مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۵۷/هفته اول دی ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۷

بررسی اثرات L-Arginine و L-NAME در نیمه‌ی اول بارداری بر بافت بیضه‌ی جنین و فرزند موش سوری قبل و بعد از تولد

سیما صباغ[۱]، دکتر مهناز آذرنیا[۲]، دکتر مژگان مختاری[۳]، مهسا رستمی[۱]، لیلا دهقانی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: با توجه به اهمیت نقش نیتریک اکسید (NO یا Nitric oxide) در عملکرد انواع سیستم‌های فیزیولوژیک بدن از جمله سیستم تولید مثل و سطح بحرانی نیتریک اکسید در برقراری بارداری موفقیت‌آمیز، تغییرات بافت بیضه‌ی جنین و فرزندان موش سوری با تحریک و مهار سنتز این مولکول در مادر باردار بررسی شد.

روش‌ها: ۳۵ سر موش ماده‌ی بالغ پس از مشاهده‌ی پلاک، در پنج گروه هفت‌تایی به طور تصادفی تقسیم شدند. گروه اول گروه شاهد در نظر گرفته شد. سایر گروه‌ها به ترتیب ال- آرژنین (L-Arginin)، نیترو ال- آرژنین متیل استر (L-NAME یا L-nitro-arginine methyl ester)، نرمال سالین و مخلوط دو ماده‌ی L-Arginin و L-NAME را به طور هم‌زمان و به صورت تزریق داخل صفاقی، در سه روز مشخص نیمه‌ی اول حاملگی دریافت کردند. یک روز پیش از زمان زایمان و پیش از بلوغ، بیضه‌ی جنین‌ها و فرزندان به صورت لاپاراتومی خارج گردید. تغییرات ایجاد شده در نمونه‌ها پس از تثبیت، پاساژ بافتی و رنگ‌آمیزی عمومی هماتوکسیلین- ائوزین (H&E یا Hematoxylin and Eosin) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در بافت بیضه‌ی جنین و فرزند موش‌های دریافت کننده‌ی L-Arginin، به هم ریختگی نظم سلولی، کاهش قطر غلاف سفید و لوله‌های منی‌ساز مشاهده شد؛ اما تزریق L-NAME به موش باردار افزایش قطر غلاف سفید و کاهش در دره‌های سلولی به علاوه از هم گسیختگی نظم سلولی را در بافت بیضه‌ی جنین و فرزندان آن‌ها به همراه داشت.

نتیجه‌گیری: از مطالعه‌ی حاضر چنین بر می‌آید که مهار و تحریک سنتز نیتریک اکسید در بدن مادر باعث ایجاد ناهنجاری و بی‌نظمی در بافت بیضه‌ی فرزندان می‌شود که اختلال در عملکرد بیضه و تأثیر بر قدرت باروری را به همراه دارد.

واژگان کلیدی: نیتریک اکسید، L-Arginine، L-nitro-arginine methyl ester (L-NAME)، بیضه، تکوین جنین

ارجاع: صباغ سیما، آذرنیا مهناز، مختاری مژگان، رستمی مهسا، دهقانی لیلا. **بررسی اثرات L-Arginine و L-NAME در نیمه‌ی اول بارداری بر بافت بیضه‌ی جنین و فرزند موش سوری قبل و بعد از تولد.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۷): ۱۸۷۷-۱۸۷۱

مقدمه

نیتریک اکسید (NO یا Nitric oxide) مولکولی گازی شکل، متشکل از یک اتم اکسیژن و یک اتم نیتروژن است (۱)؛ به عنوان یکی از عوامل تعیین کننده‌ی بیولوژی و فیزیولوژی سیستم تولید مثل شناخته می‌شود (۲) و اعمال دفاعی، هموستاتیک و تکوینی را به طور مستقیم (نیتروزیله کردن پروتئین‌ها) یا به واسطه‌ی پیام‌رسانی داخل سلولی به عهده دارد.

سنتز این مولکول از پیش‌ماده‌ی ال- آرژنین (L-Arginine) و به واسطه‌ی فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز (NOS یا Nitric oxide synthase) صورت می‌گیرد (۴-۳).

این آنزیم، در سه ایزوفرم که محصول ژن‌های جداگانه‌ای هستند، یافت می‌شود (۵). ایزوفرم اول NOS مغز (bNOS یا Brain NOS) یا NOS نورونی (nNOS، Neural NOS یا NOS1) و ایزوفرم دوم NOS اندوتلیال (eNOS، Endothelial NOS یا NOS3) است که

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۲- استاد، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۳- استاد، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- مربی پژوهشی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب اصفهان، بیمارستان الزهرا (س)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: لیلا دهقانی
Email: leiladehghani@azh.mui.ac.ir

همچنین، به عنوان NOS ساختمانی (Constructional NOS یا cNOS) خوانده می‌شود. این دو، مسؤول آزادسازی مداوم NO هستند و هر دو برای فعالیت به کلسیم/کالمودولین وابسته‌اند (۴-۳). ایزوفرم سوم، شکل غیر وابسته به کلسیم قابل القا (Inducable NOS، iNOS یا NOS2) است که تنها در پاسخ به سیتوکاین‌های التهابی و لیپوپلی‌ساکاریدها بیان می‌شود (۷-۶).

ال- آرژنین تنها دهنده‌ی فیزیولوژیک نیتروژن برای واکنش کاتالیز شده توسط NOS است؛ از این رو، در دست بودن این ماده‌ی ضروری، تعیین کننده‌ی نرخ تولید NO می‌باشد (۸). همچنین، انتقال آرژنین به درون سلول منجر به تنظیم فعالیت NOS (۹) و مهار رقابتی جذب آن توسط ال- لیزین، ال- اورنیتین و نیترو ال- آرژنین متیل استر (L-nitro-arginine methyl ester یا L-NAME) یا Ng- مونومتیل ال- آرژنین مونواستات (L-NMMA یا NG-Monomethyl-L-arginine, monoacetate، آنالوگ آرژنین) منجر به کاهش سنتز NO می‌شود (۱۰).

NO به راحتی از غشای سلول عبور می‌کند و توانایی اتصال به فلزات (به ویژه آهن) را دارد (۱۲-۱۱). از مطالعات چنین بر می‌آید که برقراری بارداری موفقیت‌آمیز، به سطح بحرانی NO در محل لانه‌گزینی نیاز دارد و سطوح افزایش یافته‌ی آن ممکن است برای لانه‌گزینی زیان‌آور باشد. همچنین، شواهد غیر مستقیم نشان می‌دهد که این ماده بسته به غلظت آن، قادر به تحریک یا مهار تکوین جنین و لانه‌گزینی است (۱۴-۱۳) و ماده‌ای کلیدی در تنظیم رگزایی، تشکیل رویان و رشد جفت و جنین می‌باشد (۱۶-۱۵).

NO تولید شده توسط سلول‌های عصبی به عنوان یک انتقال دهنده‌ی عصبی عمل می‌کند و از آن جایی که نورون‌ها، عروق خونی و سلول‌های سیستم ایمنی، بخش جدایی ناپذیر از اندام‌های تناسلی می‌باشند و با در نظر گرفتن نقش مهم عملکردی NO در این سیستم‌ها، به نظر می‌رسد که این ماده، یک تنظیم کننده‌ی مهم در بیولوژی و فیزیولوژی سیستم تناسلی است (۱۲).

دستگاه تولید مثل در جنس مذکر در پستانداران، به طور کلی از بیضه‌ها (Testis)، مجاری تولید مثلی (Reproductive ducts)، غدد ضمیمه (Accessory glands) و اندام تناسلی مردانه (Penis) اشکیل شده است. بیضه توسط یک کپسول ضخیم از جنس بافت پیوندی به نام تونیکا آلبوژینهآ (Tunica alboginea) پوشیده شده است. این پوشش با نفوذ به درون بیضه، بخش‌های هرمی شکلی به نام لوبول‌های بیضه (Testicular lobules) را می‌سازد. در درون هر لوبول نیز ۴-۱ لوله‌ی اسپرم‌ساز (Seminiferous tubules) وجود دارد. بستر این لوله‌ها را بافت پیوندی حاوی عروق خونی و لنفاوی، اعصاب و سلول‌های لایدیگ (Leydig cells) پر می‌کند. لوله‌های منی‌ساز در واقع محل ساخت سلول‌های جنسی مرد (اسپرم) است و سلول‌های لایدیگ نیز محل اصلی تولید هورمون جنسی مردانه (تستوسترون) می‌باشد. وظیفه‌ی فیزیولوژیک بیضه نیز در واقع انجام همین دو عمل (تولید سلول و هورمون جنسی) است (۱۷).

NO، منجر به تنظیم نعوظ آلت تناسلی و ساختار بافت بیضه، تحرک اسپرم و لقاح، استروئیدوژنز و رفتار جنسی در سیستم تناسلی نر می‌گردد (۱۲). تنظیم جریان خون، نفوذ پذیری سلول و عملکرد انقباضی میوفیبروبلاست‌ها که به نوبه‌ی خود تنظیم کننده‌ی سنتز استروئید و انتقال آن می‌باشد، از تأثیرات NO بر بافت بیضه است (۱۹-۱۸). مطالعات فراوانی در مورد تأثیر این ماده بر بیضه صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

در مطالعه‌ای، حضور سطح پایین فعالیت آنزیم NOS ساختمانی در بیضه و سطوح بالای آن در دیگر اندام‌های تناسلی گزارش شده است (۲۰)؛ این یافته‌ها توسط ایمنوهیستوشیمی درجا در مطالعه‌ی دیگری تأیید شدند (۲۱). اهمیت نقش NO در بیضه با کشف حضور آنزیم مسؤول برای تولید ال- آرژنین (۲۲) و ایزوزیم هم- اکسیژناز آن مشخص شد. ایزوزیم هم- اکسیژناز این آنزیم به صورت اکسیداتیو، مولکول هم را برای تولید NOS می‌شکافد (۲۳). در راستای ارزیابی فعالیت آنزیم NOS، فعالیت cNOS در سلول‌های لایدیگ سرتولی و اندوتلیال بیضه‌ی انسان شناسایی شد (۲۴). سنتز NO و بیان آنزیم NOS غیروابسته به کلسیم قابل القا (iNOS) در سلول‌های سرتولی (۲۵) و سلول‌های لایدیگ کشت شده (۲۶) نشان داده شده است. این یافته‌ها، حضور مسیر NO-cGMP (Nitric oxide- cyclic guanosine monophosphate) در بیضه را نشان می‌دهد که ممکن است در تنظیم عملکردهای بیضه از جمله اسپرماتوژنز و استروئیدوژنز شرکت داشته باشد (۲۴)؛ اگر چه NO، می‌تواند اثرات زیستی خود را از طریق مسیرهای غیر وابسته به cGMP نیز القا کند (۲۷).

مشاهده‌ی بیان NO اندوتلیالی (eNOS) در سلول‌های سرتولی و لایدیگ در تمام مراحل اسپرماتوژنز، در اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها قبل از بلوغ و حضور آن در سلول‌های جنسی در حال آپوپتوز داخل اپیتلیالی، نشانگر نقش این آنزیم در اسپرماتوژنز و انحطاط سلول‌های جنسی است (۱۹-۱۸).

هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر NO بر رشد بافت بیضه‌ی جنین و فرزندان نر موش‌های تیمار شده در دوران بارداری با ال- آرژنین و L-NAME بود.

روش‌ها

در این تحقیق از موش‌های کوچک آزمایشگاهی سفید نژاد NMRI

(Naval Medical Research Institute) خریداری شده از انستیتو پاستور ایران استفاده گردید. موش‌ها به اتاق حیوانات دانشگاه خوارزمی با شرایط استاندارد (۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲ ± ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) در قفس‌های مخصوص منتقل شدند. این موش‌ها دارای محدوده‌ی وزنی ۲۹/۲۵–۲۸/۵۰ گرم و سن متوسط ۹–۸ هفته بودند که پس از جفت‌گیری و مشاهده‌ی پلاک واژینال (روز صفر بارداری)، ۳۵ سر موش به پنج گروه هفت‌تایی تقسیم شدند.

گروه اول، گروه شاهد بدون دریافت هیچ گونه دارو در نظر گرفته شد. گروه دوم ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ال- آرژنین، گروه سوم ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم L-NAME، گروه چهارم (Sham) مقدار ۲ میلی‌لیتر در کیلوگرم نرمال سالین و گروه پنجم ترکیبی از این دو ماده را به طور هم‌زمان دریافت کردند (۲۹–۲۸). این مواد در ۲ میلی‌لیتر نرمال سالین حل شدند. تزریق به صورت درون صفاقی در روزهای سوم، چهارم و پنجم بارداری انجام شد (۳۰).

نیمی از موش‌های مورد آزمایش، ۱۸ روز پس از بارداری با اتر بیهوش شدند. پس از تشریح، جنین‌ها خارج و توزین شدند. نیم دیگر آن‌ها نیز وضع حمل کردند. در نهایت، جنین‌های خارج شده و فرزندان نر ۷ و ۲۴ روزه، تشریح شدند و بیضه‌ی آن‌ها جدا گردید. در جنین موش نر ۱۸ روزه، مجاری تناسلی به طور کامل مشخص است. لوله‌های منی‌ساز هنوز توپر و به سیستم شبکه‌ی بیضه متصل است. در روز ۲۴ بعد از تولد، هنوز اسپرم وجود ندارد؛ اما در بعضی لوله‌ها تعداد بی‌شماری اسپرماتید جوان دیده می‌شود (۳۱). نمونه‌ها به فرمالین ۱۰ درصد منتقل شدند. مراحل پاساژ بافتی و قالب‌گیری پارافینی انجام شد و برش‌هایی با ضخامت ۵–۳ میکرون تهیه گردید. این نمونه‌ها با روش هماتوکسیلین- ائوزین (H&E یا Hematoxylin and Eosin) رنگ‌آمیزی شدند (۳۲).

جهت انجام مطالعات، از میکروسکوپ نوری (الیمپوس CH40، ژاپن) استفاده شد. اندازه‌گیری اقطار با میکرومتری که به صورت افقی و عمودی مدرج شده بود، انجام شد. سلول‌ها در هر ۱۰ HPF (High power fields) شمارش و میانگین در نظر گرفته شد.

آزمون‌های آماری One-way ANOVA، Mann-Whitney، Kruskal-Wallis و آزمون Post hoc با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گرفت. $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

یافته‌های کیفی

بررسی بافت‌شناسی ساختمان بیضه در مقایسه‌ی گروه‌های تحت تیمار و گروه شاهد نشان داد که استفاده از تیمار ال- آرژنین در جنین‌های موش‌های مادر تیمار شده که یک روز پیش از تولد تشریح شده بودند، منجر به کاهش قطر غلاف سفید و تعداد لوله‌های اسپرم‌ساز گردید. همچنین، در گروه فرزندان هفت روزه، علاوه بر کاهش قطر غلاف و تعداد لوله‌های اسپرم‌ساز، از هم گسیختگی نظم سلولی نیز مشاهده شد، اما در گروه فرزندان ۲۴ روزه، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نگردید. تغییر معنی‌داری در تعداد سلول‌ها دیده نشد.

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که استفاده از تیمار L-NAME در موش مادر باردار در جنین‌هایی که یک روز قبل از تولد تشریح شده بودند، منجر به از هم گسیختگی نظم سلولی، افزایش ضخامت غلاف و کاهش در تعداد سلول‌های ژرم و لایدیگ در مقایسه با گروه شاهد شد، اما تغییر معنی‌داری در تعداد لوله‌های اسپرم‌ساز در مقایسه با گروه شاهد دیده نشد. در گروه فرزندان ۷ روزه نیز افزایش قطر غلاف و کاهش تعداد سلول‌های ژرم و لایدیگ در مقاسه با گروه شاهد مشاهده شد. نتایج مشاهده شده در گروه فرزندان ۲۴ روزه نیز حاکی از افزایش قطر غلاف، کاهش تعداد سلول‌های ژرم و لایدیگ و همچنین، کاهش در تعداد سلول‌های سرتولی بود. سایر موارد از قبیل تعداد لوله‌های اسپرم‌ساز تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان ندادند.

در گروهی که ال- آرژنین و L-NAME را هم‌زمان دریافت کردند، نسبت به گروه شاهد تغییری دیده نشد.

یافته‌های کمی

نتایج مقایسه‌ی شدت تغییرات بافتی در گروه‌ها: شدت تغییرات بافتی در این آزمایش با آزمون‌های Kruskal-Wallis و Mann-Whitney بررسی و به صورت +، ++ و +++ نسبت به گروه شاهد (۰) در نظر گرفته شد. نتایج حاصل در مورد گروه ال- آرژنین نشان داد که کاهش تعداد لوله‌های منی‌ساز و کاهش قطر غلاف سفید در زمان جنینی و از هم گسیختگی نظم سلولی ۷ روز پس از تولد در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بود (جدول ۱).

در گروه L-NAME، از هم گسیختگی نظم سلولی در زمان جنینی، افزایش ضخامت غلاف و کاهش تعداد سلول‌های ژرم ۷ روز پس از تولد اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. همچنین، در این گروه، افزایش قطر غلاف و کاهش در تعداد سلول‌های ژرم، لایدیگ و سرتولی ۲۴ روز پس از تولد دارای تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد بود (جدول ۲).

بحث

NO یک رادیکال آزاد است، مولکول گازی با نیمه‌ی

جدول ۱. میانگین تغییرات بافتی گروه تیمار شده با ال- آرژنین در مقایسه با گروه شاهد

تغییرات بافتی	گروه تیمار شده با ال- آرژنین			گروه شاهد			مقدار P		
	e	۷	۲۴	e	۷	۲۴	e	۷	۲۴
به هم ریختگی نظم سلولی	۰	۱-	۰	۰	۰	۰	> ۰/۹۹۹	۰/۰۴۰	> ۰/۹۹۹
تعداد لوله‌های اسپرم‌ساز	۲-	۱-	۰	۰	۰	۰	۰/۰۳۰	۰/۱۶۰	> ۰/۹۹۹
قطر غلاف سفید	۱-	۱-	۰	۰	۰	۰	۰/۰۳۰	۰/۰۰۴	> ۰/۹۹۹
تعداد سلول‌های ژرم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	> ۰/۹۹۹	> ۰/۹۹۹	> ۰/۹۹۹
تعداد سلول‌های لایدیگ	۰	۰	۰	۰	۰	۰	> ۰/۹۹۹	> ۰/۹۹۹	> ۰/۹۹۹
تعداد سلول‌های سرتولی	۰	۰	۰	۰	۰	۰	> ۰/۹۹۹	> ۰/۹۹۹	> ۰/۹۹۹

e: گروه جنین‌هایی که یک روز پیش از تولد از رحم خارج و تشریح شدند.

۷: گروه فرزندانی که در ۷ روزگی تشریح شدند؛ ۲۴: گروه فرزندانی که در ۲۴ روزگی تشریح شدند؛ شدت تغییرات بافتی در این آزمایش با آزمون‌های Kruskal-Wallis و Mann-Whitney بررسی و به صورت +، ++ و +++ نسبت به شاهد (۰) در نظر گرفته شد.

جدول ۲. میانگین تغییرات بافتی گروه تیمار شده با L-NAME (L-nitro-arginine methyl ester) در مقایسه با گروه شاهد

تغییرات بافتی	گروه تیمار شده با L-NAME			گروه شاهد			مقدار P		
	e	۷	۲۴	e	۷	۲۴	e	۷	۲۴
به هم ریختگی نظم سلولی	۱-	۱-	۰	۰	۰	۰	۰/۰۲۰	۰/۰۴۰	> ۰/۹۹۹
تعداد لوله‌های اسپرم‌ساز	۰	۰	۰	۰	۰	۰	> ۰/۹۹۹	> ۰/۹۹۹	> ۰/۹۹۹
قطر غلاف سفید	+	+	+	۰	۰	۰	۰/۰۶۰	۰/۰۴۰	۰/۰۱۰
تعداد سلول‌های ژرم	۱-	۲/۳-	۲-	۰	۰	۰	۰/۰۶۰	۰/۰۰۳	۰/۰۱۰
تعداد سلول‌های لایدیگ	۲-	۱-	۱/۶-	۰	۰	۰	/۰۶۰	۰/۰۷۰	۰/۰۱۰
تعداد سلول‌های سرتولی	۰	۰	۱-	۰	۰	۰	> ۰/۹۹۹	> ۰/۹۹۹	۰/۰۱۰

L-NAME: L-nitro-arginine methyl ester

e: گروه جنین‌هایی که یک روز پیش از تولد از رحم خارج و تشریح شدند.

۷: گروه فرزندانی که در ۷ روزگی تشریح شدند؛ ۲۴: گروه فرزندانی که در ۲۴ روزگی تشریح شدند؛ شدت تغییرات بافتی در این آزمایش با آزمون‌های Kruskal-Wallis و Mann-Whitney بررسی و به صورت +، ++ و +++ نسبت به شاهد (۰) در نظر گرفته شد.

عمر چند ثانیه که به عنوان یک پیام‌رسان داخل سلولی و خارج سلولی در بافت‌های مختلف عمل می‌کند (۳۳). NO به عنوان یک محصول اصلی ترشحی شناخته شده در سلول‌های پستانداران (۱۱)، دارای نقشی عمده در عملکرد انواع سیستم‌های فیزیولوژیک است (۱۶). آن چه NO را از دیگر مولکول‌های بدن متمایز می‌کند، ایفای نقش‌های متفاوت در بدن (۳۵-۳۴) از جمله مهم‌ترین انتقال دهنده‌ی عصبی درگیر در کنترل غیرآدرنرژیک و غیرکولینرژیک در دستگاه تناسلی است (۳۶). همچنین، این مولکول می‌تواند به دو صورت میانجی فیزیولوژیک و عامل سیتوتوکسیک در سلول عمل نماید و تولید بیش از حد آن تحت بعضی از شرایط منجر به آسیب بافتی و تغییرات التهابی می‌شود (۳۷).

همچنین در سال‌های گذشته، NO خود را به عنوان یک مولکول چند ظرفیتی که نقشی تعیین کننده در تنظیم عملکردهای چندگانه در سیستم تولید مثلی زنان و مردان ایفا می‌کند، ثابت کرده است (۱۶). یافته‌های Pathak و Lal نشان می‌دهد که ایزوفرم‌های NOS به طور متنوع در انواع مختلف سلول‌ها در بیضه ی گربه‌ماهی که از نظر باروری فعال است، بیان شده است. این تحقیقات، همچنین نشان می‌دهد که NO تولید تستوسترون را در بیضه را مهار می‌کند (۳۸).

Liman و همکاران نشان دادند که NO در گربه‌ی خانگی ممکن است نقش مهمی در تراکم کروماتین، شکل دادن به اسپرماتید و انتشار نهایی اسپرم از اپی‌تلیوم اسپرماتوژنیک بازی کند. علاوه بر این، NO نیز ممکن است در اسپرمیوژنز، استروئیدوژنز و آپوپتوز نقش داشته باشد (۳۹).

Banerjee و همکاران دریافتند که در سن بالا، کاهش میزان هورمون استروژن علت افزایش غلظت NO است که به نوبه‌ی خود باعث کاهش تولید استروئید در بیضه و آپوپتوز سلول‌های جنسی در موش می‌شود (۴۰).

این حقیقت که NO در فیزیولوژی، زیست‌شناسی و پاتوفیزیولوژی سیستم تولید مثل درگیر است، ممکن است مفاهیم بالینی مهمی در تکوین راهبردهای درمانی برای جلوگیری از

اختلالات تولید مثل مرتبط با NO داشته باشد (۱۶)، اما این که «آیا افزایش یا مهار سنتز NO در شرایط مختلف مفید است؟»، بحث‌انگیز باقی می‌ماند. شرایطی وجود دارد که در آن، افزایش و یا مهار انتخابی تشکیل NO ممکن است مطلوب باشد (۴۱). در این مطالعه، ال- آرژنین پیش‌ساز NO برای افزایش سنتز این ماده و L-NAME، مهار کننده‌ی رقابتی NO سنتاز، برای کاهش تشکیل آن، به منظور بررسی تغییرات بافتی در بیضه‌ی جنین و فرزند موش سوری در دوران بارداری مادر استفاده شد.

نتایج به دست آمده از مقایسه‌ی شدت تغییرات بافتی در این تحقیق، نشان می‌دهد که NO مازاد تولید شده در بدن مادر، بر روی بافت بیضه‌ی جنین و فرزند ۷ روزه تأثیر مضر دارد که در صورت ماندگاری این تغییرات، می‌تواند موجب به هم ریختگی نظم سلولی و ساختار کلی بافت بیضه شود. اما بخش اعظم این علایم، ۲۴ روز پس از تولد محسوس نبودند. ممکن است علت از بین رفتن علایم بعد از گذشت ۲۴ روز، حساس بودن NO و یا کوتاه بودن نیمه‌ی عمر این مولکول باشد (۴۲).

همچنین، نتایج به دست آمده از این بررسی مشخص می‌کند که مهار سنتز NO در مادر باردار اثرات به مراتب شدیدتر، اساسی‌تر و پایدارتری نسبت به سنتز مضاعف این ماده ایجاد می‌کند، که این اثرات باعث کاهش تعداد رده‌های سلولی به خصوص سلول‌های جنسی و همچنین، به هم ریختگی نظم سلولی و در نتیجه تخریب نظم بافت بیضه شده است؛ به طوری که به نظر می‌رسد سلول‌ها توانایی تولید اسپرم را از دست داده‌اند که تأکیدی بر نتایج مطالعات گذشته مبنی بر لزوم حضور NO در تکوین طبیعی جنین است و نشان می‌دهد که کمبود این ماده در خون مادر، عواقب جبران ناپذیری بر بافت بیضه‌ی فرزند به همراه خواهد داشت. علاوه بر آن، در گروه‌هایی که هر دو ماده‌ی ال- آرژنین و L-NAME را به طور هم‌زمان دریافت کرده بودند، نتایج به دست آمده مشابه گروه دریافت کننده‌ی نرمال سالین و گروه شاهد بود؛ بدین معنا که اثرات این دو ماده با به کار بردن توأم آن‌ها خنثی می‌شود که نشان‌گر دخالت مستقیم سنتز یا عدم سنتز NO در بروز اثرات تخریبی مشاهده شده می‌باشد.

در کل، ایجاد هر گونه ناهنجاری در بافت بیضه منجر به ایجاد اختلال در عملکرد سیستم تناسلی، کاهش باروری و در نهایت عقیمی می‌شود. در مجموع، این تحقیق نشانگر سطح بحرانی و اهمیت NO در تکوین جنین در حال رشد و سلامت تولید مثل نسل بعدی است. اگر چه مهار این ماده در بدن مادر باردار اثرات مخربی در پی دارد، اما در زمان حاملگی مکمل‌های حاوی NO نیز توصیه نمی‌شود.

با این وجود، به علت اهمیت بسیار زیاد NO و برای مشخص نمودن مکانیسم‌های عملکرد و تأثیرگذاری این مولکول به ویژه در انتقال از مادر به جنین در حال رشد ضروری می‌باشد. همچنین، انجام بررسی‌های تکمیلی از جمله تکرار آزمایش با مدت زمان طولانی‌تر تزریق به منظور بررسی ماندگاری اثرات، ادامه‌ی مطالعه برای ارزیابی اثرات پس از بلوغ، بررسی تغییرات سطح هورمون‌های جنسی در خون فرزندان و به کارگیری دوزهای متفاوت در روزهای متفاوت مفید به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل یک پروژه تحقیقاتی با هزینه‌ی شخصی نویسنده‌ی اول می‌باشد

References

1. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Basic and clinical pharmacology. 12th ed. New York, NY: McGraw-Hill Medical; 2012. p.331.
2. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. FASEB J 1993; 7(2): 349-60.
3. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. Annu Rev Physiol 1995; 57: 707-36.
4. Snyder SH. Nitric oxide. No endothelial NO. Nature 1995; 377(6546): 196-7.
5. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem 1994; 269(19): 13725-8.
6. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. J Leukoc Biol 1993; 54(2): 171-8.
7. Nussler AK, Billiar TR, Liu ZZ, Morris SM. Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production. J Biol Chem 1994; 269(2): 1257-61.
8. Morris SM, Jr. Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. Annu Rev Nutr 1992; 12: 81-101.
9. Sax HC, Hasselgren PO, Talamini MA, Edwards LL, Fischer JE. Amino acid uptake in isolated, perfused liver: effect of trauma and sepsis. J Surg Res 1988; 45(1): 50-5.
10. Bogle RG, Baydoun AR, Pearson JD, Moncada S, Mann GE. L-arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide. Biochem J 1992; 284 (Pt 1): 15-8.
11. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J 1992; 6(12): 3051-64.
12. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. Hum Reprod Update 1998; 4(1): 3-24.

13. Ariel I, Hochberg A, Shochina M. Endothelial nitric oxide synthase immunoreactivity in early gestation and in trophoblastic disease. J Clin Pathol 1998; 51(6): 427-31.
14. Fabregues F, Balasch J, Manau D, Creus M, Jimenez W, Carmona F, et al. Circulating levels of nitric oxide in successful and unsuccessful implantation after in vitro fertilization and embryo transfer. Relationship to estradiol and progesterone. Acta Obstet Gynecol Scand 2000; 79(7): 564-9.
15. Reynolds LP, Redmer DA. Angiogenesis in the placenta. Biol Reprod 2001; 64(4): 1033-40.
16. Hefler LA, Reyes CA, O'Brien WE, Gregg AR. Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. Biol Reprod 2001; 64(2): 666-73.
17. Azarnia M, Tahamtani Y, Rajabi M. An introduction to animal reproduction. Tehran, Iran: Jahad Daneshgahi Publications; 2007. p. 421-2.[In Persian].
18. Adams ML, Meyer ER, Sewing BN, Cicero TJ. Effects of nitric oxide-related agents on rat testicular function. J Pharmacol Exp Ther 1994; 269(1): 230-7.
19. Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B, Holstein AF. Nitric oxide synthase (NOS-I) in Leydig cells of the human testis. Arch Histol Cytol 1995; 58(1): 17-30.
20. Ehren I, Adolfsson J, Wiklund NP. Nitric oxide synthase activity in the human urogenital tract. Urol Res 1994; 22(5): 287-90.
21. Burnett AL, Tillman SL, Chang TS, Epstein JI, Lowenstein CJ, Bredt DS, et al. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. J Urol 1993; 150(1): 73-6.
22. Yu Y, Terada K, Nagasaki A, Takiguchi M, Mori M. Preparation of recombinant argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase: expression of the enzymes in rat tissues. J Biochem 1995; 117(5): 952-7.
23. Ewing JF, Maines MD. Distribution of constitutive (HO-2) and heat-inducible (HO-1) heme oxygenase isozymes in rat testes: HO-2 displays stage-specific expression in germ cells. Endocrinology 1995; 136(5): 2294-302.
24. Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. Biol Reprod 1996; 55(5): 935-41.
25. Stephan JP, Guillemois C, Jegou B, Bauche F. Nitric oxide production by Sertoli cells in response to cytokines and lipopolysaccharide. Biochem Biophys Res Commun 1995; 213(1): 218-24.
26. Tatsumi N, Fujisawa M, Kanzaki M, Okuda Y, Okada H, Arakawa S, et al. Nitric oxide production by cultured rat Leydig cells. Endocrinology 1997; 138(3): 994-8.
27. Lancaster JR, Jr., Langrehr JM, Bergonia HA, Murase N, Simmons RL, Hoffman RA. EPR detection of heme and nonheme iron-containing protein nitrosylation by nitric oxide during rejection of rat heart allograft. J Biol Chem 1992; 267(16): 10994-8.
28. Dashti N, Ansari M, Shabani M, Vardasti S, Mirsalehian A, Noori Mughehi MH, et al. The effect of nitric oxide donor in diabetic wound healing. Iran J Public Health 2003; 32(4): 59-63.
29. Noori Mugahi SMH. Effect of nitric oxide (NO) system on cardiovascular development of rat embryo. Proceedings of the 10th International Congress of Toxicology; 2004 Jul 11-15; Tampere, Finland.
30. Hogg N, Struck A, Goss SPA, Santanam N, Joseph J, Parthasamthy S, et al. Inhibition of macrophage-dependent low density lipoprotein oxidation by nitric oxide donors. J Lipid Res 1995; 36; 1756-62.
31. Parivar K, Mohseni Koochesfahani H. Atlas of embryology and experimental embryology. Tehran, Iran: Jahad Daneshgahi Publication; 1994. [In Persian].
32. Mohseni Koochesfahani H, Parivar K. Methods in histology, embryology and animal biology. Tehran, Iran: Alhossein Publications; 2000. [In Persian].
33. Senayli A, Ekici F, Yilmaz R, Erdogan H. Measurement of hydroxyproline and nitric oxide, and comparison of sac fluid acidity in different inguinal pathologies. J Pediatr Urol 2013; 9(6 Pt B): 1122-5.
34. Murad F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. Adv Pharmacol 1994; 26: 19-33.
35. Khan FA, Scholtz EL, Chenier TS. The nitric oxide system in equine reproduction: Current status and future directions. J Equine Vet Sci 2015; 35(6): 481-7.
36. Heuer O, Uckert S, Machtens SA, Stief CG, Tsikas D, Frolich JC, et al. Effects of various nitric oxide donating agents on the contractility and cyclic nucleotide turnover of human seminal vesicles in vitro. Urology 2002; 59(6): 958-62.
37. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991; 43(2): 109-42.
38. Nee Pathak ND, Lal B. Seasonality in expression and distribution of nitric oxide synthase isoforms in the testis of the catfish, Clarias batrachus: role of nitric oxide in testosterone production. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2010; 151(3): 286-93.
39. Liman N, Alan E, Beyaz F, Gurbulak K. Endothelial and inducible nitric oxide synthase (NOS) immunoreactivity and NOS-associated NADPH-diaphorase histochemistry in the domestic cat (Felis catus) testis. Theriogenology 2013; 80(9): 1017-32.
40. Banerjee A, Anjum S, Verma R, Krishna A. Alteration in expression of estrogen receptor isoforms alpha and beta, and aromatase in the testis and its relation with changes in nitric oxide during aging in mice. Steroids 2012; 77(6): 609-20.
41. Ozokutan BH, Kucukaydin M, Muhtaroglu S, Tekin Y. The role of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. J Pediatr Surg 2000; 35(1): 101-3.
42. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, et al. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(16): 7674-7.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 33, No. 357, 1st Week, January 2016

Received: 25.09.2015

Accepted: 28.11.2015

Effects of L-Arginine and L-Nitro-Arginine Methyl Ester (L-NAME) in the First Half of Pregnancy on Embryos and Offspring Testis Tissue Before and After Birth

Sima Sabbagh MSc[1], Mahnaz Azarnia PhD[2], Mojgan Mokhtari PhD[3], Mahsa Rostami MSc[1], Leila Dehghani MSc[4]

Original Article

Abstract

Background: Considering nitric oxide (NO) as one of the important molecular regulators in genital organs, and according to the critical level of it in establishing a successful pregnancy, we assessed the changes in testis tissue of embryo and offspring via treating pregnant mice.

Methods: 35 adult female mice, after observing the vaginal plug, were randomly divided into five groups of seven. The first one was the control group. Remaining groups, respectively, received L-Arginin, L-nitro-arginine methyl ester (L-NAME), normal saline, and a mixture of L-Arginin and L–NAME, three days in first half of pregnancy. One day before the delivery, and before maturation, embryos' and offspring's testes were removed through laparotomy. Pathological and histological changes of samples were assessed using histotechnique method and general Hematoxylin and Eosin (H&E) staining.

Findings: In L-NAME group, in addition to disorganization in tissue order, tunica albuginea diameter was considerably increased whereas the number of germ cells was significantly decreased in embryos and offspring. L. Arginine treatment in pregnant mice led to reduce the number of seminiferous tubules and decrease tunica albuginea diameter and dissemination.

Conclusion: Stimulating or inhibiting the synthesis of nitric oxide in pregnant mice can interfere with the organ normal function and influence fertility parameters via causing abnormally and malformations in testis tissue, specially in the next generation.

Keywords: Nitric oxide, L-Arginine, L-NAME, Testis, Embryonic development

Citation: Sabbagh S, Azarnia M, Mokhtari M, Rostami M, Dehghani L. **Effects of L-Arginine and L-Nitro-Arginine Methyl Ester (L-NAME) in the First Half of Pregnancy on Embryos and Offspring Testis Tissue Before and After Birth.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(357): 1871-7

1- Department of Animal Biology, School of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Animal Biology, School of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Research Instructor, Isfahan Neurosciences Research Center, Alzahra Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Leila Dehghani MSc, Email: leiladehghani@azh.mui.ac.ir