

## *Effect of Omega-3 on Ovarian Tissue and Blastocyst Formation on Diabetic Rats In Vitro*

Maryam Shahi<sup>1</sup>,  
Vahid Nejati<sup>2</sup>,  
Gholamreza Najafi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc Student in Embryology and Histology, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received July 23, 2016 ; Accepted October 10, 2016)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Diabetes is one of the major factors that affects fertility and ovulation and can disrupt the formation of fetus. Omega-3 polyunsaturated fatty acids might be able to improve the quality of the embryo in maturation of oocytes. The aim of this study was to investigate the effects of omega-3 on ovarian tissue and the development of blastocysts in diabetic rats.

**Materials and methods:** In this study, 32 adult female rats were divided into 4 groups (n= 8 per group) including controls, diabetic, diabetic+ Omega-3 (300mg/kg /day), and diabetic+ Omega-3 (600mg/kg/day). Diabetes was induced by intraperitoneal injections of Streptozotocin (50 mg/kg). Omega-3 was administered by gavage for 45 days. Then PMSG (IU, IP25) was injected and 54 hours later HCG (IU, IP25) was injected. Afterwards, the ovarian samples were used in vitro fertilization.

**Results:** Compared with the control group, diabetes significantly reduced the percentage of healthy follicles, percentage of zygote, two cell embryos, blastocysts, and hatching embryos ( $P<0.05$ ). Data analysis revealed that administration of omega-3 fatty acids in diabetic rats increased the percentage of healthy follicles and parameters associated with fertilization and embryo development in vitro compared with the diabetic group that did not receive omega-3 ( $P< 0.05$ ).

**Conclusion:** Due to the harmful effects of diabetes on pregnancy, omega-3 fatty acids has the ability to inhibit the adverse effects of diabetes on the ovaries, thereby increasing the chances of fertility.

**Keywords:** diabetes, ovary, oocyte, omega-3, in vitro fertilization

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (145): 176-185 (Persian).

## بررسی اثر امگا-۳ بر روی بافت تخمدان و تشکیل بلاستوسیت در موش‌های دیابتی در لقاح آزمایشگاهی

مریم شاهی<sup>۱</sup>  
وحید نجاتی<sup>۲</sup>  
غلامرضا نجفی<sup>۳</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** دیابت یکی از عوامل تعیین کننده در باروری است که می‌تواند باعث ایجاد اختلال در تخمک گذاری و تشکیل جنین گردد. ممکن است اسیدچرب غیر اشباع امگا-۳ بتواند میزان بلوغ آزمایشگاهی تخمک و کیفیت تشکیل جنین را بهبود بخشد. هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر امگا-۳ بر بافت تخمدان و تکوین بلاستوسیت‌های موش‌های دیابتی در شرایط آزمایشگاهی است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ۳۲ رت ماده بالغ به ۴ گروه ۸ تایی، کنترل سالم، دیابتی، دیابتی به همراه ۳۰۰ mg/kg/day و دیابتی به همراه ۶۰۰ mg/kg/day تقسیم شدند. دیابت با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (۵۰ mg/kg) القا شد و رت‌ها ۴۵ روز امگا-۳ گاوآژ شدند. سپس هورمون PMSG (۲۵IU,IP) تزریق شد و بعد از ۵۴ ساعت هورمون HCG (۲۵IU,IP) تزریق شد و نمونه‌های تخمدان جهت لقاح داخل آزمایشگاهی استفاده شد.

**یافته‌ها:** دیابت به شکل معنی داری باعث کاهش میانگین درصد فولیکول‌های سالم، درصد زیگوت، جنین‌های دوسلولی، بلاستوسیت‌ها و جنین‌های هیچینگ شده درمقایسه با گروه کنترل گردیده است ( $p < 0/05$ ). با آنالیز داده‌ها مشخص شد که تجویز اسیدهای چرب امگا-۳ بر روی موش‌های دیابتی، درصد فولیکول‌های سالم و پارامترهای مرتبط با لقاح و ورشد جنین را در شرایط *in vitro* نسبت به گروه دیابتی افزایش می‌دهد ( $p < 0/05$ ).

**استنتاج:** با توجه به اثرات تخریبی دیابت بر توان باروری، امگا-۳ قابلیت مهار اثرات سوء دیابت را بر روی تخمدان دارا بوده موجب افزایش لقاح و توان باروری می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** دیابت، تخمدان، اووسیت، امگا-۳، لقاح آزمایشگاهی

### مقدمه

شوند(۱). دیابت با ایجاد عوارض عروقی کوچک و بزرگ، تقریباً بر تمام ارگان‌ها و سیستم‌های بدن تاثیر گذار است(۲)؛ یکی از عوارض مهم دیابت، اختلال در باروری است به طوری که حدود ۹۰ درصد زنان و

در سال ۲۰۱۱، حدود ۷ درصد از جمعیت دنیا مبتلا به دیابت بوده‌اند که ۸۰ درصد از این افراد در کشورهای در حال توسعه زندگی می‌کنند، تخمین زده می‌شود که تا سال ۲۰۳۰ این حدود ۸/۳ درصد جمعیت دنیا را شامل

Email: merilla.shahi@yahoo.com

مؤلف مسئول: مریم شاهی - ارومیه: دانشگاه ارومیه

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد جنین‌شناسی و بافت‌شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. دانشیار، گروه آناتومی و جنین‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

✉ تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۵/۱۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۷/۱۹

مردان مبتلا به دیابت از اختلال در عملکرد دستگاه تولید مثل به صورت‌های مختلف رنج می‌برند که از آن جمله می‌توان به کاهش میل جنسی و کاهش باروری اشاره کرد (۳). مطالعات در دو دهه اخیر نشان می‌دهد که، مقاومت به انسولین و هیپرانسولینمی نقش مهمی را در پاتوژنز تخمدان بازی می‌کند به علاوه زنان مبتلا به سندرم‌های تخمدانی در ترشح انسولین از سلول‌های بتا نقص دارند (۴). دیابت ترشح گنادوتروپین‌ها را متوقف کرده و بنابراین تولید مثل را مهار می‌کند. استرس اکسیداتیو که در بیماری‌زایی تخمدان (ناباروری) نقش مؤثری دارد؛ نوعی عدم تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد و دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن است و احتمالاً در افزایش تولید انسولین و آندوژن‌ها در تخمدان و اختلال در تولید فولیکول‌ها دخالت دارد (۵،۶). گونه‌های اکسیژن فعال در مدولاسیون، طیف وسیعی از عملکردهای فیزیولوژیکی باروری از قبیل بلوغ تخمک، استروئیدوژنز تخمدان، تخمک‌گذاری، لانه‌گزینی، تشکیل بلاستوسیت و عملکرد جسم زرد شرکت دارند (۷) دیابت باعث کاهش سطح هورمون اکسیداز در مایع فولیکولی یا افزایش غلظت بالای رادیکال سوپراکسیداز<sup>۱</sup> می‌شود که تخریب فولیکولی را به همراه دارد (۸).

این در حالی است که اسیدهای چرب امگا-۳ یک اثر آنتی‌کوآگولان دارند و از نظر کالری نسبتاً بالا هستند. اردوگان پیشنهاد می‌کند که اسیدهای چرب امگا-۳ می‌توانند، سطح کاتالاز را در پراکسی زوم‌ها و سیتوپلاسم افزایش و بنابراین، موجب بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی شوند (۹). تجویز آنتی‌اکسیدان‌ها نه تنها می‌تواند باعث بهبود پارامترهای کیفی و کمی تخمک شود، بلکه می‌تواند به‌طور چشم‌گیری مانع از آسیب DNA تخمک نیز گردد (۱۰). مکانسیم اثر امگا-۳ در مقابل دیابت، به عنوان آنتی‌اکسیدان، در کاهش تولید ROS و بهبود توانایی تکامل جنین در محیط *in vitro* تایید شده است (۱۱،۱۲). اسیدهای چرب غیر اشباع

امگا-۳ از بهترین آنتی‌اکسیدان‌هایی هستند که دارای خصوصیات ضدالتهابی، ضد ترومبوز و ضد آریتمی همراه با کاهش فشارخون و غلظت سطح تری‌گلیسرید خون هستند که می‌توانند با ROS مقابله کنند (۱۳،۱۴) مصرف منظم امگا-۳ فواید متعددی مشتمل بر پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی و التهابی دارد و می‌تواند نقش کلیدی در پیشگیری و کنترل دیابت و مقاومت به انسولین ایفا کند (۱۷-۱۵). مکانسیم دقیق اثر مصرف اسیدهای چرب امگا-۳ هنوز کاملاً روشن نیست ولی در مطالعه کساولو و همکاران مشاهده شد که مصرف یک ماه مکمل امگا-۳، اثرات سودمندی بر پروفایل لیپیدی، پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بیماران دیابتی دارد (۱۸). هم‌چنین اسیدهای چرب امگا-۳ سبب افزایش آزادسازی فسفولیپازهای D از غشاء می‌شوند، که منجر به فعال‌سازی خاصیت ضد تکثیر در سلول‌های لنفوتیدی می‌گردد (۱۹). با توجه به اثرات اسیدهای چرب امگا-۳، اهمیت تخمدان در فیزیولوژی بدن و باروری و اثرات سوء دیابت بر باروری، هدف مطالعه حاضر بررسی میزان تاثیر اسیدهای چرب امگا-۳ بر روی بافت تخمدان و لقاح داخل آزمایشگاهی در رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین است.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه از تعداد ۳۲ موش رت ماده بالغ نژاد ویستار با وزن متوسط  $17 \pm 150$  گرم استفاده شد. حیوانات از مرکز نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده علوم و تحقیقات دانشگاه ارومیه تهیه شدند و در تمام طول این مطالعه، حیوانات مذکور در حیوان‌خانه مجهز به سیستم تهویه با دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتیگراد، رطوبت ۴۵ درصد و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. آب و غذا بدون محدودیت در اختیار رت‌ها قرار گرفت. بعد از دو هفته

1. superoxide radical

شده جهت استفاده در لقاح ( $1 \times 10^6$  mIHF medium) است. روش تخمک‌گذاری و لقاح داخل آزمایشگاهی پس از القای تخمک‌گذاری توسط HCG تخمک‌های به دست آمده از نظر مورفولوژی ارزیابی شدند. ابتدا به هر کدام از رت‌های ماده بالغ، ۲۵ واحد بین‌المللی گنادوتروپین سرم مادیان آبیستن (PMSG) (۵۰۰۰ PMSG (ECG) واحد (IU)، شرکت هیپرااسپانیا) به شکل داخل صفاقی تزریق گردید. ۵۴ ساعت بعد از تزریق PMSG، که غلظت آن به حداکثر رسید و باعث تحریک رشد فولیکول و افزایش اولاسیون شد (۱۹) به هر رت، ۱۵ واحد بین‌المللی هورمون<sup>۲</sup> (HCG) (از شرکت organon هلند)، به شکل داخل صفاقی تزریق شد بدین طریق موش‌ها تحریک تخمک‌گذاری شدند. متعاقباً ۱۵ ساعت، رت‌ها بیهوش شده و شکم آن‌ها در شرایط استریل باز شد (۳۹) و اویداکت به همراه قسمت کوچکی از شاخ رحم به محیط کشت (mRICEM) انتقال یافت. تخمک‌ها از آمپول اویداکت با استفاده از روش دیسکت کردن توسط سر سوزن انسولینی برداشته شدند. تخمک‌ها پس از شست و شو با محیط (mRICEM)، به قطرات لقاح ۵۰۰ میکرولیتری در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت (mRICEM) منتقل شدند. سپس اسپرم‌هایی که مرحله ظرفیت‌یابی را طی نموده بودند، به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت به قطرات محیط کشت لقاح افزوده شدند. عمل لقاح حدود ۴ تا ۶ ساعت پس از اضافه کردن اسپرم‌ها با مشاهده دو پیش‌هسته نر و ماده مورد ارزیابی قرار گرفت. زیگوت‌ها بعد از شست و شو، به محیط کشت تازه منتقل شدند و ۲۴ ساعت پس از لقاح، درصد جنین‌های دو سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس در روزهای ۴ تا ۵، درصد بلاستوسیت‌ها و جنین‌های همچنین شده ارزیابی شد. هم‌چنین جهت بررسی بافت تخمدان، تخمدان چپ رت‌هایی که هورمون‌های PMSG و HCG را دریافت نکرده و در فاز استروس

رت‌ها به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه A رت‌های کنترل، گروه B: رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین<sup>۱</sup> (stz)، گروه C: رت‌های دیابتی شده که  $300 \text{ mg/kg/day}$  امگا-۳ را دریافت نمودند (۳۸) و گروه D: رت‌های دیابتی شده که  $600 \text{ mg/kg/day}$  امگا-۳ را روزانه به صورت خوراکی توسط دستگاه گاوژ دریافت کردند. القای دیابت با تزریق داخل صفاقی  $50 \text{ mg/kg.b.w}$  استرپتوزوتوسین، حل شده در بافر سیترات M  $0.05$  با  $4/5 \text{ PH}$  انجام شد و به رت‌های ناشتای گروه c، مقدار  $1 \text{ ml}$  سیترات بافر به همان روش تزریق شد. پس از تزریق، حیوانات به قفس‌های خود برگردانده و آب و غذا به صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار گرفت. سنجش قند خون برای تشخیص القای دیابت، ۷۲ ساعت پس از تزریق stz، با استفاده از خون سیاهرگ دمی، به کمک کیت گلوکومتر انجام شد. موش‌هایی با قند خون بیش از  $220 \text{ mg/dl}$  به عنوان دیابتی در نظر گرفته (۱۳). هم‌چنین تیمار با محلول امگا-۳ ( $180 \text{ mg EPA} : \text{Omega-3 } 1000 \text{ mg}$ ) و  $120 \text{ mg DHA}$ ، ELG کانادا، از زمان تشخیص القای دیابت آغاز شد و به مدت ۴۵ روز از طریق گاوژ ادامه یافت.

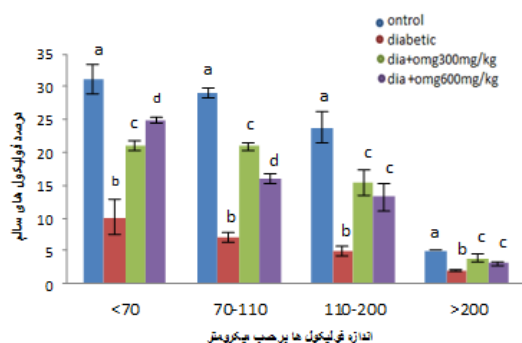
#### روش تهیه اسپرم

برای تهیه اسپرم، ابتدا رت‌ها با استفاده از کتامین وزایلازین بیهوش شده سپس توسط جابه‌جایی مهره‌های گردنی آسان کشتی شدند. پوست ناحیه شکمی با اتانول ۷۰ درصد استریل گردید. پس از ایجاد برش در ناحیه شکم، دم اپیدیدیم از بیضه جدا شد و بعد از چند برش در آن، به اپندورف استریل حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت (mRICEM) منتقل شد، سپس اپندورف‌ها به انکوباتور با  $5 \text{ CO}_2$  درصد و دمای  $37$  درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. بعد از گذشت ۶۰ دقیقه، اسپرم‌های شده در محیط کشت، برای لقاح تخمک‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. لازم به یادآوری است که میزان اسپرم گرفته

2. Human chorionic gonadotropin

1. Streptozotocin

فولیکول‌های آنترال بزرگ (>۲۰۰) در گروه دیابتی، نسبت به گروه کنترل سالم به طور معنی‌داری کاهش یافته است ( $p < 0/05$ ). در گروه دیابتی که امگا-۳ را با مقدار ۳۰۰ mg/kg دریافت کردند درصد فولیکول‌های مقدماتی و اولیه و فولیکول‌های پیش آنترال و آنترال اولیه و بزرگ نسبت به گروه دیابتی به طور معنی‌داری افزایش یافته است ( $p < 0/05$ ). در گروه دیابتی که مقدار ۶۰۰ mg/kg امگا-۳ را دریافت کردند درصد فولیکول‌های مقدماتی و اولیه نسبت به گروه امگا-۳۰۰ افزایش معنی‌داری داشته و به مقدار گروه کنترل نزدیک می‌باشد ( $p < 0/05$ ). فولیکول پیش آنترال اولیه در گروه ۶۰۰ نسبت به ۳۰۰ کاهش معنی‌دار دارد؛ ولی نسبت به گروه دیابتی افزایش معنی‌دار دارد ( $p < 0/05$ ). در حالی که فولیکول آنترال اولیه و آنترال بزرگ در امگا ۶۰۰ نسبت به امگا ۳۰۰ کاهش یافته ولی این کاهش معنی‌دار نیست ( $p > 0/05$ ) (تصویر شماره ۱).



نمودار شماره ۱: درصد فولیکول‌های سالم در بافت تخمدانی رت‌های دیابتی شده با STZ

اثر امگا-۳ بر میزان لقاح و تشکیل بلاستوسیت‌ها در رت‌های دیابتی شده با STZ

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که در گروه دیابتی، درصد لقاح، تشکیل جنین‌های دو سلولی و بلاستوسیت کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل از خود نشان می‌دهد ( $p < 0/05$ ). هم‌چنین درصد جنین‌های هچینگ شده<sup>۱</sup> نیز در مقایسه با گروه کنترل کاهش

قرار داشتند جدا شده و در ظرف فیکساتیو (محلوس فرمالین ۱۰ درصد) قرار داده شد. پس از انجام مراحل آبگیری، نمونه‌ها در بلوک‌های پارافینی قالب‌گیری شدند و با استفاده از میکروتوم از تمام مقاطع تخمدان برش‌های سریالی به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (مرک-آلمان) به وسیله میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰، تعداد و نوع فولیکول‌ها و اجسام زرد در برش‌های سریالی شمارش شد. قطر فولیکول‌های گراف سالم و جسم زرد با عدسی مدرج، مورد بررسی قرار گرفتند و جهت تعیین قطر از فرمول زیر استفاده گردید.

$$\frac{1}{2} (\text{کم‌ترین قطر} + \text{بیشترین قطر}) = \text{قطر فولیکول}$$

قطر > ۷۰ میکرومتر: فولیکول مقدماتی اولیه

قطر ۷۰-۱۱۰ میکرومتر: فولیکول‌های پیش آنترال اولیه

قطر ۱۱۰-۲۰۰ میکرومتر: فولیکول‌های آنترال اولیه

قطر < ۲۰۰ میکرومتر: فولیکول‌های آنترال بزرگ (۱۰)

#### روش آماری

در این تحقیق از نرم افزار آماری SPSS16 استفاده شد. داده‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست Benferroni مورد تحلیل و تجزیه قرار گرفتند. داده‌های مربوط به بافت تخمدان با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست تعقیبی توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. قبل از انجام آزمون آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌های بدست آمده با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف بررسی شد. هم‌چنین اختلاف میانگین داده‌ها در سطح ( $p < 0/05$ ) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

اثر امگا-۳ بر میزان فولیکول‌های سالم بافت تخمدان در رت‌های دیابتی شده با STZ

بر اساس نتایج به دست آمده درصد فولیکول‌های مقدماتی و اولیه (<۷۰) و فولیکول‌های پیش آنترال اولیه (۷۰-۱۱۰) و فولیکول‌های آنترال اولیه (۱۱۰-۲۰۰) و

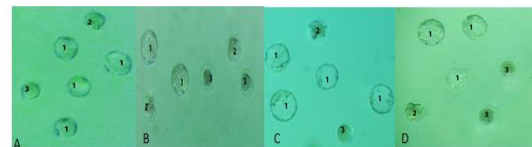
1. Hatching (به فرایند پاره شدن و خروج جنین از زوناپلوسیدا اطلاق می‌شود)

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین پارامترهای درصد زیگوت، درصد جنین‌های دوسلولی، درصد بلاستوسیت و جنین‌های هچ شده در گروه‌های مورد مطالعه رت ماده بالغ. حروف لاتین غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار مابین گروه‌ها می‌باشد ( $p < 0.05$ ). داده‌ها برحسب Mean $\pm$ SD نشان داده شده‌اند

متغیرها	کنترل	دیابتی	دیابتی ۳۰۰-امگا	دیابتی ۶۰۰-امگا	سطح معنی داری
درصد زیگوت	۸۸/۰۲ $\pm$ ۰/۸۵	۶۹/۹۰ $\pm$ ۱/۷۵	۷۴/۹۱ $\pm$ ۲/۵۰	۷۸/۳۱ $\pm$ ۱/۱۷	۰/۰۳
درصد جنین‌های دوسلولی	۹۱/۶۱ $\pm$ ۳/۳۸	۶۵/۴۷ $\pm$ ۱/۱۹	۷۵/۸۹ $\pm$ ۵/۶۰	۷۵/۹۸ $\pm$ ۱/۷۹	۰/۰۲۱
درصد بلاستوسیت‌ها	۷۳/۰۱ $\pm$ ۰/۵۱	۳۸/۰۹ $\pm$ ۴/۷۶	۵۸/۳۳ $\pm$ ۸/۳۳	۶۰/۲۷ $\pm$ ۱/۰۲	۰/۰۳۰
درصد جنین‌های هچینگ شده	۵۶/۴۷ $\pm$ ۳/۵۲	۲۶/۷۸ $\pm$ ۱/۷۸	۳۷/۷۹ $\pm$ ۰/۲۹	۴۱/۰۹ $\pm$ ۴/۰۶	۰/۰۰۸

اکسیژن در بدن افزایش می‌یابد و گلیکوزیله شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باعث کاهش فعالیت آن‌ها می‌شود (۲۰) از سوی دیگر افزایش قند خون روی هیپوتالاموس - هیپوفیز - تخمدان نیز اثر گذاشته و مسیر طبیعی آن را برهم می‌زند (۲۱). در مطالعات مختلف از استرپتوزوتوسین جهت القاء دیابت تجربی و افزایش قند خون در حیوانات آزمایشگاهی از جمله موش صحرایی استفاده شده است. استرپتوزوتوسین با القاء استرس اکسیداتیو باعث تخریب سلول‌های بتای پانکراس و در نتیجه، افزایش قند خون می‌شود (۲۲) به طوری که در مطالعه حاضر نیز تجویز STZ باعث افزایش قند خون در رت‌ها گردیده و رت‌ها به دیابت نوع اول مبتلا شدند. بالا بودن قند خون میزان تولید رادیکال‌های آزاد را افزایش می‌دهد. استرس اکسیداتیو از طریق تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، عاملی بنیادی در پیشرفت مشکلاتی چون مقاومت به انسولین، اختلال عملکرد سلول‌های بتا، نقص در تعادل گلوکز و دیابت ملیتوس می‌باشد (۲۳) هم‌چنین تغییرات دژنراتیو اووسیت در فولیکول‌های تخمدانی رت‌های دیابتی و مهار مراحل بلوغ آن می‌تواند به کاهش ارتباطات تغذیه‌ای اووسیت در اثر تغییر در ضخامت و ماهیت پرده شفاف و نیز دیگر اثرات سوء ناشی از دیابت مانند افزایش میزان رادیکال‌های آزاد منجر شود (۲۴-۲۶). علاوه بر این گزارش شده است ROS می‌تواند سبب ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها، آسیب‌های DNA و RNA و پروتئین‌ها شود که از آمیزش اسپرم و اووسیت در جریان لقاح جلوگیری می‌کند (۲۷). تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن از دلایل مهم پایین بودن درصد تولید

معنی‌داری داشته است. این در حالی است که در گروه‌های دیابتی که اسیدهای چرب امگا-۳ را با مقدار 300 mg/kg دریافت کردند میزان تشکیل زیگوت و جنین‌های دوسلولی و تشکیل بلاستوسیت‌ها و جنین‌های هچینگ در رت‌ها افزایش معنی‌داری دارد ( $p < 0.05$ ). ولی در میزان درصد لقاح، تشکیل جنین‌های دو سلولی و بلاستوسیت هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین میزان مصرف 300 mg/kg امگا-۳ و مصرف 600 mg/kg امگا-۳ مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ) (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: (A) گروه کنترل، (B) گروه دیابتی، (C) گروه امگا-۳ (300 mg/kg) به همراه دیابت، (D) گروه امگا-۳ (600 mg/kg) به همراه دیابت.

- (۱) جنین در مرحله بلاستوسیت،
- (۲) جنین متوقف شده،
- (۳) تخمک بارور نشده.

## بحث

کاهش باروری در جنس ماده مبتلا به دیابت، ناشی از اختلال در هیستوپاتولوژی تخمدان است که به صورت اختلال در محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - تخمدان، اختلال در ترشح هورمون‌ها، اختلال در رشد فولیکولی، افزایش تحلیل فولیکولی، تحلیل جسم زرد، عدم بلوغ اووسیت، کاهش یا عدم تخمک‌گذاری و تغییر زمان استروس گزارش شده است (۳). در نتیجه بالا بودن قند خون در دیابت، میزان تولید رادیکال‌های آزاد

جنین در شرایط آزمایشگاهی بیان شده است. سطح پایین ROS<sup>۱</sup> نقش سودمندی را در IVF<sup>۲</sup> بازی می‌کند. به نظر می‌رسد که در شرایط آزمایشگاهی جنین‌های پستانداران، میزان تولید این رادیکال‌های آزاد بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی جنین‌ها می‌باشد (۲۸). مطالعه حاضر نشان می‌دهد که دیابت القا شده در رت‌ها، تعداد فولیکول‌های آغازین، فولیکول‌های اولیه، ثانویه و ثالثیه را کاهش داده است که، نشان‌دهنده آترزی فولیکولی است؛ از طرفی کاهش تعداد فولیکول‌های سالم باعث کاهش لقاح و تعداد اووسیت‌های تشکیل یافته در لقاح داخل آزمایشگاهی شده است. در مطالعات مشابهی که اثر دیابت را بر ساختار بافت‌شناسی تخمدان بررسی کرده‌اند، نتایج متنوعی در رابطه با اثر دیابت بر فولیکول‌های تخمدانی گزارش شده است. از جمله گریس و همکاران نشان دادند که در تخمدان‌های هامسترهای دیابتی در فاز لوتال، جمعیت فولیکول‌ها کاهش یافته و تعداد فولیکول‌های آترزی افزایش یافته و همه هامسترها فاقد سیکل تولیدمثلی بودند (۲۹). هم‌چنین حسینی فر و همکاران نیز گزارش کردند که القاء دیابت با STZ در موش صحرائی باعث کاهش فولیکول‌های آغازین، اولیه، ثانویه، ثالثیه و افزایش فولیکول‌های آترزی می‌شود (۳۰). دیوید و همکاران بیان کرده‌اند که درصد کل فولیکول‌های موجود در تخمدان هامستر دیابتی کاهش یافته و تعداد فولیکول‌های اولیه و ثانویه در گروه دیابتی در مقایسه با کنترل کاهش یافته بود. هم‌چنین آن‌ها گزارش کردند در رابطه با فولیکول‌های ثالثیه در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و درصد فولیکول‌های آترزی در تخمدان‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته بود و چنین نتیجه‌گیری کردند که هیپرگلیسمی در هامسترهای چینی، باعث سرکوب شدید فولیکول‌های طبیعی می‌شود که نتیجه آن اختلال در کارایی و عملکرد دستگاه تولید مثل هامستر است (۳۱) به طوری که یافته‌های پژوهش

حاضر نیز با یافته‌های قبلی هم‌خوانی داشته و تعداد فولیکول‌های تخمدانی اعم از فولیکول‌های اولیه، ثانویه و ثالثیه در گروه دیابتی نیز کاهش یافته است. اما از آنجایی که اسید چرب امگا-۳ می‌تواند، سطح کاتالاز را در پراکسی زوم‌ها و سیتوپلاسم افزایش دهد، موجب بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۹). مطالعه حاضر نشان داد که اسید چرب امگا-۳ سبب بهبودی قابل توجهی در وضعیت بافت تخمدانی دیابت می‌شود به طوری که میانگین درصد فولیکول‌های سالم در گروه‌هایی که امگا-۳ را دریافت کرده‌اند نسبت به گروه دیابتی شاهد افزایش یافته و در نتیجه میزان لقاح و تشکیل بلاستوسیت‌ها نیز افزایش می‌یابد. نتایج مطالعه حاضر همسو با نتایج برخی از مطالعات انسانی و حیوانی می‌باشد که کاهش اثرات بیماری دیابت و مقاومت انسولینی به دنبال مصرف اسیدهای چرب امگا-۳ را گزارش کرده‌اند. اریسلند و همکاران نشان دادند مکمل یاری با اسیدهای چرب امگا-۳ با دوز ۳/۴ گرم EPA, DHA در روزبه مدت ۶ ماه باعث کاهش معنی‌دار در سطح انسولین در بیماران دچار هیپرتری گلیسیریدمی خفیف شد (۳۲). نتایج مطالعه بزرگی که توسط رامل و همکاران بر روی ۳۴۰ زن و مرد چاق از کشورهای ایرلند، اسپانیا و ایسلند انجام شد نشان داد که، ۸ هفته مکمل یاری با ۳ گرم روغن ماهی در روز (۱/۳ گرم اسیدچرب امگا-۳ در روز) به همراه یک رژیم کم کالری سبب کاهش معنی‌دار در سطح انسولین در بیماران دیابتی می‌شود (۳۳). بررسی‌های آزمایشگاهی صورت گرفته در مطالعات قبلی نشان داد که افزودنی‌های غذایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مانند اسیدهای چرب امگا-۳، موجب افزایش کیفیت لقاح و بهبود نتایج (IVM) می‌شود (۳۴) و تکوین بلاستوسیت‌ها را در جنین موش بهبود می‌بخشد (۳۵). ولی مطالعاتی که نقش اسیدهای چرب امگا-۳ را بر بافت تخمدانی بررسی کند یافت نشد لذا مکانسیم آن هنوز به خوبی شناخته نشده است. از طرفی دیگر چندین مکانسیم در توجیه اثرات اسیدهای چرب امگا-۳ بر بهبود بیماری دیابت

1. Reactive Oxygen Species  
2. in vitro fertilization

از عوارض دیابت می‌کاهد، بلکه باعث می‌شود که میزان لقاح و متعاقب آن میزان رشد جنینی افزایش یابد. این اطلاعات را نمی‌توان برای لقاح انسان و انتقال جنین در شرایط آزمایشگاهی تعمیم داد اما ممکن است سبب بهبود شرایط ناباروران گردد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که دیابت آسیب‌های وارده بر بافت تخمدان و فولیکول‌ها را افزایش داده و میزان باروری و لقاح و تولید جنین را کاهش می‌دهد. ولی مصرف روزانه اسیدچرب امگا-۳ از آسیب‌های وارده به بافت تخمدان جلوگیری کرده و باعث جلوگیری از آترزی فولیکول‌های تخمدان می‌شود. هم‌چنین اسیدهای چرب امگا-۳ می‌توانند میزان لقاح و تشکیل بلاستوسیت رادر محیط *in vitro* بهبود ببخشند و لقاح و تشکیل بلاستوسیت‌ها را افزایش داده و در نتیجه موجب افزایش توان باروریدهد شوند.

### سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم و دامپزشکی دانشگاه ارومیه و تمام کسانی که در این تحقیق ما را یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

### References

1. Boulton AJ, Vilekyte L, Ragnarson Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet* 2005; 366(9498): 1719-1724.
2. Traish AM, Cushman T, Hoyt R, Kim NN. Diabetes attenuates female genital sexual arousal response via disruption of estrogen action. *Korean J Urol* 2009; 50(3): 211-223.
3. 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): 2128-2135.
4. Kofuji K, Aoki A, Tsubaki K, Konishi M, Isobe T, Murata Y. Antioxidant activity of  $\beta$ -Glucan. *ISRN Pharm* 2012; ۲۰۱۲: 125864.
5. Dickinson PJ, Carrington AL, Frost GS, Boulton AJ. Neurovascular disease, antioxidants and glycation in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 18(4): 260-272.
6. Esfandiari N, Falcone T, Agarwal A, Attaran M, Nelson DR, Sharma RK. Protein supplementation and the incidence of apoptosis

1. Proximosome Proliferator Activated Receptor
2. Glucose Transporter
3. AMP-activated kinase

- and oxidative stress in mouse embryos. *Obstet Gynecol* 2005; 105(3): 653-660.
7. Zhang X, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. Effect of pentoxifylline in reducing oxidative stress-induced embryotoxicity *J Assist Reprod Genet* 2005; 22(11-12): 415-417.
  8. Cassano E, Tosto L, Balestrieri M, Zicarelli L, Abrescia P. Antioxidant defense in the follicular fluid water buffalo. *Cell Physiol Biochem* 1999; 9(2): 106-116.
  9. Singh U, Jialal I. Anti-inflammatory effects of alpha-tocopherol. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1031: 196-203.
  10. Ahmadi E. Evaluation effect Wheat germ oil on reproduction Complication following treatment with carbamazepine in epilepsy male mice with PTZ. Faculty of Science. University of Orumiye 2015. (Persian).
  11. Venkateswaran S, Pari L. Effect of *Coccinia indica* leaves on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2003; 84(2-3): 163-168.
  12. Weerakint S, Srisombut C, Bunnag P, Sangtong S, Chuangsoongnoen N, Rojanasakul A. Prevalence of type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in Asian women with polycystic ovary syndrome. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 75(2): 177-184.
  13. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 2011; 50(5): 567-575.
  14. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci* 2009; 84(21-22): 705-712.
  15. Rodriguez-Villar C, Perez-H A, Mercade I, Casals E, Ros E. Comparison of a high-carbohydrate and a high-monounsaturated fat, olive oil-rich diet on the susceptibility of LDL to oxidative modification in subjects with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2004; 21(2): 142-149.
  16. Ruder EH, Hartman T, Blumberg J, Goldman M. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update*; 14(4): 345-357.
  17. Sakamoto N, Kono S, Wakai K, Fukuda Y, Satomi M, Shimoyama T, et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease A Multicenter Case Control Study in Japan. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11(2): 154-163.
  18. Sekhon LH, Gupta S, Kim Y, Agarwal A. Female infertility and antioxidants. *Curr Womens Health Rev* 2010; 6: 84-95.
  19. Sinclair AJ, Lunec J. Free radicals, oxidative stress and diabetes mellitus, In: *Immunopharmacology of Free Radical Species*. Blake D, Winyard PG. London: Academic Press; 1995. p. 183-198.
  20. Umrani RD, Paknikar KM. Zinc oxide nanoparticles show antidiabetic activity in streptozotocin-induced types-1 and 2 diabetic rats. *Nanomedicine (Lond)* 2014; 9(1): 89-104.
  21. Arrais RF, Dib SA. The hypothalamus-pituitary-ovary axis and type 1 diabetes mellitus: a mini review. *Hum Reprod* 2005; 21(2): 327-337.
  22. Prasad GL. Biomedical applications of Nanoparticles. *Nanostructure Science and Technology* 2009: 89-109.
  23. Nirmala S, Saroja HR, Vasanthi S, Lalitha G. Hypoglycemic effect of *Basella rubra* in streptozotocin-induced diabetic albino rats. *J Pharmacognosy Phytother* 2009; 1(2): 025-030.
  24. Tatemoto H, Ootaki K, Shigeta K, Muto N. Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside during in vitro maturation. *Biol Reprod* 2001; 65(6): 1800-1806.

25. Traish AM, Cushman T, Hoyt R, Kim NN. Diabetes attenuates female genital sexual arousal response via disruption of estrogen action. *Korean J Urol* 2009; 50(3): 211-223.
26. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil* 1993; 98(1): 257-265.
27. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001; 7(2): 179-189.
28. Garris DR, Garris BL. Cytolipotoxicity-induced involution of the female reproductive tract following expression of obese (ob/ob) and diabetes (db/db) genotype mutations: progressive, hyperlipidemic transformation into adipocytic tissues. *Reprod Toxicol* 2004; 18(1): 81-91.
29. Hosseinifar S, Erfanimajd N, Morovvati H, Najafzadeh H. Aloe Vera gel protects ovarian structure in diabetic rat. *AEJTS* 2011; 3(3): 197-203.
30. Garris DR, Garris BL. Diabetes (db/db) mutation-induced ovarian involution: progressive hypercytolipidemia. *Exp Biol Med* 2003; 228(9): 1040-1050.
31. Eritsland J, Seljeflot I, Abdelnoor M, Arnesen H, Torjesen A. Long-term effects of  $\omega$ -3 fatty acids on serum lipids and glycaemic control. *Scand J Clin Lab Invest* 1994; 54(4): 273-280.
32. Ramel A, Martinez JA, Kiely M, Bandarra NM, Thorsdottir I. Effects of weight loss and seafood consumption on inflammation parameters in young, overweight and obese European men and women during 8 weeks of energy restriction. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64(9): 987-993.
33. Wirleitner B, Vanderzwalmen P, Stecher A, Spitzer D, Schuff M, Schwerda D, et al. Dietary supplementation of antioxidants improves semen quality of IVF patients in terms of motility, sperm count, and nuclear vacuolization. *Int J Vitam Nutr Res* 2012; 82(6): 391-398.
34. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005. p. 3-28.
35. Fedor D, Kelley D. Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12(2): 138-146.
36. Ebbesson SO, Risica PM, Ebbesson LO, Kennish JM, Tejero ME. Omega-3 fatty acids improve glucose tolerance and components of the metabolic syndrome in Alaskan Eskimos: the Alaska Siberia project. *Int J Circumpolar Health* 2005; 64(4): 396-408.
37. Tabei SM, Fakher S, Djalali M, Javanbakht MH, Zarei M, Derakhshanian H, et al. Effect of vitamin D, A, E, C and omega-3 fatty acids supplementation on the level of catalase and superoxide dismutase activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Bratisl Lek Listy* 2015; 116(2): 115-118.
38. Amerion M, Haidari K. Quantitative assessment of mouse embryo development yielded from in vitro fertilization of ovulated mature oocytes after ovarian stimulation using human menopausal gonadotropin and Estradiol valerate. *J Gorgan Uni Med Sci* 2013; 15(3): 13-17 (Persian).