مقاله پژوهشی

بررسی نقش نیتریک اکساید در کنترل اختلالات تکاملی جنین موش در مرحله پیش لانه گزینی در محیطهای کشت حاوی گلوکز زیاد

دکتر ایرج امیری * ، دکتر محمد بربرستانی ** ، دکتر احمدرضا دهپور * ، دکتر مرضیه فریمانی ******
دکتر محمد اکبری **

چکیده:

حاملگی در مادران دیابتی دارای ریسک بالایی از نظر مشکلات زودرس نظیر سقطهای خودبخودی، تأخیر در مراحل اولیه رشد و نمو جنین و افزایش ناهنجاریهای مادرزادی می باشد. بنظر می رسد که افزایش سطح گلوکز خون با ایجاد اختلال درتولید نیتریک اکساید (NO) اثرات فوق را بوجود می آورد. هدف از انجام این مطالعه بررسی نقش نیتریک اکساید در جلوگیری از اختلالات تکاملی و آپوپتوزیس در جنینهای موش در مرحلهٔ پیش لانه گزینی به هنگام کشت در محیط کشت حاوی گلوکز بالا(۳۰میلی مول) می باشد.

به منظور دست یابی به این هدف ، جنین های ۲ سلولی موش در محیطهای کشت حاوی گلوکز بالا و غلظتهای مختلف پیش ساز نیتریک اکساید (L-arginine) و مهار کننده آن(L-NAME) به مدت ۹۶ ساعت در آزمایشگاه کشت داده شدند.در پایان وضعیت تکاملی آنها با استفاده از یک میکروسکوپ معکوس ارزیابی گردید سپس جنینها با تکنیک تانل نشاندار شده و توسط یک میکروسکوپ فلوئورسنس از لحاظ میزان آپوپتوزیس مورد بررسی قرار گرفتند. میزان نیتریک اکساید تولید شده توسط جنینهای گروههای مختلف نیز با اندازه گیری مقدار نیتریت موجود در محیط پس از اتمام دورهٔ کشت با استفاده از روش Greiss تعیین گردید.

مقایسهٔ نتایج بدست آمده پس از کشت جنین‌ها در گروههای مختلف نشان داد که افزایش غلظت گلوکز در محیط از طرفی موجب کاهش تولید نیتریک اکساید شده و از طرف دیگر رشد و تکامل جنینها را در مرحلهٔ پیش لانه گزینی به تاخیر می اندازد و موجب افزایش آپوپتوزیس در آنها می گردد. در چنین شرایطی استفاده از L-NAME که تولید نیتریک اکساید را مهار می نماید عوارض فوق را تشدید می کند در حالیکه افزودن L-arginine به میزان ۲۰-۱۰میلی مول بطور معنی داری باعث افزایش تولید نیتریک اکساید و بهبود پتانسیل تکاملی جنینها و کاهش آپوپتوزیس در آنها می گردد.

با توجه به نتایج این مطالعه بنظر می رسد که استفاده ازL-arginine موجب افزایش تولید نیتریک اکساید در شرایط هیپرگلیسمی شده واز اثرات مخرب هیپرگلیسمی بر روی جنین های پیش لانه گزینی می کاهد.

کلید واژه ها: آپوپتوزیس / گلوکز / مرحله پیش لانه گزینی / موش / نیتریک اکساید

* استادیار گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
** دانشیار گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
*** استاد گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
**** استادیار گروه زنان و مامائی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

مقدمه :

امروزه مشخص شده است که هیپرگلیسمی در زنان باردار مشکلات فراوانی نظیـــر سقطهای خودبخودی ، تأخیر در مراحل اولیه رشد و نمو جنین و افزایش ناهنجاریهای مادرزادی در سیستمهایی قلبی عروقی، اسکلتی و اعصاب مرکزی آن می گردد (۴-۱). اگرچه شیوع این مشکلات با کنترل دقیق هیپرگلیسمی مادران در دوران اندام زایی جنین تا حدی کاهش می یابد لیکن همچنان به طور معنی داری نسبت به اختلالات ایجاد شدهٔ جنینی در مادران سالم بیشتر است (۱).

مطالعات انجام شده بر روی حیوانات آزمایشگاهی چه بصورت in vivo و چه in vitro نشان داده اند که هیپرگلیسمی مادر از طرفی باعث تأخیر در تکامل جنین در مرحله پیش لانه گزینی و کاهش میزان لانه گزینی شـــــده (۵) و ازطرف دیگر تعداد سلولهای آپوپتوتیک را در مـــــرحله بلاستوسیست بطور معنی داری افزایش می دهـــــد که این افزایش بویژه در توده سلولی درونی Inner Cell Mass (ICM) قابل توجـــــه است. افزایش آپوپتوزیس در سلولهای فوق که منشاء ایجاد لایه های سه گانه جنینی (اکتودرم، مزودرم ، اندودرم) می باشند منجر به حذف تعداد قابل توجهی از آنها می شود که این امر می توانـــــد منشاء ناهنجاریهای مختلف باشد (۶،۷). بنظر می رســـــد که افزایش غلظت گلوکزخون (Hyperglycemia) به عنوان یک عامل تراتوژن بالقوه نقش مهمی در این مورد دارد(۸) زیرا غلظت گلوکز در مایع لوله رحم مادران دیابتی نسبت مستقیم با میزان گلوکز خون دارد(۹،۱۰). در نتیجه جنینهای مادران دیابتی در مرحله پیش لانه گزینی در معرض غلظتهای بالای گلوکز قرار می گیرند و بدیهی است که افزایش سطح گلوکز در مایع لوله رحم می تواند اثرات مخرب شدیدی بر روی جنین داشته باشد(۱۰-۷).

مطالعات مختلف نشان داده اند که رادیکالهای آزاد که تولید آنها در شرایط هیپرگلیسمی افزایش می یابد واسطه های مهمی در ایجاد اثـرات تخریبی گـلوکز بر روی جنـین و افزایـش آپوپتـوزیس در سلولهـای جنینی می باشـند(۱۸-۱۱). همچنین با اطلاعاتـــــی که در سالهای اخیر در مورد مولکول نیتریک اکساید (NO) و نقش آن در بافتهای مختلف بدست آمده است مشخص گردیـــده که تغییر در سنتز مولکول فوق نقش مهمی در پاتوژنز هیپرگلیسمی بازی می کند(۱۹،۲۰). نیتریک اکساید یک مولکول رادیکال آزاد می باشد که توسط ایزوفرمهای مختلف آنزیم NOS از اکسیداسیون اسیـــد آمینه L- arginine در بافتهای مختلف ایجاد می شود و اثرات بیولوژیکی گوناگونی بر روی سلولهای مختلف بر جای می گذارد(۲۱). یکی از مهمترین اعمال NO خنثی نمودن رادیکالهای آزاد اکسیژن در بدن میباشد. گزارش شده است که در شرایط هیپرگلیسمی مقدار NO در بدن کاهش می یابد و این امر نقش مهمی در ایجاد بسیاری از عوارض دیابت دارد. بنظر می رسدکه کاهش میزانL-arginine دردسترس، یکی از مهمترین علل کاهش تولید NO در هیپرگلیسمی میباشد.زیرا ثابت شـــــده است که در شرایط فوق ابتدا برداشت L-arginine که مادهٔ زمینه ای لازم برای تولید NO می باشد توسط سلولها افزایش می یابد. که این امر متعاقباً دسـترسی سلـولها به L-arginine را کاهـش داده و از تولیـد NO میکاهد(۱۹،۲۰).

امروزه این مسئله بخوبی ثابت شده است که هنگامی که اگر L-arginine کافی در محیط وجود داشته باشد آنزیم NOS علاوه بر تولید NO مقدار کمی سوپراکسید و H_2O_2 نیز تولید میکند. لیکن کاهش غلظت L-arginine درمحیط موجب می گردد که آنزیم فوق بجای NO عمدتاً رادیکال سوپراکسید تولید نماید(۲۲). با جمع بندی نتایج تحقیقات فوق در می یابیم که هیپرگلیسمی از یک طرف استرس های اکسیداتیو را افزایش داده و موجب ازدیاد تولید ROS مـــی گردد و از طـــرف دیگر با کاهش سطـحL-arginine تـولیـــــد NO کاهش می یـابـد(۱۹،۲۰،۲۳) و آنزیم فوق بجـــــای NO رادیکالهای آزاد اکسیژن تولید نموده و موجب آسیب سلـــــول و احتمالاً مرگ آن میگردد(۲۲).

با مطالعات انجام شده بر روی جنین موش در دوره پیش لانه گزینی نیز نشان داده شده است که در دوره فوق NO توسط سلولهای جنینی ساخته می شود و این امر نقش مهمی درتکامل و لانه گزینی جنین بعهده دارد. بطوریکه مهار تولیدآن موجب اختلال در تکامل و جلوگیری از لانه گزینی جنین می گردد(۲۶-۲۴). با توجه به مطالب ذکـــــر شده بنظر می رسد که هیپرگلیسمی با ایجاد اختلال در تولیـــد نیتریک اکساید می تواند تکامل

جنین را در مرحلهٔ پیش لانه گزینی تحت تاثیر قرار داده و با آسیب رساندن به سلولهای جنینی تکامل آن را مختل نماید. جهت یافتن اطلاعات بیشتر در این زمینه مطالعه حاضر طراحی و به اجرا در آمد.

روش کار:

تهیه جنین ۲ سلولی موش : موشهای سوری سفید مادهٔ ازنژاد N-Mari با سن ۱۰-۶ هفته با تزریق داخل صفاتی ۱۰واحد Human Monopoasal Gonadotrphin (HMG) و۴۸ ساعت بعد ۱۰ واحد Human Chorionic Gonadotrphin (hCG) تحریک تخمک‌گذاری شدند و بلافاصله پس‌از تزریق hCG هر حیوان ماده در کنار یک موش نر بالغ از همان نژاد قرار گرفته و صبح روز بعد از نظرپلاک واژینال بررسی شدند. ۴۸ ساعت پس از تزریق hCG موشهای پلاک مثبت به روش نخاعی کردن گردن (Cervical dislocation) کشته و لوله رحم(Oviduct) آنها از بدنشان خارج و داخل یک قطر۱۰۰-۵۰ میکرولیتری از محیـــط کشتHEPES-HTF حاوی ۴ میلی گرم در میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی(BSA، Sigma، A8806 فراکسیون V فاقد اسید چرب) قرار گرفتند. سپس با تزریق محیط کشت از طرف اینفاندیبولوم به داخل اویداکت، جنین‌ها از سوی دیگر لوله های رحم خارج شدند(عمل فلاشینگFlushing). سپس تمامی جنین‌های ۲ سلولی در یک قطره جمع‌آوری شده و به‌طور تصادفی به تعداد ۲۰-۱۵ عدد در گروههای مورد مطالعه تقسیم شدنـــد. این عمل ۱۰ بار تکرار گردید بطوریکه در نهایت در هر گروه۲۰۰-۱۵۰ جنین مورد آزمایش قرار گرفتند.

محیط کشت: در این پژوهش از محیـــــط کشت Human Tubal Fluide (HTF) به عنوان محیط پایه استفاده شد. غلظت گلوکز در محیط فوق ۲/۸۷ mM است که معادل میزان آن در مایع لوله رحمی انسان در حالت طبیعی می‌باشد. جهت ساخت محیط کنترل باتوجه به اهداف پژوهش مقدار ۰/۵ میلی مولار L-arginine به محیط HTF اضافه گردید. همچنین جهت ساخت محیط کشت با گلوکز بالا(High Glucose) میزان گلوکز در محیط کنترل تا۳۰mM افزایش داده شد. سپس با افزودن غلظتهای مختـــلف L-arginine یا L-NAME محیطهای کشت درمانی برای گروههای مختلف مورد مطالعه ساخته شد.

محیطهایی که در گروههای مختلف این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت عبات بودند از:

۱- محیط کنترل: جهت گروه کنترل از محیطHTF با افزودن ۰/۵ میلی مولار L-arginine به آن استفاده شد.

۲- محیطHigh Glucose (HG) : جهت ساخت این محیط ، غلظت گلوکز محیط کنترل تا۳۰ میلی مول افزایش یافت.

۳- محیطHG-5LA : برای ساخت این محیط به محیط HG مقدار ۵ میلی مول L- arginine اضافه گردید.

۴- محیطHG-10LA: برای ساخت این محیط به محیط HG مقدار۱۰ میلی مول L- arginine اضافه گردید.

۵- محیطHG-20LA: برای ساخت این محیط به محیط HG مقدار ۲۰ میلی مول L- arginine اضافه شد.

۶- محیطHTF-LNAME : برای ساخت این محیط به محیط کنترل مقدار ۱ میلی مول L-NAME که یک مهار کننده NOS می باشد ، اضافه گردید.

۷- محیطHG-LNAME : برای ساخت این محیط به محیط HG مقدار۱میلی مول L-NAME اضافه گردید.

به هر کدام از محیطها قبل از استفاده ۴ mg/ml آلبومین سرم گاوی(BSA) نیز اضافـــــه گردید. سپس یک میلی لیتر از هر کـدام از مـحیطهای فـوق ۲۴ ساعـت قبـل از کشـت به داخـل ظـرف مـخصوص کشـت جنـــین(Falcon 3037) ریخته شد. و سپس ظرفها به منظور ایجاد تعادل دما و CO_2 در داخل انکوباتور در دمای ۳۷° c و ۵٪ گاز CO_2 قرار گرفتند. پس از آماده سازی محیطها جنینهای ۲سلولی جمع‌آوری شده در گروههـــــای ۲۰-۱۵ عددی به داخل آنها انتقال یافته و به مـــــدت ۹۶ ساعت کشت داده شدند. در پایان تعداد جنینهایـــــی که به مرحلـــــهٔ بلاستوسیست رسیده بودند با استفاده از یک میکروسکوپ معکوس (Inverted Microscope) شمارش شدند و پس از انجام تکنیک TUNEL بر روی آنها با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنس از لحاظ تعداد سلولهای آپوپتوتیک بررسی شدند. محیطهای کشت مصرف شده نیز جمع آوری و میزان نیتریت آنها اندازه گیری شد. روشهایی که در این مطالعه برای بررسی آپوپتوزیس و سنجش نیتریت مورد استفاده قرار گرفت بطور مختصر بدین شـــــرح می باشد:

بررسی آپوپتوزیس در بلاستوسیت‌ها با استفاده از روش تانل(TUNEL):

جهت انجام تکنیک تانل بر روی جنینها از روش Brison and Scholtz استفاده گردید(۲۷) که به‌طور خلاصه به شرح زیر می‌باشد:

پس از اتمام کشت، جنین‌ها در پارافرمالدئید ۳/۷٪ فیکس شدند وپس از شفاف سازی در محلول۱ /۰ درصد TritonX -100 به داخل محلولی متشکل از آنزیم TdT و Flourcein-conjugated dutp (محصول شرکت Roche) انتقال یافته و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷°c و تاریکی نگهداری شدند.قبل از مرحلهٔ فوق جنین‌های گروه کنترل مثبت (positive control) بمدت یکساعت در محلول ۵۰ mg/ml دزاکسی ریبونوکلئاز I (DNase I , Sigma) در دمای ۳۷° تیمار شدند و جنین‌های گروه کنترل منفی نیز در طی انجام تکنیک TUNEL به‌مدت یک ساعت در Flourcein-dutp بدون استفاده از TdT نگهداری شدند. پس‌از تکنیک TUNEL جنین‌ها به‌داخل یک قطره RNase A (sigma) با غلظت ۵۰mg/ml انتقال یافته و بمدت یک ساعت در دمای اطاق در تاریکی تیمار شدند. آنگاه جهت رنگ‌آمیزی دوگانه (Double-Staining) به داخل قطرات حاوی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از رنگ Propidium Iodid (PI) که در PBS رقیق شده بود انتقال یافته و به مدت یک‌ساعت در دمای اطاق نگهداری شدند. سرانجام به داخل یک قطره از محلولی حاوی ۹۰٪ گلیسرول و ۱۰٪ Na2Hpo3 ۰/۲ مول بر روی اسلاید میکروسکوپی انتقال یافته و پس از آنکه بوسیله یک لامل پوشیده شدند توسط یک میکروسکوپ فلوئورسانس(Olympus) و با استفاده از یک فیلتر خروجی (Exitation) با طول موج ۴۶۰-۴۹۰nm و فیلتر حائل (Barrier) با طول موج ۵۱۵nm مورد بررسی واقع شدند. در این روش هسته‌های سلولهای غیر آپوپتوتیک که با PI رنگ گرفته‌اند قرمز رنگ و هسته‌های سلولهای آپوپتوتیک که با FITC رنگ‌آمیزی شده‌اند به رنگ سبز طلایی قابل تشخیص می‌باشند. باتوجه به ساختمان کروی بلاستوسیست ،شمارش سلولی با تنظیم میکروسکوپ در سه مقطع از هر بلاستوسیست بعمل آمد وجهت بالا بردن دقت در کار، شمارش سلولی برای تمام جنینها توسط یک نفر انجام شدو هر شمارش نیز دو بار تکرار گردید و در هر مورد میانگین اعداد بدست آمده تعیین و ثبت شد. پس‌از شمارش سلولهای آپوپتوتیک وغیر آپوپتوتیک ضریب (Index) آپوپتوزیس برای هر بلاستوسیست با استفاده از فرمول زیر تعیین گردید(۲۷).

ضریب آپوپتوتیک (AP. Index)

= تعداد سلولهای آپوپتوتیک / تعداد کل سلولها ×۱۰۰

اندازه گیری میزان نیتریت موجود در محیطهای مصرف شده پس از اتمام کشت :

مقدار نیتریت (NO2)موجود در محیط های مصرف شده پس از اتمام دوره کشت نشان دهنده مقدار نیتریک اکساید تولید شده توسط جنینها می باشد زیرا نیتریک اکساید بسیار ناپایدار بوده و پس از تولید سریعاً به نوع پایدار نیتریت تبدیل می شود. نیتریت یک شاخص قابل اطمینان جهت مقدار نیتریک اکساید تولید شده توسط سلولها در طی دوران کشت می باشد(۲۴).

جهت اندازه گیری نیتریت از روش گریس (Greiss assay method) استفاده گردید(۲۴). بدین منظور پس اتمام هر دوره کشت محیط مصرف شده بوسیله یک پیپت پاستور جمع آوری ودر فریزر °۲۰C- نگهداری شد و در پایان آزمایش، اندازه گیری نیتریت با استفاده از ۲۵µl معرف Greiss (متشکل از سولفانیلامید ۱٪+ نفتالین دی هیدروکلرید۰/۱٪ حل شده در اسید ارتو فسفریک ۲/۵٪) و ۷۵ µl از محیط هایی که در آنها جنینها کشت داده شده بودند یا محلولهای استاندارد نیترت سدیم (۰/۷۸-۱۰۰µM) انجام پذیرفت. همچنین از محیط کنترل استفاده نشده نیز بعنوان (blank) استفاده شد(۲۴). برای هر نمونه سنجش نیتریت دو بار تکرار شد.این اندازه گیری توسط دستگاه Eliza Reader در ۵۴۰nm انجام گرفت. سپس با استفاده از رگرسیون خطی مقدار نیتریت در نمونه های مختلف از روی منحنی استاندارد تعیین گردید.

آنالیز آماری : میانگین تعداد بلاستوسیست ها در هر گروه در طی ۱۰ آزمایش متوالی و همچنین میانگین درصد سلولهای آپوپتوتیک در جنین‌های گروههای مختلف و میانگین مقدار نیتریت در گروههای مختلف (پس از تعیین به کمک رگرسیون خطی) با استفاده ازANOVA One Way و انجام تستهای Tukey (در موقعی که واریانسها یکسان بودند) و Dunnett T3

(در هنگامی که واریانسها اختلاف داشتند) با کمک نرم‌آفزارSPSS10 مورد مقایسه قرار گرفتند.

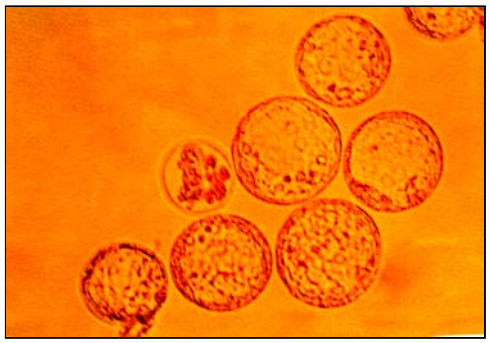
نتایج :

میانگین تشکیل بلاستوسیست ۹۶ساعت پس از کشت در گروههای مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱ : میانگین و انحراف معیار میزان رشد جنین‌ها در محیط‌های کشت کنترل و محیطهای حاوی غلظت بالای گلوکز و مقادیر مختلفی از L-Arginine یا L-NAME

گروههای مورد مطالعه	تعداد نمونه پس از ۱۰ بار تکرار	میانگین و انحراف معیار تعداد بلاستوسیت ها ٪ (۹۶ ساعت پس از کشت)
کنترل	۱۷۷	۷۹/۸(±۵)
HG	۱۸۵	۴۳(±۵/۵)
HG-5LA	۱۸۱	۵۷/۸(±۴/۶)
HG-10LA	۱۷۵	۶۶(±۴/۵)
HG-20LA	۱۸۵	۶۰/۵(±۴/۴)
HTF-LNAME	۱۷۷	-۰-
HG-LNAME	۱۷۲	-۰-

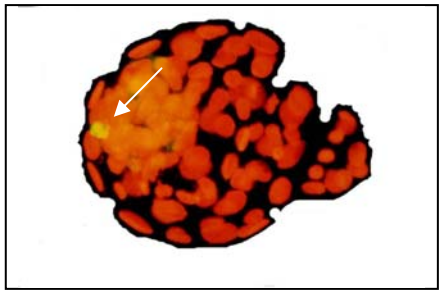
همانطور که در جدول فوق مشاهده می گردد در حالیکه بیش از(۵±)۷۹/۸٪ از جنین‌های گروه کنترل به مرحله بلاستوسیست رسیده اند(شکل ۱). این میزان در گروه با گلوکز بالا (HG) تنها (۵/۵±)۴۳٪ بود که اختلاف معنی‌داری‌را با گروه کنترل نشان می دهد (p<۰/۰۰۰۱).



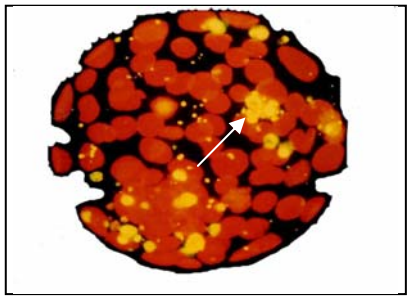
شکل۱: بلاستوسیستهای گروه کنترل۹۶ ساعت پس از کشت

میانگین تعداد بلاستوسیتها در گروههای HG – 5LA و HG –20LA به ترتیب(۴/۶±)۵۷/۸٪ و (۴/۴±)۶۰/۵٪ می باشد که این گروهها نیز تفاوت معنی داری را با گروه کنترل نشان می‌دهند(p<۰/۰۰۰۱). از طرف دیگر اگرچه در گروه HG-10LA میانگین تشکیل بلاستوسیست افزایش یافته است (۴/۵±۶۶٪) لیکن همچنان اختلاف معنی داری با گروههای کنترل (p<۰/۰۵) وHG (p< /۰۰۰۱) دارد. همچنین از این نظر تمامی گروههای درمانی دیگر نیز با گروه HG تفاوت معنی داری نشان می دهند (p<۰/۰۰۰۱). پس از ۹۶ ساعت کشت هیچ جنینی در گروههای HTF-LNAME و HG-LNAME به مرحله بلاستوسیست نرسیده بود و تکامل آنها در در مراحل قبل از مورولا متوقف شد و تمامی آنها بتدریج مردند.

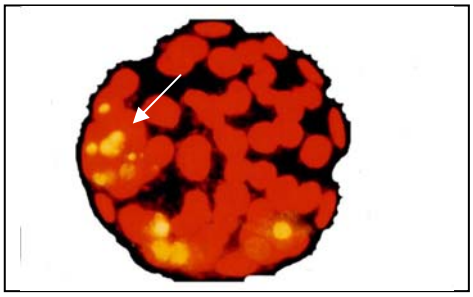
میزان آپوپتوزیس در بلاستوسیت‌ها با استفاده از تکنیک تانل در شکلهای۲و۳و۴ نشان داده شده است.



شکل۲: تصویر یک بلاستوسیست از گروه کنترل که ۹۶ ساعت پس از کشت و پس از تکنیک تانل (TUNEL) توسط میکروسکوپ فلوئورسنس برداشته شده است



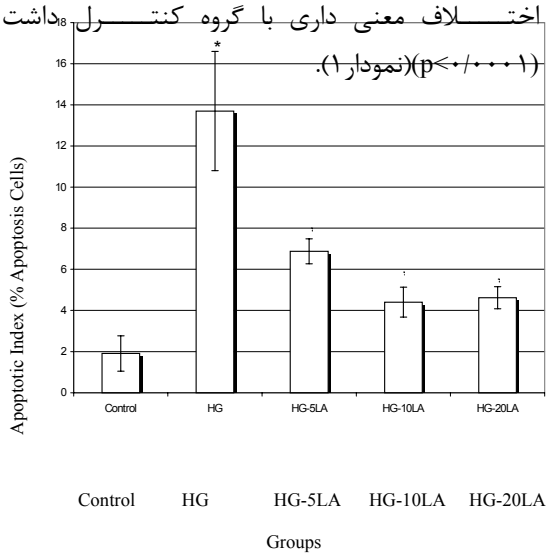
شکل۳: تصویر یک بلاستوسیست از گروه HG ، ۹۶ ساعت پس از کشت و پس از تکنیک تانل (TUNEL) توسط میکروسکوپ فلوئورسنس برداشته شده است



شکل ۴: بلاستوسیست از گروه HG-10LA ، ۹۶ ساعت پس از کشت و پس از تکنیک تانل (TUNEL) توسط میکروسکوپ فلوئورسنس برداشته شده است

* علامت فلش در شکلها هسته های آپوپتوتیک می باشند.

ضریب آپوپتوزیس در گروه کنترل (۰/۸۶±)۱/۹ بـــود. این رقم در گروه HG به (۲/۹±)۱۳/۷ افزایش یافت که اختـــلاف معنی داری با گروه کنتـــرل داشت (p<۰/۰۰۰۱)(نمودار ۱).

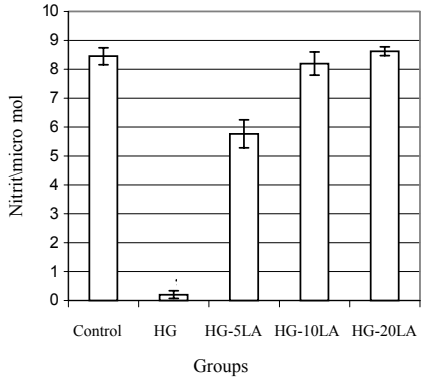


نمودار ۱: مقایسه اندکس سلولهای آپوپتوتیک ۹۶ ساعت پس از کشت

در گروههایـــی که به ترتیب ۵ و ۱۰ و۲۰ میلی مول L-arginine به محیـــط کشت اضافه شـــد اندکس آپوپتوزیس به ترتیب (۰/۶±)۶/۹و (۰/۷۲±)۴/۴ و (۰/۵۳±)۴/۶ بود که از اختلاف معنی‌داری بین گروههای فـــوق با گروه کنتـــرل و همچنین گروه HG دیده شد(P<۰/۰۰۱). همچنیـــن در حالیکه اختلاف معنی‌داری بین گروهHG-5LA با گروههایHG-10LA و HG-20LA وجود داشت(p< ۰/۰۰۱) این اختلاف بین گروههایHG-10LA وHG-20LA معنی دار نبود.

نتایج اندازه گیری مقدار نیتریت در محیطهای کشت:

نمودار ۲ نتایج اندازه گیری میزان نیتریت در محیطهای کشت داده شده در گروههای مختلف را نشان میدهد.



نمودار ۲ : نتایج اندازه گیری میزان نیتریت در محیطهای کشت داده شده در گروههای مختلف آزمایش

همانطور که در نمودار مشاهده می گردد مقدار نیتریت درمحیط کشت گروه HG نسبت به گروه کنترل بطور معنی داری کمتر است(P<۰/۰۰۰۱).میزان نیتریت در گروههای HG-10LA وHG-20LA اختلاف معنی داری با کنترل ندارند. لیکن نسبت به گروه HG بطور معنی داری افزایش نشان می دهند(P<۰/۰۰۰۱). با وجود آنکه میزان نیتریت در گروه HG-5LA نسبت به گروه HG بطور معنی داری افزایش یافته است (P<۰/۰۰۱) لیکن در مقایسه با گروههای کنترل و HG-20LA نیز بطور معنی داری کمتر است(P<۰/۰۰۰۱).مقدار نیتریت در گروههای HTF-LNAME و LNAME-HG بسیار ناچیز و غیر قابل تعیین (Undetectable) بود.

بحث:

نتایج مطالعه حاضر هماننـــد مطالعات Pamfer و Moley (۶،۷) نشـــان می دهد که کشت جنینهای دو سلولی موش در آزمایشـــگاه در حضور ۳۰ mM گلوکز موجب اختلال در تکوین آنها شده و نسبت به گروه کنترل بطور معنی داری از درصد تبدیل جنینهای دو سلولی به بلاستوسیست می کاهد و از طرف دیگر آپوپتوزیس را در بلاستومرها شدیداً افزایش می دهد. این مسئله نشان می دهد که گلوکز زیاد بعنوان یک عامل تراتوژن عمل نموده و موجب آسیب جنین در مرحلهٔ پیش لانه گزینی می شود و اثرات تراتوژتیک شرایط هیپرگلیسمی بر روی جنین احتمالاً بر اثر فعال نمودن راههای آپوپتوتیک به اجرا در می آید. از طرف دیگر اندازه گیری مقدار نیتریت در این مطالعه نشان می دهد که تولید نیتریک اکساید توسط جنین در مرحلهٔ پیش لانه گزینی به هنگام کشت در محیطهای حاوی گلوکز زیاد(۳۰ میلی مول) بطور معنی داری کاهش می یابد. در مورد نقش نیتریک اکساید بر تکامل جنین در مرحلهٔ پیش لانه گزینی مطالعات مختلف انجام گرفته است. بطور مثال Cough و همکارانش در سال ۱۹۹۸نشان دادند که تولید نیتریک‌اکساید توسط جنینهای موش نقش مهمی در تکامل طبیعی جنین و بخصوص در تقسیمات میتوزی آن در مرحلهٔ پیش لانه گزینی دارد بطوریکه مهار تولید آن موجب مهار رشد و تکامل جنیـــن ها در این مرحلهٔ می شود. مطالعهٔ فوق نشان داد که نیتـــریک اکسایـد اثرات خود را در تکامـــل

جنین از طریق فعال نمودن cGMP انجام می دهد. مهار تولید NO نسبت cAMP به cGMP را در سلولها بهم زده و این امر متعاقباً بر ترجمه تنظیم کننده های میتوزی اثر می گذارد. همچنین مهار تولید NO از تولید نوکلئوتید حلقوی که برای تکامل طبیعی جنین بسیار مهم و تعیین کننده می باشند ممانعت بعمل می آورد (۲۴). از طرف دیگر مطالعات مختلف نشان داده اند که نیتریک اکساید در برخی از شرایط نقش مهمی در جلوگیری از آپوپتوزیس بازی می کند(۱۶،۲۴،۲۸). معمولاً اثرات آنتی آپوپتوتیک نیتریک اکساید با واسطه برخی از مکانیسم ها نظیر نیتروزیلاسیون (Nitrosylation) و غیر فعال نمودن برخی از کاسپازها نظیر کاسپازهای۱و۳و۸ ، افزایش بیان ژنهایBcl-2 وBcl-x1، مهار آزاد شدن سیتوکرومرC از میتوکندری ، فعال نمودن سیگنالهای cGMP ودر نتیجه فعال شدن پروتیئن کیناز وابسته به آن و سرکوب فعالیت کاسپازی به اجرا در می آیند. از طرفی واکنشNO بارادیکالهای آزاد اکسیژن(یا گونه های فعال اکسیژنRaective Oxygen Species (ROS) باعث خنثی شدن رادیکالهای فوق که نقش مهمی در ایجاد آپوپتوزیس دارند می گردد(۲۸). مطالعات مختلف نشان داده اند که شرایط هیپرگلیسمی از یک طرف موجب افزایش استرس های اکسیداتیو شده و برتولید ROS می افزاید و از طرف دیگر تولید NO را که یکی از مهمترین گونه های نیتروژن فعال Reactive Nitrogen Species (RNS) می باشد کاهش می دهد(۱۹،۲۰،۲۳). امروزه ثابت شده است که همواره یک تعادل بحرانی(Critical balance) بین ROS و RNS (یا به عبارتی رادیکال های آزاد اکسیژن و رادیکال های آزاد نیتروژن) در سلولها وجود دارد که افزایش یا کاهش هر دسته از رادیکالهای ذکر شده این تعادل را برهم زده و سلول را به طرف مرگ بویژه از نوع آپوپتوزیس هدایت می نماید (۲۸).

Pierce و همکارانش در سال ۱۹۸۹ نشان دادند که رادیکالهای آزاد اکسیژن بویژه H_2O_2 در آپوپتوزیس بلاستومرها نقش مهمی بعهده دارند(۲۹). این مطالعهٔ نشان داده است که معمولاً در شرایط طبیعی ۱٪ ازکل بلاستومرها(یا ۱۰٪ازسلولهای لایهٔICM) در اثر آپوپتوزیس از بین میروند لیکن افزایش آپوپتوزیس در بلاستومرها بویژه در لایهٔ ICM میتواند منجر به حذف تعداد زیادی از سلولهای پیش ساز شده و موجب بروز ناهنجاریهای مختلف در طی ارگانوژنز گردد .برخی از این مطالعات نشان داده اند که افزایش شدید آپوپتوزیس در مرحله پیش لانه گزینی (تحت تاثیر فاکتورهای سمی) منجر به بروز ناهنجاریهای شدید نظیر ناهنجاری لوله عصبی، اندامهای حرکتی و جدار شکم مشابه مواردیکه در فرزندان مادران دیابتی دیده می شود می گردد (۶،۷،۲۹).

با توجه به مطالب یاد شده بنظر میرسد که کاهش تولید نیتریک اکساید توسط جنین های ۲ سلولی که در محیط حاوی گلوکز زیاد کشت داده می شوند با تاثیر بر مسیر NO/cGMP موجب کاهش تقسیمات میتوزی در سلولهای جنینی شده و تکامل جنینها و تبدیل آنها را به مراحل بعدی به تاخیر می اندازد. این مطالعه نتایج بررسیهای بعمل آمده بر روی بیماران دیابتی و همچنین حیوانات آزمایشگاهی دیابتی شده را که نشان داده اند در شرایط هیپر گلیسمی تولید NO در بدن آنان کاهش یافته و احتمالاً بروز برخی از عوارض دیابت ممکن است ناشی از کاهش سطح NO در بدن بیمار باشد(۱۹،۲۰) را تایید می نماید . همچنین این مطالعه نشان می دهد که استفاده از مقادیر بالای L-arginine که پیش ساز نیتریک اکساید می باشد تا حدودی از اثرات زیانبار هیپر گلیسمی بر روی سلولهای جنینی جلوگیری می‌نماید. در توجیه این پدیده میتوان به نظریهٔ Lindsay و همکارانش که در سال۱۹۹۷ ارائه شد استناد نمود(۱۹). بر اساس این نظریهٔ در شرایط هیپرگلیسمی ابتدا فعالیت آنزیمهای تولیدکنندهٔ نیتریک اکساید(NOS) بویژه انواع iNOS وeNOS افزایش می یابدکه این امر در کوتاه مدت باعث افزایش برداشت L-arginine از محیط شده و تولید NO را افزایش می دهد. لیکن در صورتی که منبع L-arginine ثابت باشد این امردر درازمدت موجب کاهش دسترسی سلولها به آن شده و تولیدNOکاهش می یابد. در غیاب L-arginine آنزیمهای NOS بجای نیتریک اکساید، رادیکالهای آزاد اکسیژنه تولید می نمایند. در این مورد Pieper و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۶ نشان دادند که غلظت L-arginine در پلاسمای خون موشهای صحرایی دیابتی کاهش می یابد و این کاهش با اضافه نمودن L-arginine به غذای حیوان مرتفع شده و به سطح طبیعی بر می گردد(۳۰).

همچنین Ozcelike و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۰ نشـــان دادند که درمان با L-arginine موجب رفع برخی از عوارض دیابت و کاهش استرسهای اکسیداتیو می گردد(۲۹). Trachtman و Futterwir در سال ۱۹۹۷ و Praholaka در سال ۲۰۰۰ نشـــان دادند که کشت سلولهای Mesangial در محیطهای کشت حاوی ۲۵ -۳۳ mM گلوکز موجب اختلال در تولید نیتریک اکساید توسط سلولهای فوق شده و مرگ و میر سلولها را افزایش می دهد. لیکن افزودن L-arginine به میزان ۱۰-۲۰mM به محیط کشت باعث بهبود روند کار شده و از عوارض گلوکز زیاد بر روی سلولها ممانعت بعمـــل می آورد(۳۲،۳۳).

با توجـــه به گزارشات متعددی که در مورد نقش L-arginine در جلوگیری از اثرات مخرب گلوکز بالا بر روی سلولهای مختلف در محیط کشت منتشر شده است (۳۱-۲۹) و نیز با در نظر گرفتن نتایج حاصل از این مطالعه بنظر می رسد که اختلال در تولید نیتریک اکساید توسط سلولها در شرایط هیپر گلیسمی ناشی از کاهش دسترسی سلولها به پیش ســـــــاز آن یعنی L-arginine باشد و هرگاه اسید آمینهٔ به میزان کافی در اختیار سلولها قرار گیرد می توان تا حدودی از برخی از اثرات مخرب گلوکز بالا بر روی سلولهای جنینی در مرحلهٔ پیش لانه گزینی جلوگیری نمود. نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات مشابه این امیدواری را بوجود می آورند که با استفاده از مقادیر درمانی L-arginine در زنان دیابتی بتوان از اثرات زیانبار هیپرگلیسمی بر روی جنینها در دوران حاملگی بویژه در مرحلهٔ پیش لانه گزینی جلوگیری نمود. اگرچه برای دست یافتن به نتایج دقیق تر انجام مطالعات بیشتر بصورت in vivo و بویژه بر روی انسان ضروری می باشد.

منابع :

1. Mill JL, Knopp RH, Simpson JL , Jovanovic PL. Lack of relation of increased malformation rates in infants of diabetic mother to glycemic control during organogenesis. New Eng J Med 1998; 318:671-679.
2. Lea RG, Richard G, Mccrecken JE. Disturbed development of the preimplantation emboryos in the insulin-dependent diabetic BB/E rats. Diabetes1996;45:1463-1470.
3. Wercheval M, Hertogh R. Experimental diabetes impairs rat embryo development during the preimplantation period, Diabetologia1990; 33:187-191.
4. Pamfer P, Hertogh R, Vanderhyden I. Decreased inner call mass proportion in blastocyst from diabetic rats. Diabetes1990;39l:471-476.
5. Hertogh R, Wercheval M, Pamfer S. Experimental diabetes interference with the early development of rat embryo in the preimplentation period. Diabetologia1989; 32:480 A.
6. Moley KH, Chi MMY, Knudson CM. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through call death effector pathways: Nat Med 1998; 4(12):1491-1424.
7. Pamfer S, Wanderhyden I, Mccracken JE. Increased call death in rat blastocysts exposed to maternal diabetes in utero and high glucose or tumor necrosis factor in vitro. Development 1997;124:4827-4836.
8. Beebe IFS, Kaye P. Maternal diabetes and retarded preimplantation development of mice. Diabetes1991; 40: 457-461.
9. Gardner DK, Leese HJ. Concontration of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. J Reprod Fertil 1990; 88:361-368.
10. Hertogh R, Vandderheyden I, Pamfer S. Stimulatory and inhibitory effects of glucose and insulin on rat blastocysts development in vitro. Diabetes 1991; 40:641-647.
11. Xiaolin Y, Hakanborg L., Eriksson J. Altered mitochondrial morphology of rat embryos in diabetic pregnancy. Anat Rec1995; 241: 255-267.
12. Peiro C, Lafunte N, Matesanz N. High glucosis induces cell death of cultured human aortic smooth cells through the formation of hydrogen peroxide. Br J Pharmacol 2001; 133(7): 967-974.
13. Ornoy A, Kimyagarov D, Yaffee P, Abir R. Role of reactive oxygen species in diabetic induced embrytoxicity: Studies on pre-implantation mouse embryos cultured

in serum diabetic pregnant women: Isr J Med Sci 1996;32(11): 1066-1073. (abstract).
14. Salas V, Lomeli H. Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. Exp cell Res 1998; 238(1): 136-147.
15. Xiaolin Y, Borg LA, Siman CM, Eriksson U. Material antioxidant treatment prevents diabetes-induced alteration of mitochondrial morphology in rat embryos. Anat Rec 1998; 251(3): 304-14.
16. Wetzel A, Eriksson UG. Antioxidants diminishes developmental damages induced by high glucose and cyclogenase inhibitors in rat embryos in vitro. Diabetes 1998 ; 47 (4): 677-86.
17. Okuda Y, Nagahama M, Mizatani M. Ascorbic acid prevents the inhibition of DNA synthesis induced by high glucose concentration in cultured human endothelial cells. Diabetes Res 1991 ; 18(2): 65-68.
18. Zaken V, Kohen R, Ornoy A. Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. Teratology 2001; 64 (1): 33-40.
19. Lindsay RM , Rosemary S , Gavin S , Sharon P. In vivo and In vitro evidence of altered Nitric Oxide metabolisms in the spontaneously diabetic insulin BB/E rat. Br J Pharmacol 1997; 20:1-6.
20. Marina L, Paul J , Jan D , Erik S , Rabelink T. Nitric Oxide availability in diabetes mellitus. Diabetes Metab Rev 1998; 14: 241-249.
21. Rosselli M, Keller P, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. Hum Rep Update 1998; 4(1): 3-24.
22. Stuehr D, Pou S, Rosen G. Oxygen reduction by Nitric Oxide Synthases. J Biol Chem 2001; 276(18): 14533-14536.
23. Karabatus LM, Fabiano L. Inhibition of Nitric Oxide generation: normalization of in vitro insulin secretion in mice. Metabolism 1996; 45(8): 940-946.
24. Gouge R, Marshburn P, Gordon B, Nunley W. Nitric Oxide as a regulatory of embryonic development. Biol Rep 1998; 58: 875-879.
25. Huei WC, Wen SJ, Chii RT. Nitric Oxide as a regulator in pre-implantation embryo development and apoptosis. Fertil Steril 2000; 175(6): 1163-1171.
26. Novaro V, Gonzalez E. Nitric Oxide synthase regulation during embryonic implantation. Rep Fertil 1997; 9: 557-564.
27. Brison D, Schultz R. Apoptosis during mouse blastocyst formation; evidence for role of survival factors including transforming growth factor α^1. Biol Reprod 1997; 56:1088-1096.
28. David A, Wink J, Cook A. Nitric Oxide protects against cellular damage by ROS. Toxicol Lett 1995; 86: 3654-3658.
29. Pierce GB, Lewellyn A, Parchment R. Mechanism of programmed cell death in the blastocyst. Proc Nat Acad Sci 1989; 86:3654-3658.
30. Pieper G, Siebeneich W, Moore-Hilton G , Roza AM. Short term administration of L-arginine reverses defective endothelium- dependent relaxation and cGMP generation in diabetes. Eur J Pharmacol 1996; 317(2-3) :317-320.
31. Ozcelik AT, Tay A, Guner S. Reversal effects of L-arginine treatment on blood pressure and vascular responsiveness of streptozotocin-diabetic rats. Pharmacol Res 2000;41(2):201-209.
32. Trachman H, Futwrweit S, Crimmins D. High glucose inhibits Nitric Oxide in cultured rat mesangial cell. J Am Soc Nephrol 1997; 8(8): 1276-1282.
33. Prabhaker SS . Tetrahydrobiopterin reverses the inhibition of nitric oxide by high glucose in cultured murine mesangial cells. Am J Renal Physiol 2001; 281(1): F179-188.