اثرات L-arginine بر تکامل جنین موش مرحله پیش لانه‌گزینی در محیطهای حاوی گلوکز بالا

ایرج امیری (Ph.D.)[۱،۲]، حسن مرزبان (Ph.D.)[۳]، محمد بربرستانی (Ph.D.)[۳]، نورالدین نعمت الهی (Ph.D.)[۴].

۱- دانشجوی دکتری، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران.

۲- مربی، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی همدان، همدان، ایران.

۳- استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران.

۴- استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی کرمان، کرمان، ایران.

چکیده

امروزه این مطلب بخوبی پذیرفته شده است که هیپرگلیسمی مادری موجب تأخیر مراحل اولیه رشد و تکامل جنین و ایجاد سقطهای خود بخودی (Spontaneaus Miscarriage) و تولد نوزادانی با ناهنجاریهای مختلف مادرزادی می‌گردد. بر اساس مطالعات مختلف برخی از مشکلات فوق در مراحل ابتدایی تکامل جنین بویژه در مرحلهٔ پیش لانه‌گزینی ایجاد می‌شوند و بنظر می‌رسد که افزایش سطح گلوکز خون بعنوان یک عامل تراتوژن بالقوه می‌تواند نقش مهمی در این مورد بعهده داشته باشد . یکی از مواردی که احتمال می‌رود در ایجاد ناهنجاریهای ناشی از اثرات گلوکز نقش داشته باشد، اختلال در سیستم نیتریک اکساید (NO) در شرایط هیپرگلیسمی می‌باشد. برخی شواهد حاکی از آن است که در شرایط هیپرگلسمیک ابتدا برداشت L-arginine توسط جنین از محیط را افزایش داده و این امر متعاقباً منجر به کاهش L-arginine در دسترس شده و از آنجا که L-arginine سوبسترای لازم برای تولید NO می‌باشد لذا کاهش آن منجر به کاهش تولید NO می‌گردد. در این مطالعه جهت بررسی موضوع فوق جنین‌های ۲ سلولی موش در محیطهای کشت حاوی ۳۰ mM گلوکز و غلظتهای مختلف L-arginine (۲۰،۱۰،۵ mM) کشت داده شدند و میزان رشد و تکامل آنها بطور روزانه ارزیابی گردید و در پایان نیز جنینها با استفاده از رنگ Hochest-33254 رنگ‌آمیزی و تعداد بلاستومرها با میکروسکوپ فلورسانس شمارش شد. مقایسهٔ کشت جنین‌ها در محیطهای کشت HTF با غلظتهای مختلف گلوکز و L-arginine نشان داد که افزایش غلظت گلوکز تا ۳۰ mM کاملاً برروی تکامل جنین اثر گذاشته و موجب تأخیر در رشد و تکامل جنینها و کاهش تعداد بلاستومر آنها می‌گردد، اما افزودن L-arginine به میزان ۱۰ mM-۵ بطور معنی‌داری باعث بهبود وضعیت فوق می‌گردد و از طرف دیگر مشاهده شد که افزودن L-NAME ، یک آنتاگونیست L-arginine شدیداً رشد و تکامل جنینها را مهار می‌نماید. بنظر می‌رسد که کاهش تولید NO در دیابت می‌تواند ناشی از کاهش L-arginine دردسترس جنین باشد زیرا افزایش غلظت L-arginine در محیطهای دارای گلوکز بالا تا ۱۰ mM باعث بهبود نسبی عوارض ناشی از غلظت بالای گلوکز گردید. باتوجه به نتایج حاصل از این مطالعه بنظر می‌رسد که استفاده از L-arginine و یا مواردی که باعث آزاد سازی NO در محیط می‌گردند می‌توانند نقش مهمی در جلوگیری از برخی عوارض هیپرگلیسمی بر روی جنین داشته باشند.

گل واژگان: گلوکز، جنین، دیابت، ال-آرژنین و نیتریک اکساید.

آدرس مکاتبه: دکتر ایرج امیری، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی همدان، خیابان عباس‌آباد، همدان، ایران.

پست الکترونیک: amiri44@yahoo.com

Downloaded from http://www.jri.ir

مقدمه:

امروزه این موضوع بخوبی پذیرفته شده است که هیپرگلیسمی مادر در طول دوران بارداری موجب تأخیر در مراحل اولیه رشد و تکامل جنین و بروز ناهنجاریهای مختلف مادرزادی و افزایش خطر سقطهای خودبخودی می‌گردد (۳-۱). هر چند در این مادران در دوران اندام‌زایی[1] با کنترل هیپرگلیسمی میزان ناهنجاریهای فوق کاهش می‌یابد اما همچنان میزان آن سه تاچهار برابر بیشتر از مادران سالم می‌باشد (٤). بر این اساس ممکن است مشکلات فوق در مراحل ابتدائی‌تر تکامل جنین بویژه در مرحلهٔ پیش لانه‌گزینی[2] حاصل شوند (۸-۵) و افزایش سطح گلوکز خون بعنوان یک عامل تراتوژن بالقوه در این مورد محسوب می‌شود (۱۱-۹). بنظر می‌رسد که اختلال در سیستم نیتریک‌اکساید (NO) در ایجاد ناهنجاریهای ناشی از گلوکز در شرایط هیپرگلیسمی نقش مهمی بر عهده دارد. Couge و همکاران در سال ۱۹۹۸ گزارش نمودند که نیتریک‌اکساید در مرحله پیش‌لانه‌گزینی توسط جنین تولید می‌گردد و این ترکیب نقش مهمی در تکامل و لانه‌گزینی جنین برعهده دارد بطوریکه مهار تولید NOباعث ایجاد تأخیر در رشد و تکامل و جلوگیری از لانه‌گزینی جنین می‌گردد (۱۲). نتایج برخی از مطالعات نشان می‌دهند که در بیماران دیابتی مقدار NO در بافتهای مختلف بدن کاهش می‌یابد و این امر می تواند ناشی از کاهش تولید آن در شرایط هیپرگلیسمی و یا شکستن سریع آن پس از تولید باشد (١٤-١٣). Marina و همکاران معتقدند که کاهش میزان NO در شرایط هیپرگلیسمی در بیماران دیابتی ناشی از کاهش تولید آن بدلیل کاهش میزان L-arginine قابل دسترس، می‌باشد زیرا برخی شواهد حاکی از آن است که در چنین شرایطی ابتدا برداشت L-arginine از محیط افزایش می‌یابد و این امر متعاقباً منجر به کاهش L-arginine قابل دسترس جنین می‌گردد و از آنجائیکه L-arginine سوبسترای لازم برای تولید NO می‌باشد لذا کاهش آن منجر به کاهش تولید NO می‌گردد (۱۵) و از آنجائیکه تولید NO نقش مهمی در تکامل جنین در مرحله پیش لانه‌گزینی دارد بنابراین می‌تواند موجب اختلال در تکامل جنین در مرحله پیش لانه‌گزینی گردد. مطالعه حاضر جهت بررسی نقش L-arginine بعنوان سوبسترای نیتریک اکساید بر روی تکامل جنین‌های موش در محیطهای کشت حاوی گلوکز زیاد طراحی و اجراء گردید.

مواد و روشها:

تهیه جنین های ۲ سلولی موش: تحریک تخمک گذاری در موشهای سوری ماده نژاد NMRI با سن ۱۰-٦ هفته با تزریق داخل صفاتی ۱۰ واحد PMSG و ٤٨ ساعت بعد ۱۰ واحد HCG انجام گرفت و بلافاصله پس از تزریق HCG هر حیوان ماده در کنار یک موش نر بالغ از همان نژاد قرار گرفته و صبح روز پس از تزریق HCG موشها از نظرپلاک واژینال مورد معاینه قرار گرفتند. ٤٨ ساعت پس از تزریق HCG موشهای پلاک مثبت به روش نخاعی کردن گردن[3] کشته و اویداکت آنها از بدنشان خارج و داخل یک قطره ۱۰۰- ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت HEPES-HTF حاوی *4 mg/ml* آلبومین سرم گاوی (Sigma, BSA, Fraction, V Free fatty acid, A8806) قرار داده شد. سپس با تزریق محیط کشت فوق از ناحیه اینفاندیبولوم به داخل اویداکت، جنین‌ها از سوی دیگر اویداکت خارج شدند (عمل فلاشینگ[4]) تمام جنین‌های ۲ سلولی با ظاهری سالم، پس از شستشوی پی در پی در چند قطرهٔ تمیز از محیط کشت فوق، سرانجام در یک قطره جمع‌آوری شده و به طور تصادفی به تعداد ۲۰-۱۵ عدد در گروههای مورد مطالعه تقسیم می‌شدند.

محیطهای کشت:در این پژوهش از محیط کشت HTF[5] (نخستین بار در سال ۱۹۸۵ بر اساس آنالیز ترکیبات مایع لوله رحم انسان توسط Quinn و همکارانش ساخته شد) بعنوان محیط کنترل استفاده گردید(١٦). غلظت

1- Organogenesis
2- Pre-implantation period
3- Cervical dislocation
4- Flushing
5- Haman Tubal Fluid

Downloaded from http://www.jri.ir

گلوکز در محیط فوق ۲/۸۷ *mM* بود که با توجه به اهداف پژوهش با تغییر غلظت گلوکز و افزودن غلظتهای مختلفی از L-arginine و یا L-NAME محیطهای مورد نظر برای کشت جنین در گروههای مختلف این مطالعه به شرح زیر ساخته شد:

۱- محیط کنترل،جهت کنترل از همان محیط HTF معمولی استفاده شد.

۲- محیط HG[1]، جهت ساخت این محیط،غلظت گلوکز محیط HTF تا ۳۰ *mM* افزایش داده شد.

۳- محیط HG-5LA، برای ساخت این محیط به محیط HG مقدار ۵ *mM*، L-arginine اضافه گردید.

٤- محیط HG-10LA، برای ساخت این محیط HG مقدار ۱۰*mM*، L-arginine اضافه گردید.

٥- محیط HG-20LA، برای ساخت این محیط به محیط HG مقدار ۲۰ *mM*، L-arginine اضافه گردید.

٦- محیط HG-L-NAME، برای ساخت این محیط به محیط HG مقدار ۱ *mM*، L-NAME اضافه گردید. به هرکدام از محیطهای فوق قبل از استفاده ٤ *mg/ml* آلبومین سرم گاوی (BSA) نیز اضافه شد. ۲٤ ساعت قبل از کشت از هر کدام از محیطهای فوق قطرات ٥٠ میکرولیتری درداخل دیش ۳٥ میلی‌متری (Falcon 3001) تهیه و با روغن مخصوص کشت جنین (Sigma، Oil، Mineral) پوشیده شدند و به منظور ایجاد تعادل دما و گاز درداخل انکوباتور در دمای ۳۷°c و ٥٪ گاز CO_2 قرار گرفتند.جنین های ۲ سلولی در گروههای ۲۰-۱٥ عددی به مدت ۹٦ ساعت در قطرات فوق کشت داده شدند. آزمایش فوق برای هر گروه ۱۰ بار تکرار گردید.

ارزیابی تکامل جنین ها:

ارزیابی جنین‌ها در فواصل ۲٤ ساعته و به مدت ٤ روز با میکروسکوپ اینورت انجام شد و جنین‌ها بر اساس موارد زیر دسته‌بندی شدند: جنین‌های ٤- ۲ سلولی، جنین های ۸ سلولی (که جنین‌های ۸-٤ سلولی را هم شامل می‌شدند)، مورولای متراکم[2]، بلاستوسیست[3]، هچینگ بلاستوسیست[4].

شمارش بلاستومرها: پس از اتمام کشت، جنین‌ها جمع‌آوری و پس از ۲ بار شستشو در PBS به مدت ساعت در پارافرمالدئید ٤٪ فیکس شدند. سپس به روی لام میکروسکوپی انتقال یافته و لامها به مدت ۲٤ ساعت در دمای اطاق نگهداری شدند تا خشک شوند. سپس لامهای فوق دو بار با PBS شسته شده و مجدداً ۲ ساعت در دمای اطاق نگهداری شدند تا خشک شوند. پس از خشک شدن لامها، یک قطره از مخلوط رنگ Hochest 33254 (w/v) ٥٪ در DABCO (1,4-diazobi cyclo-2,2,2-octete-sigma) حاوی (۹۰٪) گلسیرول و (۱۰٪) $2Na_2HP00_3$/. مول به روی لامها

جدول ۱- میزان رشد جنین‌ها در محیط‌های کشت کنترل و محیطهای حاوی غلظت‌های بالای گلوکز (HG) و L-arginine و L-NAME

گروههای مطالعه	تعداد نمونه	نسبت مورولای متراکم (±SD) پس از ۲۴ ساعت (٪)	نسبت بلاستوسیت (±SD) پس از۴۸ ساعت (٪)	نسبت بلاستوسیت (±SD) پس از۷۲ ساعت (٪)	نسبت هچینگ (±SD) پس از۹۶ ساعت (٪)
کنترل	۱۷۲	۹٥ (±۲/٦٥)	۷٤/٦ (±۸/۱)	۷۹/۸ (±٥)	۳۲ (±٤)
HG	۱۷۸	۸۹/٥ (±٥/٥۲)	۳٦/۹ (±٥/۳)	٤۳ (±٥/٥)	۱۰ (±۷)
HG-5LA	۱۷٦	۹۳/۹ (±٦)	٦۱/٦۷ (±٥)	٦۷ (±٥/٤)	۲۰/۷ (±۷/۷)
HG-10LA	۱۷٥	۹٥/٤۲ (±٤/۳)	٦۲/۲٥ (±۷/٦)	٦۹/٥ (±۷)	۲٥/۳۳ (±٦/٦)
HG-20LA	۱۷٦	٦۲/٤٦ (±۷/٥)	۲۷/۸ (±٤/۷٦)	۲۷/٥ (±۱٦)	۱۰/۳ (±٦/۳)
HG-L-NAME	۱۷۲	۱۷ (±۳/۸۲)	-	-	-

1- High Glucose

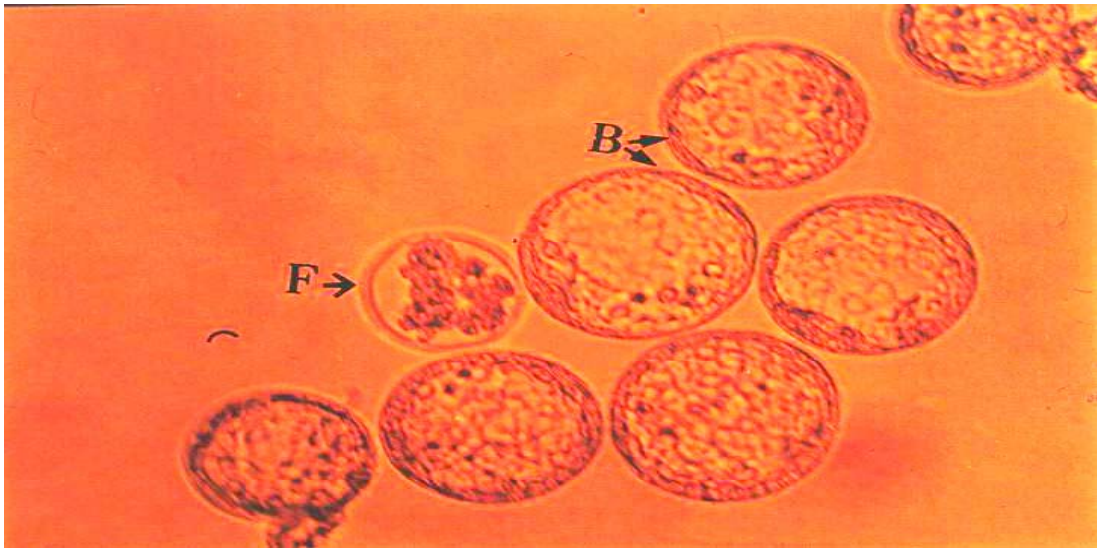
2-Compacted Morula
3- Blastocyst
4-Hatching blastocyst

Downloaded from http://www.jri.ir

ریخته و نمونه‌ها به آرامی بوسیله یک لامل پوشیده شدند. در پایان اسلایدهای تهیه شده با کمک یک میکروسکوپ فلورسانس (Olympus Japan) و با استفاده از فیلتر Exitation با طول موج ۳۳۰-۳۸۰*nm* و فیلتر Barrier با طول موج ٤٢٠*nm* بررسی شدند. در این روش هستهٔ سلولهای جنینی با Hochest رنگ آبی به خود گرفته و تعداد آنها قابل شمارش می‌باشد.

آنالیز آماری:

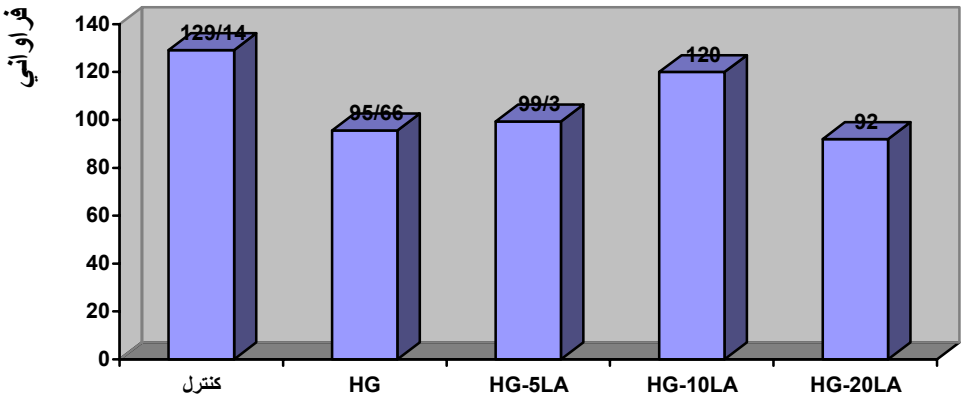
میزان تکامل جنین‌های گروههای مختلف و تعداد متوسط بلاستومرها در گروههای مختلف با استفاده از آزمون ANOVA یکطرفه و با کمک نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.



شکل ۱- این تصویر چند بلاستوسیت (B) و یک جنین قطعه قطعه شده (Fragmented) (F) از گروه کنترل را ۷۲ ساعت پس از کشت نشان داده شده است.

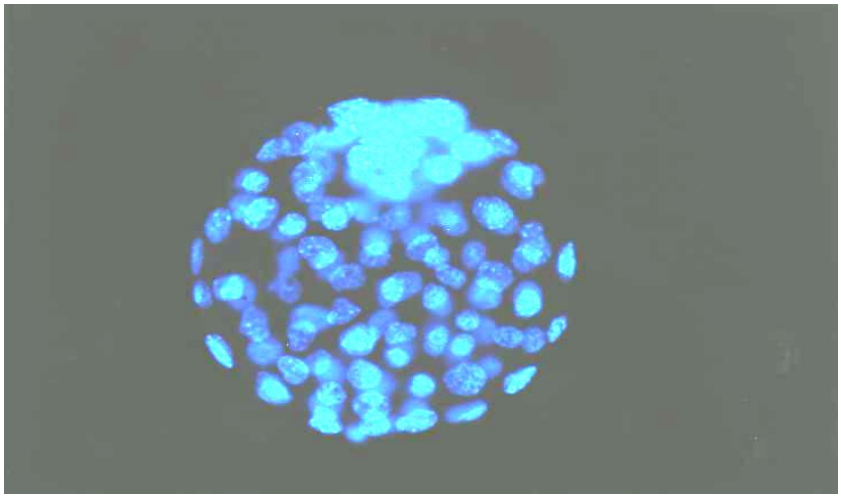
نتایج:

مقایسه تکامل جنین‌های موش طی ۹٦ ساعت کشت در گروههای مختلف در جدول ۱ آمده است. مقایسه میزان مورولاهای متراکم در ٢٤ ساعت اول کشت نشان داد در حالی که بیش از (۲/٦٥±)۹٥٪ جنین‌های گروه کنترل به مرحله مورولای متراکم رسیده بودند این میزان در گروه



نمودار 1- میانگین تعداد کل بلاستومرها در گروههاي مختلف

Downloaded from http://www.jri.ir



شکل ۲- تصویر یک بلاستوسیت که با رنگ Hochest 33254 رنگ‌آمیزی شده است. در این تصویر هستهٔ بلاستومرها به رنگ روشن مشخص شده است

HG(±۵/۵۲)۸۹/۹٪ و در گروههای HG-5LA و HG-10LA به ترتیب (±٦) ۹۳/۹٪ و (±٤/٤۳)۹۵/٤۲٪ بود که هیچ تفاوت معنی‌داری بین آنها وجود نداشت اما تنها (±۷/۲۵)٦۲/٤٦٪ از جنینهای گروه HG-20LA و (±۳/۸۲)۱٦/۹۹٪ از گروه HG-L-NAME به مورولای متراکم تبدیل شدند که اختلاف آن با گروه کنترل معنی‌دار است. بررسی میزان بلاستوسیستها طی ۷۲ ساعت پس از کشت نشان داد در حالیکه بیش از (±۸/۱)۷٤/٦٪ از جنین‌های گروه کنترل به مرحله بلاستوسیت رسیده بودند (شکل ۱)، این میزان در گروه HG تنها (±۵/۵)۳٦/۹٪ میباشد (جدول ۱). میزان بلاستوسیت ها درگروههای HG-5LA و HG-10LA به ترتیب (±۵)٦۱/۷٦٪ و (±۷/٦)٦۲/۲۵٪ که هم نسبت به گروه کنترل و هم گروه HG افزایش واضح و معنی‌داری را نشان می‌داد (P<۰/۰۰۰۱). درگروه HG-20LA نیز تنها (±۱٦)۲۷/۸٪ از جنینها به مرحله بلاستوسیست رسیدند و در گروه HG-L-NAME هیچ جنینی به بلاستوسیست نرسیده و تمامی جنینها فراگمنته[1] شدند. میزان بلاستوسیستها ۷۲ ساعت پس از کشت نیز در گروه کنترل (±۵)۷۹/۸۲٪ گروه HG (±۵/۵)٤۳٪ و گروههای HG-5LA، HG-10LA و HG-20LA به ترتیب (±۵/٤)٦۷٪، (±۷)٦۹/۵٪ و (±۱٦)۲۷/۵٪ بود. ۹٦ ساعت پس از کشت درحالیکه ٤±۳۲٪ از جنین‌های گروه کنترل در مرحلهٔ هچینگ[2] بودند فقط ۷±۱۰٪ از جنین‌های گروه HG هچینگ داشتند و در گروههای ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار L-arginine نیز به ترتیب ۷/۷±۷/۷، ٦/۲۰±٦/۳۳و۲۵/۳±٦/۳ درصد بود. بر اساس نتایج فوق تکامل جنین‌ها درگروه HG-10LA, HG-5LA و بطور معنی‌داری با گروه HG تفاوت دارد (P<۰/۰۰۰۱). این تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل نیز مشاهده می شود.

میانگین تعداد کل بلاستومرها در جنین‌های گروههای مختلف پس از ۹٦ ساعت کشت در نمودار ۱ نشان داده شده است. مقایسهٔ میانگین تعداد بلاستومرها (شکل ۲) در گروههای مختلف نشان می‌دهد که بطور متوسط تعداد بلاستومرها در بلاستوسیست‌های گروه کنترل (±۱۷/٤۳)۱۲۹/۱٤ عدد بود در حالیکه این رقم در گروه HG، (±۱٦/۷۳)۹۵/٦٦ بود که با افزودن L-arginine به محیط کشت تعداد بلاستومرها افزایش یافته و در گروههای HG-5LA، HG-10LA و HG-20LA به ترتیب (۱۹/۷۳) ±۱۱۹ و (۱۵/۷)±۱۲۰ و (۱۱)±۹۲ عدد بود که اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه HG،

1-Fragmented

2-Hatching

Downloaded from http://www.jri.ir

HG-20LA و HG-10LA وجود دارد (P<۰/۰۰۰۱)، اما بین گروه کنترل و گروههای HG-5LA، HG-10LA این اختلاف بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد. بدلیل آنکه تکوین جنین‌های گروههایHG-L-NAME در مرحلهٔ قبل از مورولا متوقف می‌گردید، جنین‌های فوق از برنامه شمارش بلاستومرها حذف گردیدند.

بحث

مقایسهٔ کشت جنین‌ها در محیطهای کشت HTF با غلظتهای مختلف گلوکز وL-arginine نشان داد که افزایش غلظت گلوکز تا ۳۰*mM* کاملاً بر روی تکامل جنین اثر گذاشته و باعث تأخیر در رشد و کاهش تعداد بلاستومرها در بلاستوسیست می‌گردد. با مقایسه نتایج بدست آمده از این پژوهش با نتایج بدست آمده توسط محققین دیگر مشاهده می‌شود که تشابهات و در عین حال تفاوتهایی وجود دارد. به عنوان مثال Wercheral و همکاران در سال ۱۹۹۸ گزارش نمودند (۲) که تنها ۲۰٪ از جنین‌هایی که ۹۶ ساعت پس از تزریق HCG ازموشهای دیابتی جمع‌آوری شدند به مرحلهٔ بلاستوسیست می‌رسند درحالیکه این رقم در مورد گروه کنترل در حدود ۹۰٪ می‌باشد. در مطالعه حاضر نیز دیده شد که ۷۲ ساعت پس از کشت در حدود ۷۷٪ از جنین‌های گروه کنترل به مرحلهٔ بلاستوسیست می‌رسند در حالیکه این رقم در گروه HG در حدود ۴۸٪ بود که افزایش سطح L-arginine در محیط کشت HG به میزان ۵*mM* و ۱۰*mM* این میزان را بطور معنی‌داری افزایش داده بود. در حالیکه با افزایش میزان L-arginine تا ۲۰*mM* از میزان جنینهای رسیده به مرحله بلاستوسیست کاسته می‌شود واین امر نشان می‌دهد که افزایش بیش از اندازه L-arginine در محیط کشت اثر منفی بر رشد و تکامل جنین‌ها بر جای می‌گذارد. همچنین در این مطالعه مشاهده گردید که افزایش غلظت گلوکز تا ۳۰*mM* تأثیر چندانی در تکامل جنین تا مرحله مورولای متراکم ندارد در حالیکه افزودن یک مادهٔ مهار کننده NO بنام L-NAME به میزان ۱ *mM* باعث مهار شدید تکامل جنین در مرحله فوق شده و از تشکیل مورولای متراکم تا حدود زیادی جلوگیری می‌کند. از طرف دیگر افزایش سطح گلوکز محیط کشت، تبدیل مورولای متراکم به بلاستوسیست را شدیداً تحت تأثیر قرار داده و موجب تأخیر در آن می‌گردد و افزایش L-arginine تا میزان ۱۰ *mM* در محیط کشت تا حدودی می‌تواند این روند را بهبود بخشد. لیکن هرگاه میزان L-arginine تا میزان *mM* ۲۰ افزایش یابد، بطور معنی‌داری از میزان جنینهای مرحلهٔ بلاستوسیستها کاسته می‌شود. چنین تأثیری در مورد میزان هچینگ نیز مشاهده گردید. همچنین در این تحقیق مشاهده شد که اگر چه تعداد بلاستومرها در بلاستوسیستهای گروه HG نسبت به گروه کنترل بیش از ۳۰٪ کاهش نشان می‌دهند که تقریباً معادل نتایج گزارشات دیگر می‌باشد (۵-۱) لیکن افزودنL-arginine به محیط تا حدود ۱۰ *mM* کاملاً باعث بهبود این وضعیت می‌گردد و بنظر می‌رسد که L-arginine تأثیر کاملاً مثبتی بر روی سیکل سلولی بر جای می گذارد. مقایسه نتایج بدست آمده از این مطالعه با مطالعات مشابه دیگری که برروی انواع سلولها و بافتهای دیگر در شرایط مشابه انجام گرفته نشان می‌دهد که همانند سلولها و بافتهای دیگر، تولید نیتریک اکساید که نقش مهمی در تکامل جنین دارد(۱۷) در محیط HG مختل شده و این نتایج معرف اثرات زیانبار گلوکز بر روی تکامل جنین در مراحل اولیه می‌باشد. بطور مشابهی Trachtman و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که کشت سلولهای Mesangial در محیطهای حاوی *mM* ۳۳ گلوکز باعث ایجاد اختلال در سیستم نیتریک اکساید و کاهش میزان نیتریت تولید شده توسط سلولهای فوق گشته و نهایتاً باعث افزایش مرگ و میر در سلولهای فوق می‌گردد، لیکن افزودن L-arginine به میزان *mM* ۲۰-۱۰ به محیط کشت باعث بهبود روند فوق شده و از عوارض HG برروی سلولهای فوق

Downloaded from http://www.jri.ir

ممانعت بعمل آورد (۱۸) وهمچنین Ho و همکاران نیز در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که نیتریک اکساید می‌تواند از آپوپتوزیس سلولهای اندوتلیال عروق در محیطهای کشت حاوی گلوکز زیاد جلوگیری بعمل آورد(۱۹). مطالعات انجام شده درمورد تکامل جنین و لانه‌گزینی آن نیز حاکی از اهمیت نیتریک اکساید در این مورد می‌باشند بطوریکه Gouge و همکارانش در سال ۱۹۹۸ گزارش نمودند که جنین در مرحله قبل از لانه‌گزینی نیتریک اکساید تولید می‌نماید و این امر نقش مهمی در تکامل و لانه‌گزینی آن را برعهده دارد، بطوریکه مهار تولید NO باعث تأخیر در رشد و جلوگیری از لانه‌گزینی جنین می‌گردد (۱۲). همچنین Navaro و همکارانش در سال ۱۹۹۷ گزارش نمودند که در طی مرحلهٔ پیش لانه‌گزینی نیتریک اکساید توسط رحم و لوله‌ای رحمی مادر ساخته شده و این امر نقش مهمی در تکامل جنین و آماده سازی رحم جهت لانه‌گزینی دارد(۲۰). علی‌رغم موارد فوق، گزارشات متضادی نیز دیده می‌شود بطور مثال Joo و همکارانش در سال ۱۹۹۷ گزارش نمودند که افزودن ماده‌ای نظیر SNP که باعث آزاد سازی نیتریک اکساید بصورت اگزوژن در محیط کشت می‌گردد، منجر به مهار تکامل جنین‌ها در مرحلهٔ پیش لانه‌گزینی می‌گردد (۲۱). لیکن به نظر می‌رسد که NO اندوژن نقش مهمی در تکامل جنین بازی می‌کند. امروزه مشخص شده است که بسیاری از فعالیتهای بیولوژیک NO بواسطهٔ فعال نمودن آنزیم[1] بوده و NO ممکن است در کنترل مسیرهای انتقال پیام وابسته به cGMP در تنظیم فیزیولوژی طبیعی سلول نقش داشته باشد و گزارشات مختلف نیز تقریباً مشخص نموده‌اند که NO و cGMP نقش بسیار مهمی در کنترل سیکل سلولی و روند آپوپتوزیس دارند (۲۲-۲۱، ۱۲). در واقع NO برای تکمیل سیکل سلولی ضروری بوده و کاهش و یا حتی افزایش مقدار NO باعث اختلال در سیکل طبیعی سلول می‌گردد (۲۳-۲۲) لیکن رابطه دقیق بین آشفتگی در سیکل سلولی و ایجاد آپوپتوزیس پس از حذف NO، مشخص نگردیده است و ممکن است مهار یا یک توقف در روند سیکل سلولی تحریک کننده[2] آغاز آپوپتوزیس از طریق فعال نمودن ژنهای مربوطه باشد. از طرف دیگر مطالعات مختلف نشان داده‌اند که شرایط دیابتی باعث افزایش استرس‌های اکسیداتیو[3] شده و به دنبال آن تولید ROS[4] در بدن افزایش می‌یابد (۲۵-۲٤). امروزه مشخص شده است که NO یک فاکتور مهم در محافظت سلولها در برابر اثرات زیانبار ROS می‌باشد و همواره در بدن یک تعادل بحرانی[5] بین ROS و NO وجود دارد و ممکن است که تعادل فوق یک نقش اساسی در فرآیند سیکل سلولی و حیات آن بعهده داشته باشد (۲۵-۲٤، ۲۲). کاهش تولید NO در دیابت می‌تواند ناشی از کاهش L-arginine در دسترس باشد زیرا در افراد دیابتی برداشت L-arginine افزایش یافته و متعاقباً باعث کاهش مقدار در دسترس آن می‌گردد (۱۵). این مطالعه نشان داد که احتمالاً مسئله فوق در مورد تکامل جنین در مرحلهٔ قبل از لانه‌گزینی نیز صادق می‌باشد، زیرا افزایش غلظت L-arginine در محیطهای HG تا ۱۰ *mM* باعث بهبود نسبی عوارض ناشی از High Glucose می‌گردد. باتوجه به نتایج حاصل از این مطالعه بنظر می‌رسد که استفاده از L-arginine و یا مواردی که باعث آزاد سازی NO در محیط می‌گردند دارای نقش مهمی در جلوگیری از برخی از عوارض هیپرگلیسمی بر روی جنین داشته باشد لیکن جهت اظهار نظر دقیق در این مورد و یافتن راههای کاربردی در این مورد انجام مطالعات بیشتر بصورت *In vivo* ضروری می‌باشد.

1-Guanyate cyclase

2-Triggeer
3- Oxidative stress
4- Reactive Oxygen Species
5- Critical balance

Downloaded from http://www.jri.ir

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از گروه زنان و زایمان دانشکده پزشکی دانشگاه یاماگاتا ژاپن که در انجام این طرح با ما کمال همکاری را نمودند سپاسگزاریم. همچنین از آقای دکتر محمد اکبری مدیر محترم گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی تهران و آقای دکتر عظیمی سبحانی سرپرست محترم آزمایشگاه جنین‌شناسی تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

References

1- Richard G., Mccrecken E.J. Disturbed development of the pre implantation embryos in the insulin–depedent diabetic BB/E rats. Diabetes. 1996; 1463-70.
2- Wercheval M., Hertogh R. Experimental diabetes rat embryo development during the pre-implantation period. Diabetologia. 1990; 33: 187-91.
3- Pamfer S., Hertogh R., Vanderhyden I. Increased inner cell mass proportion in blastocyst diabetes. 1990; (39): 471-976.
4- Mill S. Lack of relation of increased malformation in infants of diabetic mother to glycemic control during organogenesis. New Eng J Med. 1998; 318: 671-9.
5- Hertogh R., Vercheval M., Pamfer S. Experimental diabetes interference with the early development of rat embryo in the pre-implantation period. Diabetologia. 1989; 32: 480A.
6- Moley K.H., Chi M.Y., Knudson C.M. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through call death effector pathways. Nature Med. 1998; 4(12): 1421-4.
7- Pamfer S., Vsnderhyden I., Mccracken E.J. Increased cell death in rat blastocysts exposed to maternal diabetes in utero and high glucose or tumor necrosis factor *in vitro*. Dev. 1997; 124: 4827-36.
8- Beebe I., Kaye P. Maternal diabetes and retarded pre-implantation development of mice. Diabetes. 1991; 40: 457-61.
9- Gardner D.K., Leese H.J. Concentration of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. J Reprod Fert. 1990; 88: 361-8.
10- Hertogh R., Vanderheyden I., Pamfer S. Stimulatory and inhibitory effects of glucose and insulin on rat blastocysts development *in vitro*. Diabetes. 1991; 40: 641-7.
11- Xialin Y., Hakanborg L., Eriksson J. Altered mitochondria morphology of rat embryos in diabetic pregnancy. Anat Rec. 1995; 241: 255-67.
12- Gouge R., Marshburn P., Gordon B., et al. Nitric oxide as a regulatory of embryonic development. Biol Reprod. 1998; 58: 875-9.
13- Lindsay R.M. *In vivo* and *in vitro* evidence of altered Nitric oxide metabolisms in the spountaneusly diabetic insulin BB/E rat. Br J Pharmacol. 1997; 120:1-6.
14- Karabatus L.,Fabiano L., Bruno D. Inhabitation of Nitric oxide generation: normalization of *in vitro* insulin secretion in mice. Metab. 1996; 45(8): 940-6.
15- Marina L., Morrison P. Nitric oxide availability in diabetes mellitus. Diabetes Metab Rev. 1998; 14; 241-9.
16- Quinn P., Kerin J., Warnes G.M. Improved pregnancy rats in human *in vitro* fertilization with the use of a media based on the composition of human tubal fluid. Fertil Steril. 1985; 44: 493-8.
17- Huei W.C., Wen S.J., Chii R.T. Nitric oxide as a regulator in pre-implantation

Downloaded from http://www.jri.ir

embryo development and apoptosis. Fertil Steril. 2001; 75 (6): 1163-71.
18- Trachtman H., Futrweit S., Crimmins D. High glucose inhibits nitric oxide production in cultured rat mesangial cells. J Am Soc Nephrol. 1997; 8(8): 1276-82.
19- Ho F., Liau C.S., Liu S.H., et al. Nitric oxide prevents apoptosis of human endothelial cells from high glucose exposure during early stage. J Cell Biochem. 1999; 75(2): 258-63.
20- Novaro V., Gonzalez E. Nitric oxide synthasa regulation during embryonic implantation. Reprod Fertil. 1997; 9: 557-64.
21- Joo B., Park S.H., Park S.J., et al. The effect of nitric oxide on sperm cell function and embryo development. Am J Reprod Immun. 1997; 42(6): 327-34.
22- David A., Wink J., Cook A. Nitric oxide protects against cellular damage by ROS. Toxicol Lett. 1995; 82-3: 221-6.
23- Yvonne E., Janssen M.W. Depletion of Nitric oxide causes cell alteration, apoptosis and oxidative stress. Am Phys Soc. 1998; 1100-8.
24- Ornoy A., Kimyagarov D., Yaffee P., et al. Role of reactive oxygen species in diabetic induced embryo toxicity: studies on pre-implantation mouse embryos cultured in serum from diabetic pregnant women. Isr J Med Sci. 1999; 32(11): 1066-73.
25- Oraly V. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. FEBS Letter. 1995; 396: 131-5.

Downloaded from http://www.jri.ir