

## 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 احمد رضا 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 در تولید 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 مرحله پیش لانه گزینی به هنگام کشت در محیط کشت حاوی گلوکز بالا (۳۰ میلی 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 نانل 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 نیتريت موجود در محیط پس از اتمام دوره کشت با استفاده از روش Greiss تعیین گردید.

مقایسه 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 مرحله پیش لانه گزینی به تأخیر 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 ۲۰-۱۰ میلی 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 از L-arginine موجب افزایش تولید نیتریک اکساید در شرایط هیپرگلیسمی شده و از 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 نظیر 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 شده 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 شده (۵) و از طرف دیگر تعداد سلولهای آپوپتوتیک را در مرحله بلاستوسیست بطور معنی داری افزایش می دهد که این افزایش بویژه در توده سلولی درونی Inner Cell Mass (ICM) قابل توجه 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 تواند منشاء ناهنجاریهای مختلف باشد (۶،۷). بنظر می رسد که افزایش غلظت گلوکز خون (Hyperglycemia) به عنوان یک عامل تراژون 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 اثرات تخریبی گلوکز بر روی جنین و افزایش آپوپتوزیس در سلولهای جنینی می باشند (۱۱-۱۸). همچنین با اطلاعاتی که در سالهای اخیر در مورد مولکول نیتریک اکساید (NO) و نقش آن در بافتهای مختلف بدست آمده است مشخص گردیده که تغییر در سنتز مولکول فوق نقش

مهمی در پاتوژنز هیپرگلیسمی بازی می کند (۲۰،۱۹). نیتریک اکساید یک مولکول رادیکال آزاد می باشد که توسط ایزوفرمهای مختلف آنزیم NOS از اکسیداسیون اسید 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 رسد که کاهش میزان L-arginine در دسترس، یکی از مهمترین علل کاهش تولید NO در هیپرگلیسمی میباشد. زیرا ثابت شده است که در شرایط فوق ابتدا برداشت L-arginine که ماده زمینه ای لازم برای تولید NO می باشد توسط سلولها افزایش می یابد. که این امر متعاقباً دسترسی سلولها به L-arginine را کاهش داده و از تولید NO میکاهد (۲۰،۱۹).

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 در محیط 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 می گردد و از طرف دیگر با کاهش سطح L-arginine تولید NO کاهش می یابد (۲۳،۲۰،۱۹) و آنزیم فوق بجای NO رادیکالهای آزاد اکسیژن تولید نموده و موجب آسیب سلول 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 در تکامل و لانه گزینی جنین بعهد دارد. بطوریکه مهار تولید آن موجب اختلال در تکامل و جلوگیری از لانه گزینی جنین می گردد (۲۶-۲۴). با توجه به مطالب ذکر شده بنظر می رسد که هیپرگلیسمی با ایجاد اختلال در تولید نیتریک اکساید می تواند تکامل

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

- ۱- محیط کنترل: جهت گروه کنترل از محیط HTF با افزودن ۰/۵ میلی مولار L-arginine به آن استفاده شد.
  - ۲- محیط High Glucose (HG): جهت ساخت این محیط، غلظت گلوکز محیط کنترل تا ۳۰ میلی مول افزایش یافت.
  - ۳- محیط HG-5LA: برای ساخت این محیط به محیط HG مقدار ۵ میلی مول L-arginine اضافه گردید.
  - ۴- محیط HG-10LA: برای ساخت این محیط به محیط HG مقدار ۱۰ میلی مول L-arginine اضافه گردید.
  - ۵- محیط HG-20LA: برای ساخت این محیط به محیط HG مقدار ۲۰ میلی مول L-arginine اضافه شد.
  - ۶- محیط HTF-LNAME: برای ساخت این محیط به محیط کنترل مقدار ۱ میلی مول L-NAME که یک مهار کننده NOS می باشد، اضافه گردید.
  - ۷- محیط HG-LNAME: برای ساخت این محیط به محیط HG مقدار ۱ میلی مول L-NAME اضافه گردید.
- به هر کدام از محیطها قبل از استفاده ۴ mg/ml آلبومین سرم گاوی (BSA) نیز اضافه گردید. سپس یک میلی لیتر از هر کدام از محیطهای فوق ۲۴ ساعت قبل از کشت به داخل ظرف مخصوص کشت جنین (Falcon 3037) ریخته شد. و سپس ظرفها به منظور ایجاد تعادل دما و CO<sub>2</sub> در داخل انکوباتور در دمای ۳۷° c و ۵٪ گاز CO<sub>2</sub> قرار گرفتند. پس از آماده سازی محیطها جنینهای ۲ سلولی جمع آوری شده در گروههای ۲۰-۱۵ عددی به داخل آنها انتقال یافته و به مدت ۹۶ ساعت کشت داده شدند. در پایان تعداد جنینهایی که به مرحله 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 فلوروسنس از لحاظ تعداد سلولهای آپوپتوتیک بررسی شدند. محیطهای کشت مصرف شده نیز جمع آوری و میزان نیتريت آنها اندازه گیری شد. روشهایی که در این مطالعه برای بررسی آپوپتوزیس و سنجش نیتريت مورد استفاده قرار گرفت بطور مختصر بدین شرح می باشد:

جنین را در مرحله 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 ماده از نژاد N-Mari با سن ۱۰-۶ هفته با تزریق داخل صفتی ۱۰ واحد Human Monoposal Gonadotrophin (HMG) و ۴۸ ساعت بعد ۱۰ واحد Human Chorionic Gonadotrophin (hCG) تحریک تخمگذاری شدند و بلافاصله پس از تزریق hCG هر حیوان ماده در کنار یک موش نر بالغ از همان نژاد قرار گرفته و صبح روز بعد از نظر پلاک 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 قطر ۱۰۰-۵۰ میکرولیتری از محیط کشت HEPES-HTF حاوی ۴ میلی گرم در میلی لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA, Sigma, A8806) فاکتور 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 فلاشینگ Flushing). سپس تمامی جنینهای ۲ سلولی در یک قطره جمع آوری شده و به طور تصادفی به تعداد ۲۰-۱۵ عدد در گروههای مورد مطالعه تقسیم شدند. این عمل ۱۰ بار تکرار گردید بطوریکه در نهایت در هر گروه ۲۰۰-۱۵۰ جنین مورد آزمایش قرار گرفتند.

محیط کشت: در این پژوهش از محیط کشت Human Tubal Fluid (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 می باشد. جهت ساخت محیط کنترل با توجه 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 تا ۳۰ mM افزایش داده شد. سپس با افزودن غلظتهای مختلف L-arginine یا L-NAME به محیطهای کشت درمانی برای گروههای مختلف مورد مطالعه ساخته شد.

در هر مورد میانگین اعداد بدست آمده تعیین و ثبت شد. پس از شمارش سلولهای آپوپتوتیک و غیر آپوپتوتیک ضریب (Index) آپوپتوزیس برای هر بلاستوسیس با استفاده از فرمول زیر تعیین گردید (۲۷).

ضریب آپوپتوتیک (AP. Index)

$100 \times$  تعداد کل سلولها / تعداد سلولهای آپوپتوتیک  
اندازه گیری میزان نیتريت موجود در محیطهای مصرف شده پس از اتمام کشت:

مقدار نیتريت (NO<sub>2</sub>) موجود در محیط های مصرف شده پس از اتمام دوره کشت نشان دهنده مقدار نیتريك اکساید تولید شده توسط جنینها می باشد زیرا نیتريك اکساید بسیار ناپایدار بوده و پس از تولید سریعاً به نوع پایدار نیتريت تبدیل می شود. نیتريت یک شاخص قابل اطمینان جهت مقدار نیتريك اکساید تولید شده توسط سلولها در طی دوران کشت می باشد (۲۴).

جهت اندازه گیری نیتريت از روش گریس (Greiss assay method) استفاده گردید (۲۴). بدین منظور پس اتمام هر دوره کشت محیط مصرف شده بوسیله یک پمپ پاستور جمع آوری و در فریزر  $20^{\circ}\text{C}$  - با استفاده از  $25\mu\text{l}$  معرف Greiss (متشکل از سولفانیلامید  $1\%$  + نفتالین دی هیدروکلرید  $1\%$  حل شده در اسید ارتو فسفریک  $2/5\%$ ) و  $75\mu\text{l}$  از محیط هایی که در آنها جنینها کشت داده شده بودند یا محلولهای استاندارد نیتريت سدیم ( $100\mu\text{M}$  -  $0/78$ ) انجام پذیرفت. همچنین از محیط کنترل استفاده نشده نیز بعنوان (blank) استفاده شد (۲۴). برای هر نمونه سنجش نیتريت دو بار تکرار شد. این اندازه گیری توسط دستگاه Eliza Reader در  $540\text{nm}$  انجام گرفت. سپس با استفاده از رگرسیون خطی مقدار نیتريت در نمونه های مختلف از روی منحنی استاندارد تعیین گردید.

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

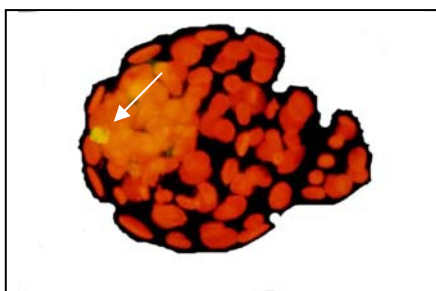
بررسی آپوپتوزیس در بلاستوسیسها با استفاده از روش تانل (TUNEL):

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

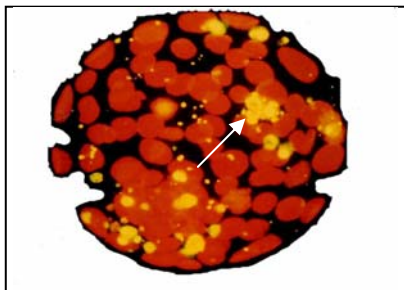
پس از اتمام کشت، جنینها در پارافرمالدئید  $3/7\%$  فیکس شدند و پس از شفاف سازی در محلول ۱ / ۰ درصد TritonX -100 به داخل محلولی متشکل از آنزیم TdT و Flourcein-conjugated dutp (محصول شرکت Roche) انتقال یافته و به مدت یک ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و تاریکی نگهداری شدند. قبل از مرحله فوق جنینهای گروه کنترل مثبت (positive control) بمدت یکساعت در محلول  $50\text{mg/ml}$  دزاکسی ریبونوکلتاز I (DNase I, Sigma) در دمای  $37^{\circ}$  تیمار شدند و جنینهای گروه کنترل منفی نیز در طی انجام تکنیک TUNEL بمدت یک ساعت در Flourcein-dutp بدون استفاده از TdT نگهداری شدند. پس از تکنیک TUNEL جنینها به داخل یک قطره RNase A (sigma) با غلظت  $50\text{mg/ml}$  انتقال یافته و بمدت یک ساعت در دمای اتاق در تاریکی تیمار شدند. آنگاه جهت رنگ آمیزی دوگانه (Double-Staining) به داخل قطرات حاوی  $10$  میکروگرم در میلی لیتر از رنگ Propidium Iodid (PI) که در PBS رقیق شده بود انتقال یافته و به مدت یکساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. سرانجام به داخل یک قطره از محلولی حاوی  $90\%$  گلیسرول و  $10\%$   $Na_2Hpo_3$   $0/2$  مول بر روی اسلاید میکروسکوپی انتقال یافته و پس از آنکه بوسیله یک لامل پوشیده شدند توسط یک میکروسکوپ فلئورسانس (Olympus) و با استفاده از یک فیلتر خروجی (Exitation) با طول موج  $460-490\text{nm}$  و فیلتر حائل (Barrier) با طول موج  $515\text{nm}$  مورد بررسی واقع شدند. در این روش هسته های سلولهای غیر آپوپتوتیک که با PI رنگ گرفته اند قرمز رنگ و هسته های سلولهای آپوپتوتیک که با FITC رنگ آمیزی شده اند به رنگ سبز طلایی قابل تشخیص می باشند. با توجه به ساختمان کروی بلاستوسیس، شمارش سلولی با تنظیم میکروسکوپ در سه مقطع از هر بلاستوسیس بعمل آمد و جهت بالا بردن دقت در کار، شمارش سلولی برای تمام جنینها توسط یک نفر انجام شد و هر شمارش نیز دو بار تکرار گردید و

بلاستوسیست افزایش یافته است ( $0.66 \pm 0.05$ ) لیکن همچنان اختلاف معنی داری با گروههای کنترل ( $p < 0.05$ ) و HG ( $p < 0.0001$ ) دارد. همچنین از این نظر تمامی گروههای درمانی دیگر نیز با گروه HG تفاوت معنی داری نشان می دهند ( $p < 0.0001$ ). 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.

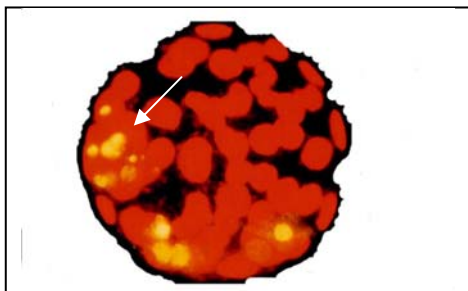
میزان آپوپتوزیس در بلاستوسیتها با استفاده از تکنیک تانل در شکلهای ۲ و ۳ و ۴ نشان داده شده است.



شکل ۲: تصویر یک بلاستوسیست از گروه کنترل که ۹۶ ساعت پس از کشت و پس از تکنیک تانل (TUNEL) توسط میکروسکوپ فلوروسنس برداشته شده است



شکل ۳: تصویر یک بلاستوسیست از گروه HG، ۹۶ ساعت پس از کشت و پس از تکنیک تانل (TUNEL) توسط میکروسکوپ فلوروسنس برداشته شده است



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

\* علامت فلش در شکلها هسته های آپپتوتیک می باشند.

(در هنگامی که واریانسها اختلاف داشتند) با کمک نرم آفزار SPSS10 مورد مقایسه قرار گرفتند.

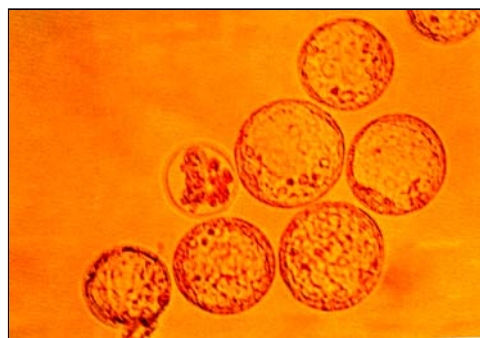
### نتایج:

میانگین تشکیل بلاستوسیست ۹۶ ساعت 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                            | --  |
| HG-LNAME            | ۱۷۲                            | --  |

همانطور که در جدول فوق مشاهده می گردد در حالیکه بیش از  $79.8 \pm 5\%$  از جنینهای گروه کنترل به مرحله بلاستوسیست رسیده اند (شکل ۱). این میزان در گروه با گلوکز بالا (HG) تنها  $43 \pm 5.5\%$  بود که اختلاف معنی داری را با گروه کنترل نشان می دهد ( $p < 0.0001$ ).



شکل ۱: بلاستوسیستهای گروه کنترل ۹۶ ساعت پس از کشت

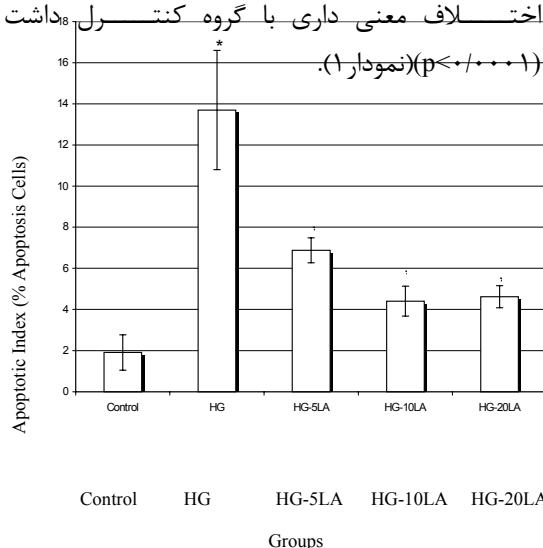
میانگین تعداد بلاستوسیتها در گروههای HG-5LA و HG-20LA به ترتیب  $57.8 \pm 4.6\%$  و  $60.5 \pm 4.4\%$  می باشد که این گروهها نیز تفاوت معنی داری را با گروه کنترل نشان می دهند ( $p < 0.0001$ ). از طرف دیگر اگرچه در گروه HG-10LA میانگین تشکیل

همانطور که در نمودار مشاهده می گردد مقدار نیتريت در محیط کشت گروه HG نسبت به گروه کنترل بطور معنی داری کمتر است ( $P < 0.0001$ ). میزان نیتريت در گروههای HG-10LA و HG-20LA اختلاف معنی داری با کنترل ندارند. لیکن نسبت به گروه HG بطور معنی داری افزایش نشان می دهند ( $P < 0.0001$ ). با وجود آنکه میزان نیتريت در گروه HG-5LA نسبت به گروه HG بطور معنی داری افزایش یافته است ( $P < 0.001$ ) لیکن در مقایسه با گروههای کنترل و HG-20LA نیز بطور معنی داری کمتر است ( $P < 0.0001$ ). مقدار نیتريت در گروههای HTF-LNAME و LNAME-HG بسیار ناچیز و غیر قابل تعیین (Undetectable) بود.

### بحث:

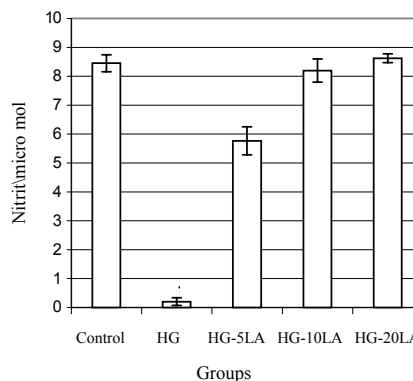
نتایج مطالعه حاضر همانند مطالعات Pamfer و Moley (۶،۷) نشان می دهد که کشت جنینهای دو سلولی موش در آزمایشگاه در حضور ۳۰ mM گلوکز موجب اختلال در تکوین آنها شده و نسبت به گروه کنترل بطور معنی داری از درصد تبدیل جنینهای دو سلولی به بلاستوسیست می کاهد و از طرف دیگر آپوتوزیس را در بلاستومرها شدیداً افزایش می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

ضریب آپوتوزیس در گروه کنترل ( $1/9 \pm 0/86$ ) بود. این رقم در گروه HG به  $13/7 \pm 2/9$  افزایش یافت که اختلاف معنی داری با گروه کنترل داشت ( $p < 0.0001$ ) (نمودار ۱).



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

در گروههایی که به ترتیب ۵ و ۱۰ و ۲۰ میلی مول L-arginine به محیط کشت اضافه شد اندکس آپوتوزیس به ترتیب  $6/9 \pm 0/6$  و  $4/4 \pm 0/72$  و  $4/6 \pm 0/53$  بود که از اختلاف معنی داری بین گروههای فوق با گروه کنترل و همچنین گروه HG دیده شد ( $P < 0.001$ ). همچنین در حالیکه اختلاف معنی داری بین گروه HG-5LA با گروههای HG-10LA و HG-20LA وجود داشت ( $p < 0.001$ ) این اختلاف بین گروههای HG-10LA و HG-20LA معنی دار نبود. نتایج اندازه گیری مقدار نیتريت در محیطهای کشت: نمودار ۲ نتایج اندازه گیری میزان نیتريت در محیطهای کشت داده شده در گروههای مختلف را نشان میدهد.



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

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 لانه‌گزینی (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 می‌شود می‌گردد (۶،۷،۲۹).

با توجه به مطالب یاد شده بنظر میرسد که کاهش تولید نیتریک اکساید توسط جنین‌های ۲ سلولی که در محیط حاوی گلوکز زیاد کشت داده می‌شوند 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 می‌اندازد. 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 می‌نماید. همچنین این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از مقادیر بالای L-arginine که پیش ساز نیتریک اکساید می‌باشد تا حدودی از اثرات زیانبار هیپر گلیسمی بر روی سلولهای جنینی جلوگیری می‌نماید. در توجیه این پدیده میتوان به نظریه Lindsay و همکارانش که در سال ۱۹۹۷ ارائه شد استناد نمود (۱۹). بر اساس این نظریه در شرایط هیپرگلیسمی ابتدا فعالیت آنزیمهای تولیدکننده نیتریک اکساید (NOS) بویژه انواع iNOS و eNOS افزایش می‌یابد که این امر در کوتاه مدت باعث افزایش برداشت L-arginine از محیط شده و تولید NO را افزایش می‌دهد. لیکن در صورتی که منبع L-arginine ثابت باشد این امر درازمدت موجب کاهش دسترسی سلولها به آن شده و تولید NO کاهش می‌یابد. در غیاب L-arginine آنزیمهای NOS بجای نیتریک اکساید، رادیکالهای آزاد اکسیژنه تولید می‌نمایند. در این مورد Pieper و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۶ نشان دادند که غلظت L-arginine در پلاسما خون موشهای صحرایی دیابتی کاهش می‌یابد و این کاهش با اضافه نمودن L-arginine به غذای حیوان مرتفع شده و به سطح طبیعی بر می‌گردد (۳۰).

جنین از طریق فعال نمودن cGMP انجام می‌دهد. مهار تولید NO نسبت cAMP به cGMP را در سلولها بهم زده و این امر متعاقباً بر ترجمه تنظیم کننده های میتوزی اثر می‌گذارد. همچنین مهار تولید NO از تولید نوکلئوتید حلقوی که برای تکامل طبیعی جنین بسیار مهم و تعیین کننده می‌باشند ممانعت بعمل می‌آورد (۲۴). از طرف دیگر مطالعات مختلف نشان داده اند که نیتریک اکساید در برخی از شرایط نقش مهمی در جلوگیری از آپوپتوزیس بازی می‌کند (۱۶،۲۴،۲۸). معمولاً اثرات آنتی آپوپتوتیک نیتریک اکساید با واسطه برخی از مکانیسم‌ها نظیر نیتروزیلاسیون (Nitrosylation) و غیر فعال نمودن برخی از کاسپازها نظیر کاسپازهای ۱ و ۳، افزایش بیان ژنهای Bcl-2 و Bcl-x1، مهار آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری، فعال نمودن سیگنالهای cGMP و در نتیجه فعال شدن پروتئین کیناز وابسته به آن و سرکوب فعالیت کاسپازی به اجرا در می‌آیند. از طرفی واکنش NO با رادیکالهای آزاد اکسیژن (یا گونه های فعال اکسیژن Reactive Oxygen Species (ROS) باعث خنثی شدن رادیکالهای فوق که نقش مهمی در ایجاد آپوپتوزیس دارند می‌گردد (۲۸). مطالعات مختلف نشان داده اند که شرایط هیپرگلیسمی از یک طرف موجب افزایش استرس های اکسیداتیو شده و بر تولید ROS می‌افزاید و از طرف دیگر تولید NO را که یکی از مهمترین گونه های نیتروزن فعال Reactive Nitrogen Species (RNS) می‌باشد کاهش می‌دهد (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 نیتروزن) 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 می‌نماید (۲۸).

Pierce و همکارانش در سال ۱۹۸۹ نشان دادند که رادیکالهای آزاد اکسیژن بویژه H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در آپوپتوزیس بلاستومرها نقش مهمی بعهده دارند (۲۹). این مطالعه نشان داده است که معمولاً در شرایط طبیعی ۱٪ از کل بلاستومرها (یا ۱۰٪ از سلولهای لایه ICM) در اثر آپوپتوزیس از بین می‌روند لیکن افزایش آپوپتوزیس در بلاستومرها بویژه در لایه ICM میتواند منجر به حذف تعداد

3. Wercheval M, Hertogh R. Experimental diabetes impairs rat embryo development during the preimplantation period, *Diabetologia* 1990; 33:187-191.
4. Pamfer P, Hertogh R, Vanderhyden I. Decreased inner cell mass proportion in blastocyst from diabetic rats. *Diabetes* 1990; 39:471-476.
5. Hertogh R, Wercheval M, Pamfer S. Experimental diabetes interference with the early development of rat embryo in the preimplantation period. *Diabetologia* 1989; 32:480 A.
6. Moley KH, Chi MMY, Knudson CM. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways: *Nat Med* 1998; 4(12):1491-1424.
7. Pamfer S, Vanderhyden I, McCracken JE. Increased cell 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. *Diabetes* 1991; 40: 457-461.
9. Gardner DK, Leese HJ. Concentration 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, Vanderheyden 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 Rec* 1995; 241: 255-267.
12. Peiro C, Lafunte N, Matesanz N. High glucose 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 embryotoxicity: Studies on pre-implantation mouse embryos cultured

همچنین Ozcelike و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که درمان با L-arginine موجب رفع برخی از عوارض دیابت و کاهش استرسهای اکسیداتیو می گردد (۲۹). Futterwir و Trachtman در سال ۱۹۹۷ و Praholaka در سال ۲۰۰۰ نشان 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 ۱۰-۲۰ mM به محیط کشت باعث بهبود روند کار شده و از عوارض گلوکز زیاد بر روی سلولها ممانعت بعمل می آورد (۳۲، ۳۳).

با توجه 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 (۲۹-۳۱) 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 ساز آن یعنی L-arginine باشد و هرگاه اسید آمینه به میزان کافی در اختیار سلولها قرار گیرد می توان تا حدودی از برخی از اثرات مخرب گلوکز بالا بر روی سلولهای جنینی در مرحله 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 مرحله 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, Mccracken JE. Disturbed development of the preimplantation embryos in the insulin-dependent diabetic BB/E rats. *Diabetes* 1996; 45:1463-1470.



- 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  $\alpha^1$ . *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.