Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 35, No. 6, Feb. – Mar. 2014, Pages: 80-87

Assesment of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression in Fallopian Tube at the Time of Term Pregnancy

Leyla Fath bayati, Marefat Ghaffari Novin*, Fatemeh Fadaei Fathabadi, Abbas Piryaei, Mohammad Hasan Heidari, Behnaz Sadegh Zadeh

Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 27 Feb, 2013 Accepted: 9 Mar, 2013

Abstract

Background and Objectives: Nitric Oxide (NO) is a signaling molecule produced by the NO Synthases (NOS) enzime and is known to incorporate in the regulation of many reproductive events that occur in the Fallopian tube (FT). The aim of this study was to investigate the production of endothelial NOS (eNOS) in the ciliated and secretory cells of luminal epithelium of FT and alteration of eNOS during parturition.

Materials and Methods: In this case-control study a total of 20 FTs samples obtained from two groups of women including: 10 FTs from the women at luteal phase of the menstrual cycle and 10 FTs of healthy pregnant women during parturition .Samples were fixed in 10% buffered formalin and paraffin sectioned for immunohistochemical evaluation.

Results: Localization of eNOS in the ciliated and secretory cells of luminal epithelium of FT was seen in both groups. However, we did not found anyexpression of eNOS in smooth muscle cells of all groups ($p>0.05$). No significant difference in expression of eNOS was seen between luteal phase and healthy pregnant groups.

Conclusion: Regarding the no significant differences in expression of eNOS in ciliated and secretory cells of luminal epithelium between pregnant women at term and women at luteal phase of menstrual cycle, the results suggested that activity and function of cilia in both groups are same.

Keywords: eNOS, Fallopian Tube, Pregnancy

*Corresponding author:
E-mail: mghaffarin@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

بررسی بیان ایزوفورم اندوتلیالی آنزیم سنتز کنندهٔ نیتریک اکساید در لولهٔ فالوپ در زمان بارداری ترم

لیلا فتح بیاتی: گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
معرفت غفاری نوین: گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، نویسندهٔ رابط:
E-mail: mghaffarin@yahoo.com
فاطمه فدایی فتح آبادی: گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
عباس پیریایی: گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
محمد حسن حیدری: گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
بهناز صادق زاده: گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت: ۹۱/۱۲/۹ **پذیرش:** ۹۱/۱۲/۱۹

چکیده

زمینه و اهداف: نیتریک اکساید مولکول پیام رسانی است که به وسیلهٔ عملکرد آنزیم سنتزکنندهٔ نیتریک اکساید (eNOS)، تولید می شود و در تنظیم تعداد زیادی از وقایع تولید مثلی که در لولهٔ فالوپ اتفاق می افتد مشارکت دارد. هدف از این مطالعه بررسی بیان eNOS، در سلول های مژک دار و ترشحی اپیتلیوم لومینال لولهٔ فالوپ و تغییرات آن در هنگام زایمان می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه موردی-شاهدی تعداد ۲۰ نمونه از بافت لوله های فالوپ دو گروه از زنان شامل: ۱۰ نمونه از زنان غیر حامله که در فاز لوتئال از چرخه قاعدگی بودند و ۱۰ نمونه از زنان حامله سالم ترم، در هنگام زایمان به دست آمد. سپس نمونه ها در فرمالین ۱۰٪ فیکس شده و مقاطع پارافینی تهیه شده، مورد ارزیابی ایمونوهیستوشیمی قرار گرفتند.

یافته ها: مکان‌یابی پروتئین eNOS در سلول‌های ترشحی و مژه دار اپیتلیوم لومینال در هر دو گروه مشاهده گردید. با این حال، بیان پروتئین eNOS در سلول های عضله صاف هیچکدام از گروه ها مشاهده نشد. از سوی دیگر، در رابطه با بیان پروتئین eNOS، در اپیتلیوم لومینال لوله فالوپ، بین زنان غیرحامله-ای که در فاز لوتئال بودند و زنان حامله سالم، اختلاف معناداری مشاهده نگردید ($P>0/05$).

نتیجه گیری: عدم وجود اختلاف معنادار، در سطح بیان پروتئین eNOS، در سلول های مژکدار و ترشحی اپیتلیوم لومینال زنان حامله ترم در مقایسه با زنان در فاز لوتئال، می تواند نشان دهنده یکسان بودن فعالیت و عملکرد مژک ها در این دو گروه باشد.

کلید واژه‌ها: eNOS، لوله فالوپ، حاملگی

مقدمه

نیتریک اکساید (NO)، رادیکال آزاد گازی است که از طریق تبدیل L- آرژینین به L- سیترولین به وسیله آنزیم سنتز کننده نیتریک اکساید (NOS)، که به شکل سه ایزوفورم وجود دارد، تولید می شود (۱). این ایزوفورم ها، شامل NOS نورونی (nNOS)، NOS القائی (iNOS) و NOS اندوتلیالی (eNOS) می باشند (۲). نیتریک اکساید (NO)، مولکول پیام رسان مهمّی است که در فرایند های فیزیولوژیکی متعدّدی، از جمله ترشّح هورمون، التهاب و عملکرد ایمنی و انتقال نورونی نقش دارد (۳).

علاوه بر عملکرد های فیزیولوژیکی ذکر شده، نیتریک اکساید (NO)، در تنظیم تولید مثل پستانداران، دخیل می باشد (۷-۴). NO، همچنین شمار زیادی از اعمال تولید مثلی جنس مؤنّث را در پستانداران کنترل کرده و به نظر می رسد، تنظیم کنندهٔ اصلی پاراکراین، در فرایندهای تولید مثلی، همانند ترشّح گنادوتروپین، تخمک گذاری، تحلیل جسم زرد، لانه گزینی، تکامل رویان و انقباض رحم باشد (۱). هر سه ایزوفورم NOS، به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر در واژن، گردن رحم، جفت و بافت های رحمی

Archive of SID

www.SID.ir

گونه های متعدّد پستانداران، یافت می شوند (۱۱-۸). کاهش باروری در موش های مؤنّث، که از نظر ایزوفورم های eNOS و iNOS معیوب می باشند، دیده شده است (۱۲). علاوه بر این، بررسی های اخیر، دلایل قانع کننده ای ارائه کرده اند، مبنی بر این که، نیتریک اکساید، می تواند تمام وقایع تولید مثلی که در لوله رحم اتّفاق می‌افتد را تحت تاثیر قرار دهد (۱۶-۱۳).

لوله‌های فالوپ پستانداران، ارگان‌های بسیار تخصّصی هستند که شرایط مطلوب را برای بلوغ گامت، لقاح و تکامل اوّلیه رویان، فراهم می‌کنند (۲). اگریکی از این اعمال مهم لولهٔ فالوپ تغییر کند، فرایند تولید مثل، دچار اختلال خواهد شد (۲). از سوی دیگر اعمال مهم NO، به فعالیت‌های ضروری لوله فالوپ ارتباط داده شده است (۱). انتقال رویان از میان لولهٔ فالوپ به وسیلهٔ انقباض عضلهٔ صاف و زنش مژک ها، کنترل می شود (۱۷). اگرچه اهمیت نسبی هر کدام از این، مکانیسم ها ناشناخته است، ولی شواهدی وجود دارد که نشان می دهد اعمال مژک ها نقش اصلی را در حرکت رویان ایفا می کند. زیرا، هنگامی که فعّالیّت عضله صاف لوله فالوپ، به وسیلهٔ ایزوپروترنول، آگونیست بتا آدرنرژیک، مهار می شود، در زمان کلّی انتقال رویان از طریق لوله فالوپ، اختلافی وجود ندارد، و این نشان دهندهٔ آن است که، مژک ها به تنهایی قادر به انتقال رویان از بین لوله می باشند (۱۷). در جنس مؤنّث، سلول های مژک دار اپیتلیوم لومینال، قسمتی از مجاری دستگاه تولید مثل را مفروش کرده اند و نشان داده شده است که، مژک ها، در انتقال گامت، تخم و رویان نقش اساسی دارند (۳).

مطالعات اخیر، نشان داده اند که، زنش مژک ها به وسیله مکانیسم وابسته به NO، تنظیم می شود (۱۸). علاوه بر این، نشان داده شده است که، سطوح پایین NO، با عملکرد معیوب مخاط، در مجاری فوقانی هوایی (۳)، مرتبط می باشد. همچنین، بیمارانی که دیس کینزی مژه ای اوّلیه دارند، دچار جهش، در ژن بیان کنندهٔ ایزوفورم اندوتلیالی آنزیم سنتز کنندهٔ نیتریک اکساید (eNOS)، هستند (۱۹). از لحاظ فراساختاری نشان داده شده است که eNOS در جسم قاعده ای میکروتوبول های مژک ها، لوکالیزه شده است و نیتریک اکساید (N0) تعداد زنش مژک ها را تحریک می کند. این یافته ها، نشان دهندهٔ نقش مهم نیتریک اکساید، در تنظیم عملکرد مژک ها می باشد. تنظیم تعداد زنش مژک ها (CBF)، به وسیله نیتریک اکساید، از طریق مسیر پیام رسانی NO-cGMP می باشد، که نشان دهندهٔ آن است که، نیتریک اکساید برای زنش مژک ها ضروری می باشد (۳). علاوه بر این یافته ها نشان می دهند که، تعداد زنش مژک ها وابسته به سطح هورمون ها می باشد و در شرایط آزمایشگاهی، فعّالیت آن ها به وسیلهٔ آنژیوتانسین II و پروژسترون تحت تأثیر قرار می گیرد (۲۰). بنابراین، با توجه به این که مطالعات نشان داده اند که تولید نیتریک اکساید در سلول های مژک دار اپیتلیوم تنفسی مجاری هوائی از طریق eNOS می باشد (۳)، در این مطالعه تصمیم گرفته ایم تا از طریق اندازه گیری میزان بیان ایزوفورم اندوتلیالی آنزیم سنتزکنندهٔ نیتریک اکساید (eNOS)، در لوله فالوپ، نقش eNOS را در عملکرد مژک ها نشان داده و ببینیم آیا تغییرات فیزیولوژیکی که در هنگام زایمان اتفاق می افتد، می تواند بر روی بیان eNOS درلولهٔ فالوپ، تأثیر گذار باشد.

مواد و روش‌ها

تمام تکنیک ها، روش ها و انتخاب بیماران، توسط کمیتهٔ اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به تصویب رسید.

جمع آوری نمونه و آماده سازی بافت ها

در این مطالعه، مکان یابی پروتئین آنزیم سنتز کنندهٔ نیتریک اکساید (eNOS) در لولهٔ های فالوپ جمع آوری شده از ۲ گروه از زنان، شامل ۱۰ نمونهٔ لوله فالوپ از زنان غیر حامله که در فاز لوتئال از چرخهٔ قاعدگی بودند (n=10) و ۱۰ نمونه از زنان حاملهٔ ترم (n=10) مورد ارزیابی ایمونوهیستوشیمیایی قرار گرفت.

گروه مورد

این گروه شامل ۱۰ نفر از زنان حاملهٔ سالم ترم بودند که به دلیل بستن لولهٔ های رحم برای جلوگیری از بارداری، زایمان آن ها از طریق سزارین انجام می‌شد. میانگین سنّی این افراد، ۳۵/۶ بود.

زنانی که دچار عفونت بودند، یا این که، از طریق القاء، زایمان آن ها انجام می شد از این مطالعه خارج شدند.

گروه کنترل

این گروه شامل ۱۰ نفر از زنان غیر حامله ای بود که در فاز لوتئال از چرخهٔ قاعدگی بودند و میانگین سنی آن ها ۳۸/۳ سال بود و به دلیل بیماری های خوش‌خیم رحمی که لوله های فالوپ را تحت تأثیر قرار نداده بود، تحت عمل هیسترکتومی قرار می گرفتند.

در این مطالعه، در حدود $1\ cm^3$ از بافت آمپول لوله های فالوپ، توسط جرّاح زنان بریده شد، و سپس ۳ الی ۴ بار با محلول فسفات بافرسالین (PBS)، شسته شد و بعد از آن در محلول ۱۰٪ فرمالین بافر شده قرار داده شد تا عمل ثبوت بر روی آن انجام شود و جهت انجام تکنیک ایمونوهیستوشیمی آماده گردد.

ایمونوهیستوشیمی

برای انجام تکنیک ایمونوهیستوشیمی، نمونه های جمع آوری شده از بافت لولهٔ فالوپ ابتدا در محلول فرمالین بافری ۱۰٪ تثبیت شدند. سپس بافت ها در پارافین قرار داده شدند و بعد از قالب گیری، برش های ۳ µm از آن ها تهیه شد که بر روی لام هایی که با پلی- ال- لایزین پوشانده شده بودند، قرار داده شدند. سپس پروتکل ایمونوهیستوشیمی برای مشاهده شدت و توزیع رنگ آمیزی علیه eNOS انسانی استفاده گردید. آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی علیه eNOS انسانی به عنوان آنتی بادی اولیه استفاده شد (شرکت ABcam, UK). سپس، برش هایی که از بافت های آغشته به پارافین تهیه شده بود، در محلول زایلل، پارافین زدایی شده و با استفاده از سری های الکل نزولی آب دهی شدند. در مرحله بازیافت آنتی ژن هم، لام ها در محلول بافر ۱۰mmol/L اسید سیتریک با pH=6.0 قرار داده شده و سپس در داخل دستگاه مایکروویو، برای مدت زمان حدود ۱۴ دقیقه قرار گرفتند. سپس اسلاید ها در دمای اتاق قرار داده شدند تا سرد شوند و بعد از آن ۳ بار با محلول PBS شسته شدند و در ادامه با محلول متانول-

Archive of SID

www.SID.ir

پراکسیداز در حدود ۱۵ دقیقه، اینکوبه شدند، تا عمل پراکسیداز اندوژن خنثی شود. بعد از شستشوی مجدد، اسلاید ها با محلول بلاکر سرم بزی ۱/۵ درصد (شرکت داکو، دانمارک) پوشانده و برای ۳۰ دقیقه در داخل اتاقک مرطوب در دمای اتاق قرار داده شدند تا از اتصال غیر اختصاصی آنتی بادی جلوگیری شود. در مرحلهٔ بعد، لام های پوشیده شده با آنتی بادی اوّلیه علیه eNOS (۱:۱۰۰) در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد برای مدت یک ساعت قرار داده شدند. پس از چندین بار شستشوی اسلاید ها با محلول فسفات بافر سالین، آن ها را با آنتی بادی ثانویهٔ بز علیه خرگوش، که با HRP کونژوگه شده بود، به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد، اینکوبه کردیم. لازم به ذکر است، غلظت آنتی بادی ثانویّه ۱به ۱۰۰۰ بود. سپس سطح اسلایدها با محلول کاری ۳،۳- دی آمینوبنزیدین در پراکسیداز، برای مدّت ۱۵ دقیقه، پوشانده شد. درپایان هم، اسلایدها، با هماتوکسیلین رنگ آمیزی شدند. برای ارزیابی صحت کار، رنگ آمیزی کنترل مثبت و منفی انجام شد. در این مطالعه، از نمونهٔ جفت زنان حامله سالم، که زایمان ترم داشتند، به عنوان کنترل مثبت خارجی استفاده گردید (۲۱).

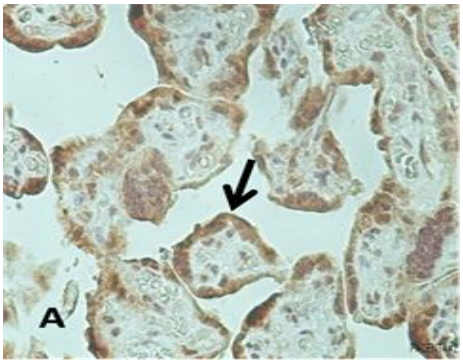
برای اسلاید های کنترل منفی، تمام مراحل انجام ایمونوهیستوشیمی طبق پروتکل فوق، انجام شد، به استثنای اینکه به جای آنتی بادی اوّلیه، سطح اسلاید ها را با محلول فسفات بافر سالین (PBS)، پوشانیدیم و سپس آن ها را اینکوبه کردیم. در این مطالعه رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی به وسیلهٔ دو نفر با استفاده از میکروسکوپ نوری در بزرگ نمائی های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند. آن ها از مقیاس نیمه کمّی زیر برای ارزیابی شدت رنگ گرفتگی اسلایدها استفاده کردند:

منفی ← ۰
ضعیف مثبت ← ۱
مثبت متوسط ← ۲ to ۴
مثبت ← ۵ to ۷
شدیداً مثبت ← ۸ to ۱۰

در این مطالعه، اختلاف در رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی بین دو گروه از طریق تست U Mann Whitney و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS۱۶ مورد بررسی قرار گرفت. در این مقاله مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار تلقی گردید.

یافته‌ها

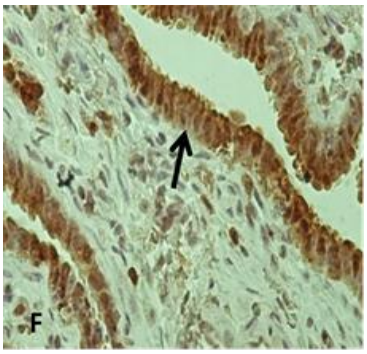
ایمونوهیستوشیمی آنزیم eNOS آنتی بادی اولیه، که برای آشکار شدن پروتئین eNOS مورد استفاده قرار گرفت از نوع پلی کلونال بود که قبل از این مطالعه در تحقیقات قبلی، استفاده شده و مشخص شده بود که به طور وسیع، با استفاده از پروتکل گفته شده در بالا، باعث آشکار شدن بیان eNOS می شود (۲۵). برای نمونهٔ کنترل مثبت در این مطالعه، که برای صحّت رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی eNOS، مورد استفاده قرار گرفت، نمونهٔ جفت انسان انتخاب شده بود که پروتئین eNOS در آن به میزان بالایی بیان شد (شکل ۱). نمونهٔ بافت گرفته شده از جفت انسان که در غیاب آنتی بادی اوّلیه با PBS، اینکوبه شده بود و به عنوان کنترل منفی به شمار می‌رفت، رنگ آمیزی منفی علیه eNOS، را نشان داد. رنگ‌آمیزی مثبت آنتی بادی eNOS، در تمام نمونه های بافتی تهیّه شده از لولهٔ فالوپ زنانی که در فاز لوتئال از چرخهٔ قاعدگی بودند و زنان حامله که زایمان ترم داشتند، مشاهده گردید (شکل۳ و۲). در این مطالعه، سلول های مژک دار و ترشحی اپیتلیوم لومینال در هر دو گروه، رنگ آمیزی مثبت از خود نشان دادند و آنتی بادی علیه eNOS، تمام سیتوپلاسم سلول‌های اپیتلیالی را نشان دار کرد. همچنین رنگ‌آمیزی مثبت علیه eNOS انسانی، در دیوارهٔ عروق در هر دو گروه دیده شد. در این مطالعه، در سلول-های عضلهٔ صاف لولهٔ فالوپ هر دو گروه از زنان، رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی علیه eNOS انسانی منفی بود. همچنین این مطالعه نشان داد که اختلاف معناداری در، میزان رنگ آمیزی و در نتیجه بیان eNOS، در سلول های مژک دار و ترشحی اپیتلیوم لومینال زنان در فاز لوتئال و زنان حامله با زایمان ترم، مشاهده نمی شود (P>۰/۰۵؛ نمودار ۱).



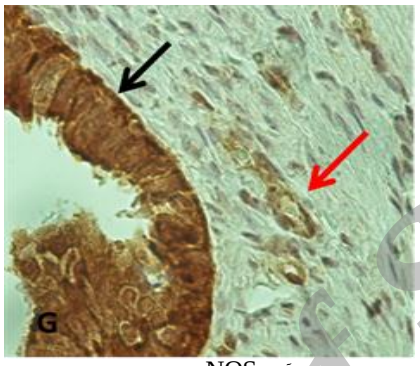
شکل ۱: تصویرA، مکان یابی ایمونوهیستوشیمی آنزیم eNOS در بافت گرفته شده از جفت انسانی سالم، حاصل از زایمان ترم، به عنوان کنترل مثبت خارجی که نشان دهندهٔ واکنش مثبت سلول ها علیه eNOS انسانی است (رنگ پذیری سیتوپلاسمی DAB و بزرگنمائی: ۴۰×).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲: تصویر حاصل از میکروسکوپ نوری بیانگر مکان یابی ایمونوهیستوشیمیایی مثبت آنزیم eNOS در بافت لولهٔ فالوپ زنان غیر حامله در فاز لوتئال از چرخه قاعدگی. فلش سیاه رنگ اشاره به اپیتلیوم لومینال دارد. تصویر با بزرگنمائی ۴۰× گرفته شده است.



شکل ۳: تصویر حاصل از میکروسکوپ نوری، نشان دهندهٔ مکان یابی ایمونوهیستوشیمیایی آنزیم eNOS در بافت لولهٔ فالوپ زنان حامله سالم با زایمان ترم. فلش سیاه رنگ اشاره به اپیتلیوم لومینال دارد. تصویر با بزرگنمائی ۴۰× گرفته شده است.

نمودار ۱: نمودار مقایسه ای شدت رنگ گرفتگی اپیتلیوم لومینال لوله فالوپ در گروه زنان حامله سالم و زنان غیر حامله در فاز لوتئال از چرخه قاعدگی ($p>0/05$)

بحث

مطالعات متعدّد، نشان داده انـد کـه نیتریـک اکسـاید (NO)، در اکثر وقایع تولید مثلی که به طور طبیعی در لولهٔ فـالوپ پسـتانداران، اتّفاق می افتد، دخالت دارد (۱۶ و۱۳). در پستانداران، سـلول هـای مژک دار، قسمتی از دستگاه تولید مثـل اپیتلیـوم مجـاری تنفسـی و بطن های سیستم عصبی مرکزی را مفروش کردهانـد. حضـور NO در مجاری تنفسی، با کشف NO، در هـوای بـازدمی و مکـان یـابی eNOS، در اپیتلیوم مجاری هوایی و ریه، نشان داده شده اسـت (۳). زنانی که دچار سـندرم مـژهٔ بـدون حرکـت، هسـتند، از مشـکلات نازایی رنج می برند (۲۲). افراد مبتلا بـه ایـن بیمـاری دارای مقـدار NO کمتری در هوای بازدمی هستند. حاملگی موفّق در ایـن گـروه از زنان، زمانی اتفاق می افتد که، مژک های آن ها دارای عملکـرد و تحرّک نسبی باشد. این امـر تأییـد کننـدهٔ نقـش مهـم مـژک هـا در عملکرد صحیح لولهٔ فالوپ می باشد (۲). عـلاوه بـراین، مطالعـات نشان می دهند که، تعداد زنش مژک ها (CBF)، در مجاری هـوایی از طریق مسیر پیام رسانی نیتریک اکسـاید–گوانـوزین مونوفسـفات حلقوی (NO-cGMP) تنظیم می‌شود. همچنین، آزاد شـدن NO در مخاط نای خرگـوش و تولیـد cGMP در اپیتلیـوم مجـاری هـوایی انسان، قبلاً گزارش شده است. همچنـین، مهـار آنـزیم سـنتز کننـده نیتریک اکساید (NOS)، تحریک تعداد زنش مژک ها را کـه توسـط محرک بتا–آدرنرژیک القـاء شـده اسـت تضـعیف مـی کنـد (۲۳).

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین، مطالعات قبلی نشان داده اند که نقص اولیه حرکت مژه با جهش در ژن eNOS همراه است (۳). بیشتر اعمال بیولوژیکی NO از طریق پروتئین گیرندهٔ آن به نام گوانیلات سیکلاز محلول (sGC)، که گوانوزین تری فسفات را به cGMP کاتالیز می کند، انجام می شود. سپس cGMP پروتئین کیناز G را فعال می کند که در تنظیم تعداد زنش مژک ها مشارکت دارد (۲۳). علاوه بر این، مطالعات اخیر نشان داده اند که، eNOS، sGC و PKG در سلول های اپیتلیوم مجاری هوایی موش صحرایی مکان یابی شده اند و این سلول ها، به صورت فعال، نیتریک اکساید تولید می کنند که تعداد زنش مژک ها را در مجاری هوایی تنظیم می کند (۲۳). علاوه برآن، مطالعات قبلی نشان می‌دهند که، ظاهر و تعداد زنش مژک ها (CBF)، در لولهٔ رحم در طول چرخهٔ منظم قاعدگی در پستانداران، تغییر می کند. در خرگوش ها میزان زنش مژک ها، در لولهٔ رحم، در روز های دوم و سوم جفت گیری تا ۲۰٪ افزایش می یابد، که با زمان حرکت تخم در لولهٔ رحم مرتبط می باشد (۲٤). با وجود این، در مطالعاتی که در لولهٔ فالوپ انسان انجام شده است توافق کلّی، در میزان تعداد زنش مژک ها، در طول چرخه قاعدگی وجود ندارد (۲۲). دلیل این امر، به واسطهٔ روشهای متفاوت برای ارزیابی تعداد زنش مژک ها و همچنین، پارامترهای مختلفی است که برای تعیین مراحل چرخهٔ قاعدگی در انسان، تعیین می شود (۲۲). همچنین، بیان ایزوفورم های NOS و نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات- دیافوراز (مارکر غیراختصاصی و هیستوشیمیایی برای تعیین فعالیت تمام ایزوفورم های NOS)، در طول چرخهٔ قاعدگی طبیعی در لوله رحم انسان، موش صحرایی و خوک تغییر می کند (۲۵). این نتایج امکان این فرضیه را قوت می بخشند که تغییرات در NO تولید شده، توسط ایزوفورم های مختلف NOS، در شرایط متغیّر فیزیولوژیکی بدن، ممکن است در تنظیم اعمال مهم لولهٔ فالوپ، از جمله زنش مژ ک ها نقش داشته باشد (۲۵). در حقیقت ثابت شده است که بیان و فعالیت eNOS تحت تأثیر میزان β۱۷- استرادیول و پروژسترون قرار دارد (۲٦). در اپیتلیوم لولهٔ فالوپ، گیرندهٔ β-استرادیول و نیز، گیرندهٔ پروژسترون، شناسایی شده اند و گزارش شده است که بیان این رسپتورها نیز در طول چرخهٔ منظّم قاعدگی تغییر می کند (۲۷). بنابراین، با توجه به نتایج تحقیقات قبلی، که نشان داده بودند تغییرات در بیان eNOS با تغییرات چرخهٔ قاعدگی و سطح هورمونها تغییر می کند، مطالعهٔ حاضر، به بررسی بیان ایزوفورم اندوتلیالی آنزیم سنتز کنندهٔ نیتریک اکساید (eNOS)، در لولهٔ فالوپ زنان حامله، هنگام زایمان و در زنان غیر حامله، در فاز لوتئال از چرخهٔ قاعدگی، پرداخت. نتایج این مطالعه نشان داد که، میزان بیان eNOS، در لولهٔ فالوپ زنان حامله در هنگام زایمان با میزان آن در زنان غیرحامله، در فاز لوتئال برابر است.

در حقیقت، این مطالعه، اولین تحقیق است که ثابت بودن میزان بیان eNOS را در سلول های مژک دار لولهٔ فالوپ انسان، در هنگام زایمان گزارش می کند. و نشان می دهد که میزان بیان این آنزیم با شروع زایمان تغییر نمی کند. از سوی دیگر، در یک مطالعه که توسط تامسون و همکاران، بر روی بافت رحم، جفت و غشاهای جنینی، در زنان باردار قبل و بعد از زایمان انجام شد، مشاهده شد که هیچ اختلافی در فعالیت و بیان آنزیم NOS در میومتریوم، جفت یا غشاهای جنینی قبل و بعد از زایمان ترم وجود ندارد (۲۸). آن ها پیشنهاد کردند که در انسان، کاهش در فعالیت و بیان آنزیم NOS در شروع زایمان ترم دخالتی ندارد، و این یافته بر خلاف بررسی های انجام شده بر روی حیوانات است که در آن ها، شروع زایمان با کاهش فعالیت و بیان NOS همراه است (۲۹ و۲۸).

بنابراین، نتایج حاصل از این مطالعه، نشان دهندهٔ آن است که شروع زایمان در انسان ها، با کاهش در فعالیت و بیان eNOS و در نتیجه، تغییر در فعالیت مژک ها همراه نمی باشد. همچنین با توجّه به یافته های قبلی، که نشان می‌دهند، میزان نیتریک اکساید بر روی تعداد زنش مژک ها مؤثّر است (۲۳)، می‌توان از نتایج این تحقیق چنین استنباط کرد که تعداد زنش مژک ها، در سلول های مژک دار لولهٔ فالوپ در زنان حاملهٔ ترم با میزان آن در زنان غیر حامله که در فاز لوتئال از چرخهٔ قاعدگی بودند، برابر است. بنابراین، با توجه به این که نتایج حاصل از یافته های قبلی نشان می دهند میزان بیان eNOS، در اپیتلیوم پوشانندهٔ مجاری هوایی با میزان فعالیت مژک ها مرتبط می باشد (۲۳)، می توان با بررسی بیان این آنزیم در لولهٔ فالوپ زنان حامله در ماه های مختلف بارداری و زنان غیر حامله در مراحل مختلف چرخهٔ قاعدگی، به میزان مقدار بیان طبیعی آن در سلول های اپیتلیالی لولهٔ فالوپ زنان حامله، در ماه های مختلف یک بارداری طبیعی پی برد. سپس، با معلوم شدن میزان بیان طبیعی eNOS، در سلول های مژک دار و ترشحی اپیتلیوم لولهٔ فالوپ زنان حامله، در طول ماه های مختلف حاملگی طبیعی خصوصاً در اوایل بارداری، می توان مقدار آن را با بیان eNOS، در لولهٔ فالوپ زنانی که مشکلات مرتبط با نازایی دارند، مقایسه کرد و بررسی کرد که آیا میزان بیان این آنزیم در این گروه ها متفاوت است. پس با توجه به این که احتمال دارد افزایش زنش غیرطبیعی مژک ها، در لولهٔ فالوپ، باعث حرکت سریع تخم و رویان و در نتیجه سقط و نازایی شده، و نیز کاهش تعداد زنش مژک ها، باعث کاهش فعالیت مژک های فیمبریا شده، که در نتیجه آن، فیمبریاهای لولهٔ فالوپ نمی توانند تخمک آزاد شده از تخمدان را با حرکت مژک ها به سوی خود بکشند و احتمال آن وجود دارد که تخمک به داخل شکم آزاد شود و در نهایت به واسطهٔ لقاح درداخل شکم منجر به حاملگی داخل شکمی شود، می‌توان با اندازه گیری مقدار بیان eNOS، به طور غیرمستقیم پی به فعالیت مژک ها در این گروه از افراد پی برد. زیرا ممکن است، بیان غیرطبیعی این آنزیم و در نتیجه تغییر در میزان تولید نیتریک اکساید بر فعالیت مژک ها تأثیر سوء گذاشته و باعث بروز این مشکلات شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به بیان eNOS در سلول های ترشحی و مژک دار اپیتلیوم لولهٔ فالوپ، احتمالاً این آنزیم در عملکرد مژک ها تأثیرگذار می باشد، و با توجه به این که میزان بیان این آنزیم در افراد حاملهٔ طبیعی و زنان غیر حامله سالم برابر است، تغییرات بیان

Archive of SID

www.SID.ir

آن، می‌تواند منجر به اختلالات در حرکت مژک ها به صورت افزایش یا کاهش تعداد حرکات شود، و در نتیجه احتمال ایجاد مشکلات مرتبط با بارداری را افزایش می دهد. در نتیجه، می توان با تنظیم بیان eNOS، در لولهٔ فالوپ، می‌توان، میزان نیتریک اکساید تولید شده توسط این ایزوفورم از NOS را کنترل کرد و روشی مطمئن برای درمان اختلالات ناشی از تغییرات بیان این آنزیم ابداع نمود.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است. نویسندگان بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکّر خود را از همکاران این مرکز ابراز می دارند.

References

1. Alderton WK, Cooper CE. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2006; **357**: 593–615.
2. Lapointe J, Roy M, St-Pierre I, Kimmins S, Gauvreau D, MacLaren LA. Hormonal and spatial regulation of nitric oxide synthases (NOS) (neuronal NOS, inducible NOS, and endothelial NOS) in the oviducts. *Endocrinology* 2006; **147**: 5600–5610.
3. Zhan X, Li D, Johns RA. Expression of endothelial nitric oxide synthase in ciliated epithelia of rats. *J Histochem Cytochem* 2003; **51**: 81–87.
4. Herrero MB, Gagnon C. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *J Androl* 2001; **22**: 349–356.
5. Dixit VD, Parvizi N. Nitric oxide and the control of reproduction. *Anim Reprod Sci* 2001; **65**: 1-16.
6. Kriegsfeld LJ, Demas GE, Huang PL, Burnett AL, Nelson RJ. Ejaculatory abnormalities in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase (eNOS). *Physiol Behav* 1999; **67**: 561-567.
7. Maul H, Longo M, Saade GR. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des* 2003; **9**: 359-380.
8. Zhang J, Massmann GA, Mirabile CP. Nonpregnant sheep uterine type I and type III nitric oxide synthase expression is differentially regulated by estrogen. *Biol Reprod* 1999; **60**: 1198-1203.
9. Thomson AJ, Telfer JF, Kohnen G, Young A, Cameron IT, Greer I. Nitric oxide synthase activity and localization do not change in uterus and placenta during human parturition. *Hum Reprod* 1997; **12**: 2546-2552.
10. Ledingham MA, Thomson AJ, Young A, Macara LM, Greer IA, Norman JE. Changes in the expression of nitric oxide synthase in the human uterine cervix during pregnancy and parturition Mol. *Hum Reprod* 2000; **6**: 1041-1048.
11. Chwalisz K, Garfield RE. Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Hum Reprod* 2000; **15**: 96-111.
12. Tranguch S, Huet-Hudson Y. Decreased viability of nitric oxide synthase double knockout mice. *Mol Reprod Dev* 2003; **65**: 175-179.
13. Ekerhovd E, Norstrom A. Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of fallopian tube contractility. *Gynecol Endocrinol* 2004; **19**: 239-246.
14. Wu TP, Huang BM, Tsai HC, Lui MC, Liu MY. Effects of nitric oxide on human spermatozoa activity, fertilization and mouse embryonic development. *Arch Androl* 2004; **50**: 173-179.
15. Jablonka-Shariff A, Basuray R, Olson LM. Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats. *J Soc Gynecol Investig* 1999; **95**: 101-106.
16. Manser RC, Leese HJ, Houghton FD. Effect of inhibiting nitric oxide production on mouse preimplantation embryo development and metabolism. *Biol Reprod* 2004; **71**: 528-533.
17. Shaw LV, Dey SK, Critchley HOD, Horne AW. Current knowledge of the etiology of human tubal ectopic pregnancy. *Human Reproduction* 2010; **16**: 432-444.
18. Rodriguez PC, O'Flaherty CM, Beconi MT, Beorlegui NB. Nitric oxideinduced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. *Anim Reprod Sci* 2005; **85**: 231-242.
19. Storm van's Gravesande K, Noone PG, Grasemann H, Silverman ES, Yandava CN, Palmer L, et al. Primary ciliary dyskinesia (PCD) is associated with sequence variants in the NOS 2 and NOS 3 genes. *Am J Resp Crit Care* 2001; **163**: A537.
20. Lyons RA, Djahanbakhch O, Saridogan E, Naftalin A, Mahmood T, Weekes A, et.al. Peritoneal fluid, endometriosis, and ciliary beat frequency in the human fallopian tube. *Lancet* 2002; **360**: 1221-1223.
21. Najafi T, GhaffariNovin M, Ghazi R, Khorram O. Altered endometrial expression of endothelial nitric oxide synthase in women with unexplained recurrent miscarriage and infertility. *Reproductive Biomedicine Online* 2012; **25**: 408-414.
22. Lyons RA, Saridogan E, Djahanbakhch O. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update* 2006; **12**: 363-372.
23. Li D, Shirakami G, Zhan X, Roger A. Johns. Regulation of Ciliary Beat Frequency by the Nitric Oxide–Cyclic Guanosine Monophosphate Signaling Pathway in Rat Airway Epithelial Cells. *Cell Mol Biol* 2000; **23**: 175-181.
24. Borell U, Nilson O and Westman A. Ciliary activity in the rabbit Fallopian tube during oestrus and after copukation. *Acta Obstet Gynecol* 1957; **36**: 22-28.
25. Shao R, Zhang S, Weijdegar B, Zou S, Egecioglu E, Norstro MA. Nitric oxide synthases and tubal ectopic pregnancies induced by Chlamydia infection: basic and clinical insights. *Mol Hum Reprod* 2000; **16**: 907-915.

Archive of SID

www.SID.ir

26. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update* 1998; **4**: 3-24.
27. Nishimura A, Sakuma K, Shimamoto C, Ito S, Nakano T, Daikoku E, et.al. Ciliary beat frequency controlled by oestradiol and progesterone during ovarian cycle in guinea-pig Fallopian tube. *Exp Physiol* 2010; **7**: 819-828.
28. Thomson AJ, Telfer JF, Kohnen G, Young A, Camerson IT, Gree IA, et.al. Nitric oxide synthase activity and localization do not change in uterus and placenta during human parturition. *Human Reproduction* 1997; **12**: 2546-2552.
29. Yallampalli C, Garfield RE, Byam-Shmith M. Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinology* 1993; **133**: 1899-1902.

Archive of SID

www.SID.ir