

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.)^۲، محمد بربرستانی (Ph.D.)^۲، 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 (Spontaneous Miscarriage) و تولد نوزادانی با ناهنجاری‌های مختلف مادرزادی می‌گردد. بر اساس مطالعات مختلف برخی از مشکلات فوق در مراحل ابتدایی تکامل جنین بویژه در مرحله پیش لانه‌گزینی ایجاد می‌شوند و بنظر می‌رسد که افزایش سطح گلوکز خون بعنوان یک عامل تراژون 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 هیپرگلیسمیک 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 (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ 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. مقایسه کشت جنین‌ها در محیط‌های کشت HTF با غلظت‌های مختلف گلوکز و L-arginine نشان داد که افزایش غلظت گلوکز تا ۳۰ mM کاملاً بر روی تکامل جنین اثر گذاشته و موجب تأخیر در رشد و تکامل جنینها و کاهش تعداد بلاستومر آنها می‌گردد، اما افزودن L-arginine به میزان ۱۰-۵ mM 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 در دسترس 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.

کل 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

مقدمه:

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 جنین‌های ۲ سلولی موش: تحریک تخمک گذاری در موش‌های سوری ماده نژاد NMRI با سن ۶-۱۰ هفته با تزریق داخل صفاتی ۱۰ واحد PMSG و ۴۸ 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. ۴۸ ساعت پس از تزریق HCG موشهای پلاک مثبت به روش نخاعی کردن گردن^۳ 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^۴) تمام جنین‌های ۲ سلولی با ظاهری سالم، پس از شستشوی پی در پی در چند قطره 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.

امروزه این موضوع بخوبی پذیرفته شده است که هیپرگلیسمی مادر در طول بارداری موجب تأخیر در مراحل اولیه رشد و تکامل جنین و بروز ناهنجاریهای مختلف مادرزادی و افزایش خطر سقطهای خودبخودی می‌گردد (۱-۳). هر چند در این مادران در دوران اندام‌زایی^۱ با کنترل هیپرگلیسمی میزان ناهنجاریهای فوق کاهش می‌یابد اما همچنان میزان آن سه تا چهار برابر بیشتر از مادران سالم می‌باشد (۴). بر این اساس ممکن است مشکلات فوق در مراحل ابتدائی‌تر تکامل جنین بویژه در مرحله پیش لانه‌گزینی^۲ حاصل شوند (۵-۸) و افزایش سطح گلوکز خون بعنوان یک عامل تراژون بالقوه در این مورد محسوب می‌شود (۹-۱۱). 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 NO باعث 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 می‌تواند ناشی از کاهش تولید آن در شرایط هیپرگلیسمی و یا شکستن سریع آن پس از تولید باشد (۱۳-۱۴). 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

3- Cervical dislocation

4- Flushing

1- Organogenesis

2- Pre-implantation period

از کشت از هر کدام از محیطهای فوق قطرات ۵۰ میکرولیتری در داخل دیش ۳۵ میلی‌متری (Falcon 3001) تهیه و با روغن مخصوص کشت جنین (Sigma, Oil, Mineral) پوشیده شدند و به منظور ایجاد تعادل دما و گاز در داخل انکوباتور در دمای ۳۷°C و ۵٪ گاز CO₂ قرار گرفتند. جنین‌های ۲ سلولی در گروه‌های ۲۰-۱۵ عددی

محیطهای کشت: در این پژوهش از محیط کشت HTF^۱ (نخستین بار در سال ۱۹۸۵ بر اساس آنالیز ترکیبات مایع لوله رحم انسان توسط Quinn و همکارانش ساخته شد) بعنوان محیط کنترل استفاده گردید (۱۶). غلظت گلوکز در محیط فوق ۲/۸۷ mM بود که با توجه به اهداف پژوهش با تغییر غلظت گلوکز و افزودن غلظتهای مختلفی

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

L-NAME				تعداد نمونه	گروه‌های مطالعه
نسبت بلاستوسیت (±SD) پس از ۹۶ ساعت (%)	نسبت بلاستوسیت (±SD) پس از ۷۲ ساعت (%)	نسبت بلاستوسیت (±SD) پس از ۴۸ ساعت (%)	نسبت مورولای متراکم (±SD) پس از ۲۴ ساعت (%)		
۳۲ (±۴)	۷۹/۸ (±۵)	۷۴/۶ (±۸/۱)	۹۵ (±۲/۶۵)	۱۷۲	کنترل
۱۰ (±۷)	۴۳ (±۵/۵)	۳۶/۹ (±۵/۳)	۸۹/۵ (±۵/۵۲)	۱۷۸	HG
۲۰/۷ (±۷/۷)	۶۷ (±۵/۴)	۶۱/۶۷ (±۵)	۹۳/۹ (±۶)	۱۷۶	HG-5LA
۲۵/۳۳ (±۶/۶)	۶۹/۵ (±۷)	۶۲/۲۵ (±۷/۶)	۹۵/۴۲ (±۴/۳)	۱۷۵	HG-10LA
۱۰/۳ (±۶/۳)	۲۷/۵ (±۱۶)	۲۷/۸ (±۴/۷۶)	۶۲/۴۶ (±۷/۵)	۱۷۶	HG-20LA
-	-	-	۱۷ (±۳/۸۲)	۱۷۲	HG-L-NAME

به مدت ۹۶ ساعت در قطرات فوق کشت داده شدند. آزمایش فوق برای هر گروه ۱۰ بار تکرار گردید.

ارزیابی تکامل جنین‌ها:

ارزیابی جنین‌ها در فواصل ۲۴ ساعته و به مدت ۴ روز با میکروسکوپ اینورت انجام شد و جنین‌ها بر اساس موارد زیر دسته‌بندی شدند: جنین‌های ۴-۲ سلولی، جنین‌های ۸ سلولی (که جنین‌های ۸-۴ سلولی را هم شامل می‌شدند)، مورولای متراکم^۳، بلاستوسیست^۴، هچینگ بلاستوسیست^۵.

شمارش بلاستومرها: پس از اتمام کشت، جنین‌ها جمع‌آوری و پس از ۲ بار شستشو در PBS به مدت ساعت در پارافرمالدئید ۴٪ فیکس شدند. سپس به روی لام میکروسکوپی انتقال یافته و لامها به مدت ۲۴ 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

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^۲، 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.

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

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

۶- محیط HG-L-NAME، برای ساخت این محیط به محیط HG مقدار ۸ mM L-NAME اضافه گردید. به هرکدام از محیط‌های فوق قبل از استفاده ۴ mg/ml آلبومین سرم گاوی (BSA) نیز اضافه شد. ۲۴ ساعت قبل

2-Compacted Morula

3- Blastocyst

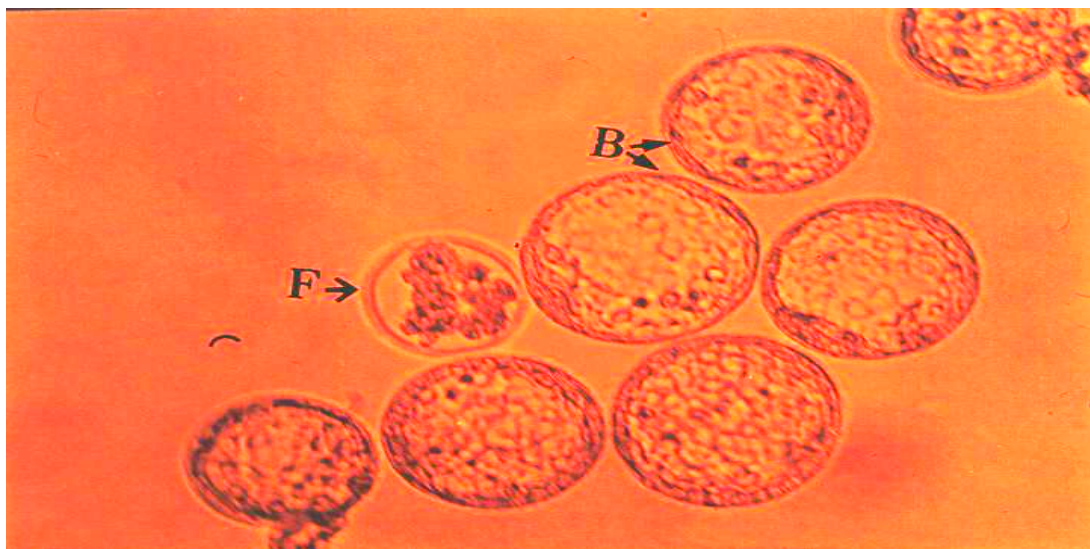
4-Hatching blastocyst

5- Haman Tubal Fluid

1- High Glucose

خود گرفته و تعداد آنها قابل شمارش می‌باشد.

خشک شوند. پس از خشک شدن لامها، یک قطره از مخلوط رنگ Hocheist 33254 (w/v) ۵٪ در DABCO



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

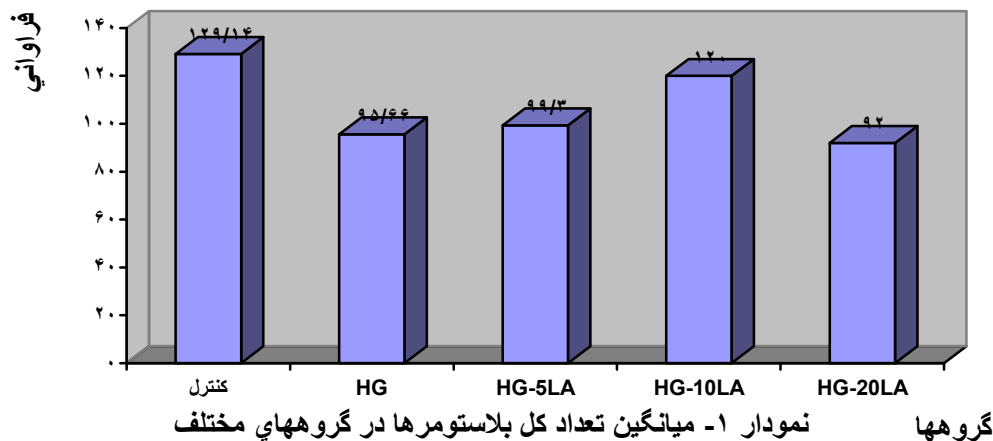
آنالیز آماری:

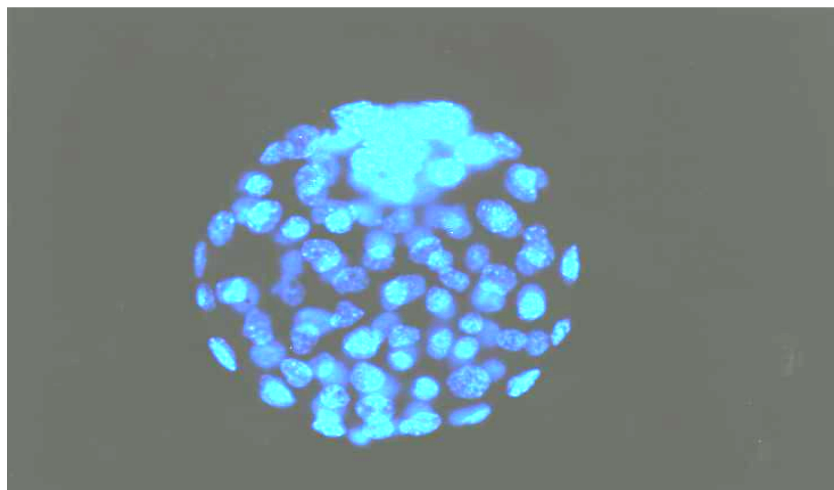
میزان تکامل جنین‌های گروه‌های مختلف و تعداد متوسط بلاستومرها در گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون ANOVA یکطرفه و با کمک نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج:

مقایسه تکامل جنین‌های موش طی ۹۶ ساعت کشت در

(1,4-diazobi cyclo-2,2,2-octete-sigma) حاوی (۹۰٪) گلسیرول و (۱۰٪) $\text{Na}_2\text{HP00}_3$. مول به روی لامها 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 Excitation با طول موج ۳۸۰-۳۳۰ nm و فیلتر Barrier با طول موج ۴۲۰ nm بررسی شدند. در این روش هسته سلولهای جنینی با رنگ آبی به





شکل ۲- تصویر یک بلاستوسیت که با رنگ Hoechst 33254 رنگ آمیزی شده است. در این تصویر هسته بلاستومرها به رنگ روشن مشخص شده است

نرسیده و تمامی جنینها فراگمنته^۱ شدند. میزان بلاستوسیسیتها ۷۲ ساعت پس از کشت نیز در گروه کنترل ($0.79/0.82 \pm$)، گروه HG (0.43 ± 0.05) و گروههای HG-5LA، HG-10LA و HG-20LA به ترتیب 0.67 ± 0.04 ، 0.69 ± 0.05 و 0.27 ± 0.16 بود. ۹۶ ساعت پس از کشت درحالیکه 0.32 ± 0.04 از جنینهای گروه کنترل در مرحله هچینگ^۲ بودند فقط 0.10 ± 0.07 از جنینهای گروه HG هچینگ داشتند و در گروههای ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی مولار L-arginine نیز به ترتیب 0.67 ± 0.07 ، 0.67 ± 0.07 و 0.33 ± 0.25 درصد بود. بر اساس نتایج فوق تکامل جنینها در گروه و HG-5LA، HG-10LA بطور معنی داری با گروه HG تفاوت دارد ($P < 0.0001$). این تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل نیز مشاهده می شود.

میانگین تعداد کل بلاستومرها در جنینهای گروههای مختلف پس از ۹۶ ساعت کشت در نمودار ۱ نشان داده شده است. مقایسه میانگین تعداد بلاستومرها (شکل ۲) در گروههای مختلف نشان می دهد که بطور متوسط تعداد بلاستومرها در بلاستوسیسیت های گروه کنترل ($0.17/0.43 \pm$) عدد بود در حالی که این رقم در گروه HG، $0.16/0.73 \pm$ بود که با افزودن L-arginine به محیط کشت تعداد بلاستومرها افزایش یافته و در

گروههای مختلف در جدول ۱ آمده است. مقایسه میزان مورولاهای متراکم در ۲۴ ساعت اول کشت نشان داد در حالی که بیش از $0.95 \pm 0.2/0.65$ جنینهای گروه کنترل به مرحله مورولای متراکم رسیده بودند این میزان در گروه HG ($0.89/0.9 \pm$) و در گروههای HG-5LA و HG-10LA به ترتیب $0.93/0.9 \pm$ و $0.95/0.42 \pm$ بود که هیچ تفاوت معنی داری بین آنها وجود نداشت اما تنها $0.62/0.46 \pm$ از جنینهای گروه HG-20LA و $0.16/0.99 \pm$ از گروه HG-L-NAME به مورولای متراکم تبدیل شدند که اختلاف آن با گروه کنترل معنی دار است. بررسی میزان بلاستوسیسیتها طی ۷۲ ساعت پس از کشت نشان داد در حالی که بیش از $0.74/0.6 \pm$ از جنینهای گروه کنترل به مرحله بلاستوسیت رسیده بودند (شکل ۱)، این میزان در گروه HG تنها $0.36/0.9 \pm$ میباشد (جدول ۱). میزان بلاستوسیت ها در گروههای HG-5LA و HG-10LA به ترتیب $0.61/0.76 \pm$ و $0.62/0.25 \pm$ که هم نسبت به گروه کنترل و هم گروه HG افزایش واضح و معنی داری را نشان می داد ($P < 0.0001$). در گروه HG-20LA نیز تنها $0.27/0.8 \pm$ از جنینها به مرحله بلاستوسیت رسیدند و در گروه HG-L-NAME هیچ جنینی به بلاستوسیت

1-Fragmented

2-Hatching

منفی بر رشد و تکامل جنین‌ها بر جای می‌گذارد. همچنین در این مطالعه مشاهده گردید که افزایش غلظت گلوکز تا 30mM تأثیر چندانی در تکامل جنین تا مرحله مورولای متراکم ندارد در حالیکه افزودن یک ماده مهار کننده NO بنام L-NAME به میزان 1mM 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 10mM در محیط کشت تا حدودی می‌تواند این روند را بهبود بخشد. لیکن هرگاه میزان L-arginine تا میزان 20mM افزایش یابد، بطور معنی‌داری از میزان جنین‌های مرحله بلاستوسیست 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 افزودن L-arginine به محیط تا حدود 10mM کاملاً باعث بهبود این وضعیت می‌گردد و بنظر می‌رسد که L-arginine تأثیر کاملاً مثبتی بر روی سیکل سلولی بر جای می‌گذارد. مقایسه نتایج بدست آمده از این مطالعه با مطالعات مشابه دیگری که بر روی 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 33mM گلوکز باعث ایجاد اختلال در سیستم نیتریک اکساید و کاهش میزان نیتریت تولید شده توسط سلولهای فوق گشته و نهایتاً باعث افزایش مرگ و

گروههای HG-5LA، HG-10LA و HG-20LA به ترتیب $119 \pm (19/73)$ و $120 \pm (15/7)$ و $92 \pm (11)$ عدد بود که اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه HG، HG-20LA و HG-10LA وجود دارد ($P < 0.0001$)، اما بین گروه کنترل و گروههای HG-5LA، HG-10LA این اختلاف بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد. بدلیل آنکه تکوین جنین‌های گروههای HG-L-NAME در مرحله قبل از مورولا متوقف می‌گردد، جنین‌های فوق از برنامه شمارش بلاستومرها حذف گردیدند.

بحث

مقایسه کشت جنین‌ها در محیطهای کشت HTF با غلظتهای مختلف گلوکز و L-arginine نشان داد که افزایش غلظت گلوکز تا 30mM 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 از موشهای دیابتی جمع‌آوری شدند به مرحله بلاستوسیست می‌رسند در حالیکه 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 مرحله بلاستوسیست می‌رسند در حالیکه این رقم در گروه HG در حدود ۴۸٪ بود که افزایش سطح L-arginine در محیط کشت HG به میزان 5mM و 10mM این میزان را بطور معنی‌داری افزایش داده بود. در حالیکه با افزایش میزان L-arginine تا 20mM از میزان جنینهای رسیده به مرحله بلاستوسیست کاسته می‌شود و این امر نشان می‌دهد که افزایش بیش از اندازه L-arginine در محیط کشت اثر

واقع NO برای تکمیل سیکل سلولی ضروری بوده و کاهش و یا حتی افزایش مقدار NO باعث اختلال در سیکل طبیعی سلول می‌گردد (۲۲-۲۳) 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^۲ آغاز آپوپتوزیس از طریق فعال نمودن ژنهای مربوطه باشد. از طرف دیگر مطالعات مختلف نشان داده‌اند که شرایط دیابتی باعث افزایش استرس‌های اکسیداتیو^۳ شده و به دنبال آن تولید ROS^۴ در بدن افزایش می‌یابد (۲۴-۲۵). 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^۵ 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 (۲۴-۲۵، 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 مرحله 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.

میر در سلولهای فوق می‌گردد، لیکن افزودن L-arginine به میزان ۲۰-۱۰ mM به محیط کشت باعث بهبود روند فوق شده و از عوارض HG بر روی سلولهای فوق ممانعت بعمل آورد (۱۸) و همچنین 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 در مورد 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 مرحله 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 اگزوزن در محیط کشت می‌گردد، منجر به مهار تکامل جنین‌ها در مرحله پیش لانه‌گزینی می‌گردد (۲۱). لیکن به نظر می‌رسد که NO اندوزن نقش مهمی در تکامل جنین بازی می‌کند. امروزه مشخص شده است که بسیاری از فعالیت‌های بیولوژیک NO بواسطه فعال نمودن آنزیم^۱ 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

2-Trigger

3- Oxidative stress

4- Reactive Oxygen Species

5- Critical balance

1-Guanyate cyclase

محمد اکبری مدیر محترم گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی تهران و آقای دکتر عظیمی سبحانی سرپرست محترم آزمایشگاه جنین‌شناسی تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

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

References

- 1- Richard G., Mccracken 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 cell 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 spountaneously 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 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., Liao 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.