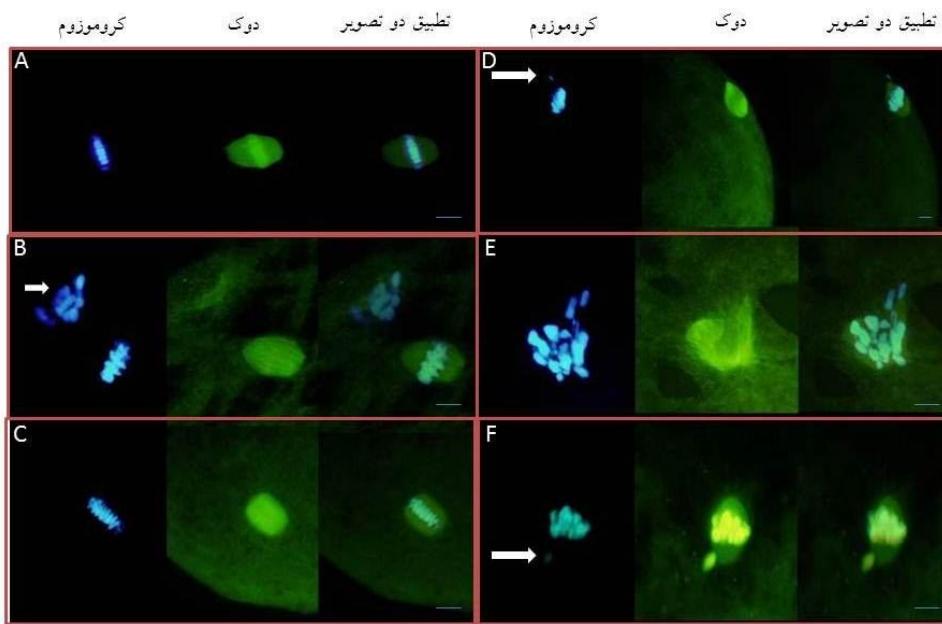
گروه	شاهد	آلوئه‌ورا	دیابتی	دیابتی+آلوئه‌ورا	دیابتی+انسولین
اووسیت MII طبیعی	۹۴/۲۳±۹۵/۱۴ <sup>a</sup>	۹۱/۳۷±۱/۷۷ <sup>a</sup>	۵/۱/۱۱±۸/۸۹ <sup>b</sup>	۸/۴/۰/۵±۲/۷۲ <sup>c</sup>	۸/۲/۵۹±۲/۰۱ <sup>c</sup>
اووسیت MII غیرطبیعی	۵/۷۶±۲/۱۳ <sup>a</sup>	۶/۵۶±۰/۶۱ <sup>a</sup>	۴/۳/۴۵±۲/۶۲ <sup>b</sup>	۲/۲/۶۶±۲/۲۸ <sup>c</sup>	۲/۹/۸/۱±۸/۴۹ <sup>c</sup>
نقص در آرایش کروموزومی	۳/۲/۲±۱/۲۷ <sup>a</sup>	۵/۲/۱±۱/۸۰ <sup>a</sup>	۳/۵/۵۵±۱۵/۵۵ <sup>b</sup>	۱/۰/۷۶±۰/۵۲ <sup>a</sup>	۱/۲/۴۵±۲/۴۰ <sup>a</sup>
نقص در آرایش و سازمان‌دهی دوک	۳/۲/۵±۱/۲۷ <sup>a</sup>	۳/۳/۹±۱/۱۷ <sup>a</sup>	۲/۴/۴۴±۴/۴۴ <sup>b</sup>	۱/۲/۵۱±۱/۷۱ <sup>c</sup>	۱/۵/۰/۱±۱/۳۶ <sup>c</sup>

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

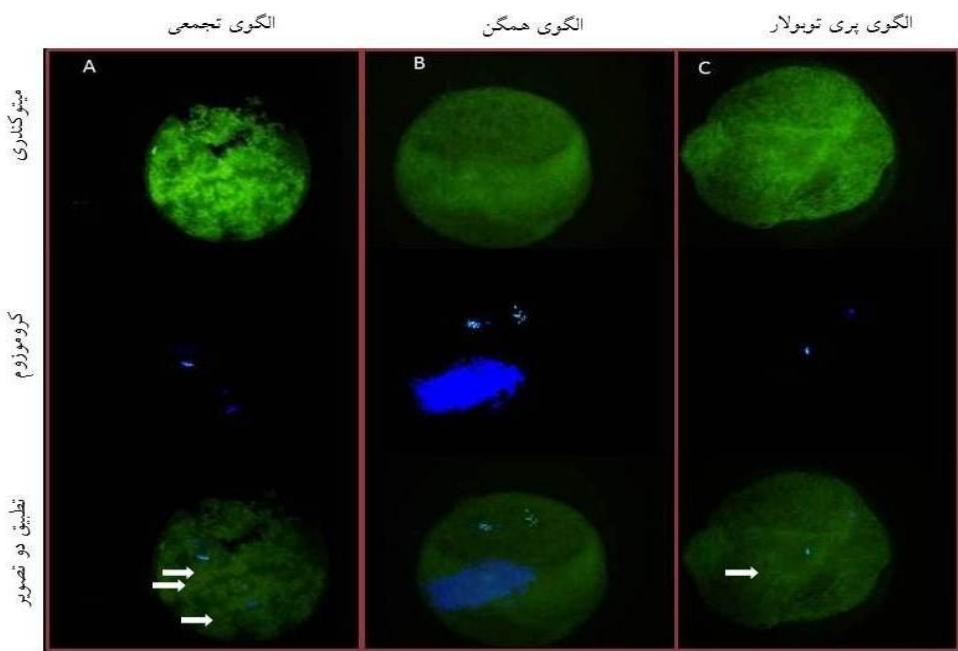
**جدول (۳): مقدار میانگین درصد الگوی پراکنده‌ی میتوکندری در اووسیت ± خطای معيار در گروه‌های موردمطالعه**

گروه	الگوی پراکنده‌ی میتوکندری	تجمعی	همگن	پری‌توبولار
شاهد	۷/۱۴±۴/۱۲ <sup>a</sup>	۲/۳/۲۱±۵/۵۹ <sup>a</sup>	۶۹/۶۴±۵/۴۰ <sup>a</sup>	۶۹/۶۴±۵/۴۰ <sup>a</sup>
آلوئه‌ورا	۷/۱۴±۵/۱۲ <sup>a</sup>	۲/۷/۳۸±۴/۵۰ <sup>a</sup>	۶۵/۴۷±۲/۲۹ <sup>a</sup>	۶۵/۴۷±۲/۲۹ <sup>a</sup>
دیابتی	۳۰/۵۵±۲/۷۰ <sup>b</sup>	۳/۸/۸۸±۵/۵۵ <sup>a</sup>	۳۰/۵۵±۴/۱۲ <sup>b</sup>	۳۰/۵۵±۴/۱۲ <sup>b</sup>
دیابتی+آلوئه ورا	۴/۵۰±۴/۵ <sup>a</sup>	۴/۰/۸۱±۵/۰۸ <sup>a</sup>	۵۴/۶۸±۲/۹۰ <sup>a</sup>	۵۴/۶۸±۲/۹۰ <sup>a</sup>
دیابتی+انسولین	۰ <sup>a</sup>	۳/۳/۳۳±۰/۰ <sup>a</sup>	۶۶/۶۶±۰/۰ <sup>a</sup>	۶۶/۶۶±۰/۰ <sup>a</sup>

حرروف 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 آلوئه‌ورا (B)، سالم دریافت‌کننده انسولین (C) و موش دیابتی (D، E و F). در تخمک MII آزادشده از موش‌های گروه شاهد، دوک تقسیم بشکه‌ای 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 سفیدرنگ در D و F) قابل مشاهده می‌باشد (رنگ‌آمیزی آنتی‌بادی بتا توبولین، 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 (پیکام سفیدرنگ در تصویر C) در تخمک متافاز II موش سالم قابل توجه می‌باشد. ضمناً موقعیت کروموزومها نیز در هر یک قابل مشاهده می‌باشد (رنگ‌آمیزی میتوترک سبز جهت قابل مشاهده شده دستگاه‌های میتوکندری (سبز) و رنگ‌آمیزی Hoechst (آبی)، جهت قابل مشاهده شدن کروموزومها (آبی)، بار =  $200 \times$ ).

## بحث و نتیجه گیری

کروموزومها قادر به جدا شدن صحیح نمی‌باشند (۵، ۷ و ۱۹). به نظر می‌رسد آلوئه‌ورا با کاهش نسبی قند خون توانسته تا حدی بر این مورد تأثیرات مثبت بگذارد. به علاوه گیاه آلوئه‌ورا حاوی ترکیباتی از جمله بتا سیتواسترول و فیتواستروزون است که استروئیدوزن 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 رشد و تکامل فولیکول‌های تخمدانی و متعاقباً افزایش ترشح استروژن از سلول‌های فولیکولی، جلوگیری از آنزیزی فولیکولی و متعاقباً افزایش کیفیت تخمک در گروه موش‌های دیابتی دریافت‌کننده آلوئه‌ورا شود.

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

در این مطالعه بررسی بازآرایی فضایی دستگاه‌های میتوکندری در طی بلوغ می‌وزی، افزایش معنی‌دار درصد تخمک‌های واحد 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 واحد 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، به علاوه 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 میتوکندری‌ای 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). شخص شده که ترکیب امودین موجود در آلوئه‌ورا،

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 موربدبر سی 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). Erfani Majd و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که مصرف خوراکی ژل آلوئه‌ورا به میزان  $1391\text{ mg/kg}$  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 تخربشده، یا تکثیر سلول‌های بتا باقیمانده در پانکراس (۱۴) یا افزایش ترشح انسولین از سلول‌های بتا باقیمانده در پانکراس (۱۰) موجب کاهش قند خون گردد. به علاوه آلوئه‌ورا می‌تواند خاصیت شبه انسولینی داشته باشد یا باعث افزایش برداشت گلوكز از بافت‌های محیطی یا مهار تولید آن از طریق گلوكونფوزن کبدی (۱۴) و درنتیجه 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 به علاوه کاهش کیفیت تخمک نیز شود، زیرا که با آسیب به متابولیسم انرژی، کیفیت و شایستگی بلوغ می‌وزی در تخمک کاهش می‌یابد (۱۸). مشخص شده که دیابت باعث کاهش قابل ملاحظه روند تخمک گذاری و یا قطع روند رشد فولیکولی در تخمدان می‌شود. تغییرات اعمال شده توسط دیابت در سطح فیزیولوژی سلول تخمک نیز قابل مشاهده 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، در حالی که 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

و تخمک‌ها را در موش‌های دیابتی افزایش دهد. این ماده می‌تواند در صد سلول‌های تخمک آماده باروری را بالابرده و تأثیر دیابت بر تأخیر بلوغ این سلول‌ها را کاهش دهد. این نتایج در تخمک به دو روش می‌تواند به جنین آینده انتقال پیدا کند: در درجه اول، توسط نتایج دوک تقسیم و کروموزوم‌ها، که احتمالاً به دلیل تغییرات غیرطبیعی در ساختار و پراکندگی دستگاه‌های میتوکندری روی می‌دهد و می‌تواند منجر به آنپلوفیدی 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 نتایج می‌وزی در سلول‌های تخمک، احتمالاً با مشکلات تولیدمثلی در موش و همچنین زنان مبتلا به دیابت تیپ ۲ آرتباط تنگاتنگی دارد. با توجه به تأثیر آلوئه‌ورا 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.

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

به طور 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 درنهایت نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین (SEM) گزارش شد. از آزمون کروسکال والیس به عنوان روش آماری مورد استفاده جهت آنالیز پراکندگی دستگاه‌های میتوکندری در تخمک‌های مورد ارزیابی، استفاده شد. در مواردی که  $P < 0.05$  بود، تفاوت میانگین‌ها معنی دار تلقی گردید.

آلوئه‌ورا می‌تواند هیبرگلایسمی ایجاد شده در اثر دیابت را تا حدودی تعديل نماید. همچنین آلوئه‌ورا می‌تواند تا حدودی کیفیت

## References:

- Nelson RW. The text book of veterinary internal medicin disease of the Dog and Cat. 6<sup>th</sup> ed. Toronto: Saunders; 2005.P. 1563-91.
- 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.
- Garris DR, Garris BL. Diabetes (db/db) mutation-induced ovarian involution: progressive hypercytolipidemia. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228(9):1040-50.
- 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.
- Colton SA, Pieper GM, Downs SM. Altered meiotic regulation in oocytes from diabetic mice. *Biol Reprod* 2002;67(1):220-31.
- Chang AS, Dale AN, Moley KH. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 2005;146(5):2445-53.
- 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.
- 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.
- Van Blaricom 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. Hosseini Far S, Erfanimajd 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, Morovvati 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