مقـــاله تحقیقی

بررسی استریولوژیک تجویز L-NAME بر تعداد و اندازه متوسط قطر پالپ‌های سفید طحال در موش صحرایی باردار

سید محمد حسین نوری موگهی[1]، مریم عزیزی [2*]، عطارد السادات مصطفوی نیا[2]، پریوش داودی[2]، ماکان صدر[3]، زهرا نادیا شریفی[4]

[1] استاد گروه بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، استاد علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی واحد تهران، تهران، ایران.

[2] استادیار گروه علوم تشریحی و علوم اعصاب‌شناختی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی واحد تهران، تهران، ایران.

[3] استادیار علوم تشریحی، مرکز تحقیقات ویروس شناسی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماریهای ریوی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

[4] دانشیار گروه علوم تشریحی و علوم اعصاب‌شناختی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی واحد تهران، تهران، ایران.

* نشانی نویسنده مسئول:

گروه علوم تشریحی و علوم اعصاب‌شناختی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی واحد تهران، تهران، ایران.

نشانی الکترونیک:
azizi.maryam22@gmail.com

چکیده

زمینه: نیتریک اکساید (Nitric oxide, NO) در کنترل بسیاری از عملکردهای فیزیولوژیک بدن شرکت دارد و نقش آن در بسیاری از فرایندهای بیولوژیک در دست بررسی است. نیتریک اکساید مولکول کوچک چربی‌دوستی است که توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز (Synthase, NOS) از L-Argi-nine،O2 و (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADHP) سنتز می‌شود. این مولکول دارای فعالیت‌های گسترده بیولوژیکی در سیستم‌های مختلف می‌باشد و در سیستم ایمنی هم نقش محافظتی و هم نقش سیتوتوکسیک دارد. مطالعه حاضر به منظور بررسی کمی پالپ‌های سفید در طحال موش صحرایی باردار پس از تجویز(L-NAME ,L-NG-Nitroarginine Methyl Ester) به عنوان مهارکننده سنتز نیتریک اکساید انجام گرفته است.

روش کار: ۲۴ سر موش صحرایی ماده از جنس Sprague Dawley با وزن متوسط ۲۵۰-۲۰۰ گرم و سن متوسط ۸ هفته، پس از جفت‌گیری و مشاهده پلاک واژینال که به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته می‌شد به سه گروه ۸تایی تقسیم شدند. به غیر از گروه کنترل، بقیه گروه‌ها به ترتیب ۲ ml/kg نرمال سالین، ۲۰ mg/kg ماده L-NAME به صورت داخل صفاقی، در روزهای سوم، چهارم و پنجم حاملگی دریافت کردند. در روز هیجدهم بارداری، طحال موش‌ها خارج و در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شده و پس از پاساژ بافتی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین (H&E)، تغییرات ایجاد شده با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. سپس مطالعات استریولوژیک از نظر تعداد و اندازه متوسط قطر پالپ‌های سفید به‌وسیله نرم افزار Image Tools III انجام شد.

یافته‌ها: در بررسی‌های کمی انجام شده بین گروه‌های مختلف، تعداد پالپ‌های طحال موش‌های گروه دریافت کننده L-NAME نسبت به بقیه گروه‌ها کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵)، ولی در اندازه پالپ‌های سفید در مقایسه با گروه نرمال سالین و کنترل تفاوت معنی داری از لحاظ آماری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مهار سنتز نیتریک اکساید توسط L-NAME بر پالپ‌های سفیدطحال موش باردار از نظر تعداد آن‌ها تأثیر داشته و باعث کاهش آن‌ها شده است.

واژگان کلیدی: نیتریک اکساید، پالپ سفید طحال، موش صحرایی

مقدمه

نیتریک اکساید یک مولکول با نیمه عمر کوتاه و به عنوان پیامبر داخل سلولی و بین سلولی عمل می‌کند که در بسیاری از عملکردهای سلولی و ارگان‌های بدن از جمله سیستم قلبی عروقی، تنظیم فشار خون، تنظیم‌کنندگی انقباض عضلات صاف، سیستم ایمنی و غیره دخالت دارد (۱).

این ماده در سیستم عروقی، تنظیم‌کننده تونوسیته رگ‌ها بوده و جریان خون را با فعال کردن گوانیلات سیکلاز محلول در عضلات صاف عروقی تنظیم می‌کند. اختلال در تولید و انتقال نیتریک اکساید(NO) منجر به اختلالات اندوتلیال عروق مانند هیپرتانسیون، آترواسکلروز و غیره می‌شود. از طرفی NO برای اتصال لکوسیت‌ها و تجمع پلاکتی ضروری است و مصرف اکسیژن میتوکندری را با مهار سیتوکروم اکسیداز C کنترل می‌کند (۲). NO به‌صورت اندوژن به‌صورت وسیع از راه‌های آنزیمی تولید می‌شود، هر چند راه‌های تولید غیرآنزیمی نیز دارد. تشکیل آنزیمی NO به‌وسیله آنزیم (NO Synthase ,NOS) کاتالیز می‌شود که همراه با تخریب L-Arginine به نیتریک اکساید و L– سیترولین در حضور اکسیژن و (Nicotinamide Adenine Di-nucleotide Phosphate, NADHP) است. بنابراین L-Arginine همواره به‌عنوان پیش‌ساز آن می‌باشد(۴ و ۳).

سه ایزوفرم NOS عبارت از NOS اندوتلیال: eNOS یا NOS3، NOS عصبی: NOS1 یا nNOS و NOS القایی NOS2 یا iNOS می‌باشند. از طرفی NOS1 و NOS3 آنزیم‌های متوالی هستند که به‌وسیله سیستم کلسیم/کالمودولین داخل سلولی کنترل می‌شوند، NOS2 به‌صورت القایی در سطح نسخه‌برداری ژن عمل می‌کند و به‌صورت مستقل از Ca+2 و به‌وسیله ماکروفاژ و بافت‌های دیگر در پاسخ به میانجی‌های التهابی بیان می‌شود.

نوع دیگر از ایزوفرم نیتریک اکساید سنتاز تحت عنوان NOS میتوکندریال mtNOS در دست بررسی و مطالعه محققین می‌باشد (۵ و ۲). تولید غیرآنزیمی NO شامل تولید آن از نیتریت‌ها از طریق راه‌های مختلفی است که بیشتر در شرایط اسیدی مانند ایسکمی اتفاق می‌افتد (۶).

اخیراً مشخص شده است که NO می‌تواند در مرحله بارداری بعنوان یک عامل بازدارنده رشد سلولی در تخمدان‌ها عمل کند (۷).

نیتریک اکساید می‌تواند عامل افزایش فعالیت سیستم ایمنی بدن باشد و سبب افزایش تعداد گلبول‌های سفید و افزایش قدرت ایمنی بدن شود (۸). هرچند تحقیقات دیگر نشان می‌دهد که افزایش میزان نیتریک اکساید می‌تواند عامل مهمی در آسیب بافتی باشد. دیابت اتوایمیون با فعالیت ماکروفاژها و اثرات سیتوتوکسیک لنفوسیت‌های T ناشی از افزایش میزان NOS می‌تواند نمونه‌ای از آن باشد (۹). یکی از عوامل شناخته شده در پاتوژنز بیماری آلزایمر، افزایش ترشح اینترلوکین‌های IL6 و IL1 می‌باشد. نیتریک اکساید با کاهش ترشح IL6 می‌تواند عاملی برای کاهش پیشرفت بیماری آلزایمر باشد (۱۰) طحال مسئول دفاع غیر اختصاصی میزبان بوده و به‌دلیل محتوای پر از فاگوسیت و ارتباط مستقیم با جریان خون نقشی اساسی در پاکسازی و جریان میکروارگانیسم‌ها، ذرات و حتی ملکول‌های بزرگ مانند (Lipo polysaccarhide ,LPS) ایفا می‌کند. لذا مطالعات هیستولوژیک طحال برای بررسی ارتباط و تأثیرات آندوتوکسین‌ها و مکانیسم‌های نیتریک اکساید بسیار با اهمیت می‌باشد(۱۲ و ۱۱).

با توجه به اهمیت و نقش نیتریک اکساید در سیتم ایمنی و التهابی بدن، استفاده از این ملکول در درمان بسیاری از بیماری‌های ایمنی و اتوایمیون توسط پژوهشگران در حال بررسی است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات نیتریک اکساید و L-NAME بعنوان مهار کننده سنتز NO بر روی بافت طحال از نظر کمی و کیفی که نقش زیادی در ایمنی‌زایی و دفاع بدن دارد، می‌باشد.

روش کار

مطالعه‌حاضرازنوع‌تجربی–مداخله‌ای(Experimental-Interventional) می‌باشد که در آن ۲۴ سر موش صحرایی ماده از نژاد Sprague Daw-ley با وزن متوسط۲۵۰–۲۰۰ گرم و سن متوسط ۸ هفته تهیه شده و پس از انتقال به محیط حیوان خانه دانشگاه، سازگازی با شرایط محیط (دسترسی مستقیم به غذا و آب، سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته) صورت گرفت. پس از جفت‌گیری و مشاهده پلاک واژینال که به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته می‌شد به‌طور تصادفی (Randomized) به ۳ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. به غیر از گروه کنترل که چیزی دریافت نکردند، بقیه گروه‌ها به ترتیب ۲ ml/kg نرمال سالین و ۲۰ mg/kg ساده L-NAME خریداری شده از شرکت سیگمای آلمان (Sigma Co., Germany) به صورت داخل صفاقی، در روزهای سوم، چهارم و پنجم حاملگی دریافت کردند(۷). در روز هیجدهم بارداری، موش‌های صحرایی بیهوش شده و پس از قطع نخاع طحال آنها خارج و در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری و فیکس شد. پس از پاساژ بافتی و قالب‌گیری با پارافین، برش برداری توسط میکروتوم چرخان به قطر ۵ تا ۶ میکرون انجام و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین– ائوزین (H&E) به‌منظور بررسی تغییرات ایجاد شده با میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) مدل CX31 ساخت ژاپن صورت گرفت. در مرحله بعد لام‌های مورد نظر از هر گروه انتخاب و با بزرگنمایی10 x و 40 x از آن‌ها فتوگراف تهیه شد. پس از آن مطالعات استریولوژیک وکمی به‌وسیله نرم افزار Image Tools III برای بررسی تعداد پالپ سفید (Number of Follicle) و اندازه متوسط قطر پالپ‌های سفید (Mean follicle diameter) صورت گرفت. سپس داده‌ها پس از ورود به نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد آنالیز واریانس و Tukey test قرار گرفتند. از نظر آماری P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

الف- یافته‌های کیفی

در بررسی هیستولوژیک بامیکروسکپ نوری و رنگ آمیزی H&E کاهش تعداد پالپ‌های سفید در گروهی که L-NAME دریافت کرده بودند نسبت به گروه کنترل و نرمال سالین مشهود بود (شکل شماره ۱ و ۲).

ب- یافته‌های کمی

از نظر کمی و آزمون واریانس یک طرفه مقایسه تعداد پالپ‌های سفید در گروه‌های مورد بررسی به طور کلی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در بررسی دو متغیره Tukey Test نشان داده شد که رابطه معنی‌داری میان گروه L-NAME (میانگین ۰/۴۴ ±۱/۲) و گروه کنترل (میانگین ۰/۴۴±۳/۲) P<۰/۰۵ و گروه L-NAME و نرمال‌سالین (میانگین ۰/۸۳ ±۲/۸) P<۰/۰۵ وجود دارد (شکل ۳).

میانگین قطرهای پالپ‌های سفید طحال (Mean follicle diameter) در گروه‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. (P<۰/۰۵) (شکل ۴).

بحث و نتیجه‌گیری

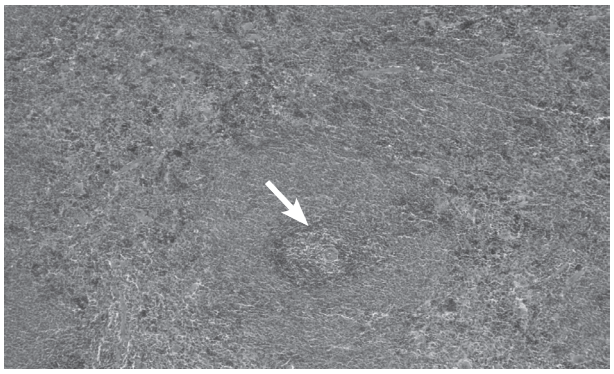
مطالعه حاضر در بررسی نقش نیتریک اکساید در هیستولوژی طحال نشان داد که مهار سنتز نیتریک‌اکساید توسط L-NAME و تزریق این ماده به‌صورت داخل صفاقی ممکن است سبب کاهش تعداد پالپ سفید طحال شود.

نیتریک اکساید در خلال پاسخ‌های ایمنی و التهابی نیز ساخته می‌شود که هنوز مطالعات زیادی در رابطه با آن در حال انجام است. نیتریک اکساید در پدیده‌های ایمونولوژیک به عنوان یک عامل توکسیک به دفاع در برابر ارگانیسم‌های عفونی پرداخته و از طرفی با القا و یا مهار آپوپتوز نقش یک تنظیم‌کننده ایمنی (Immunoregulatory) را ایفا می‌کند(۱۳ و ۱۲). مطالعات متعدد نشان‌دهنده اثر مهاری NO بر عملکرد سلولی و رشد سلولی می‌باشد، هرچند در شرایط اختصاصی می‌تواند اثر ضد آپوپتوزی داشته باشد(۱۴).

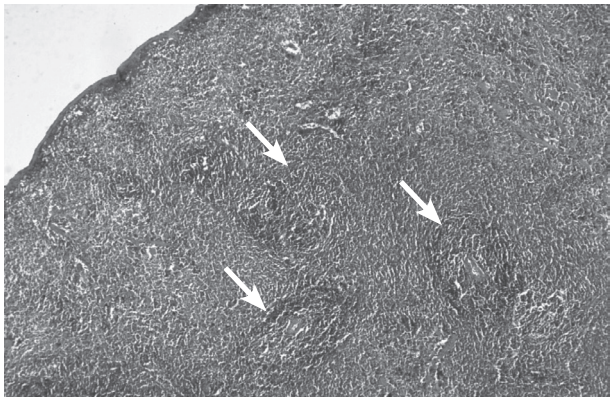
Kim و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که القا و یا مهار آپوپتوز ارتباط زیادی با نوع سلول‌ها دارد به‌طوری‌که ماکروفاژها، سلول‌های پانکراس و تیموسیت‌ها به صورت بارزتری نسبت به آپوپتوز ناشی از نیتریک اکساید حساس می‌باشند (۱۵).

در مطالعه حاضر نیز انتخاب طحال به دلیل وجود مقادیر فراوان ماکروفاژ و لنفوسیت در پارانشیم این عضو بوده که بررسی کمی آن‌ها می‌تواند بازتابی از ارتباط نیتریک اکساید در عملکرد ایمونولوژیک باشد.

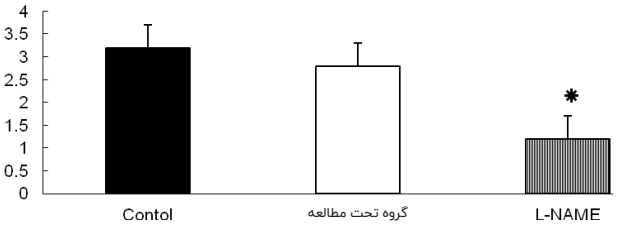
نیتریک اکساید فعالیت‌های مختلف رشد و مرگ سلول‌های ایمنی و التهابی از جمله ماکروفاژها، لنفوسیت‌های T، سلول‌های ارائه دهنده آنتی‌ژن (Antigen presenting cell)، ماست‌سل‌ها، نوتروفیل‌ها و



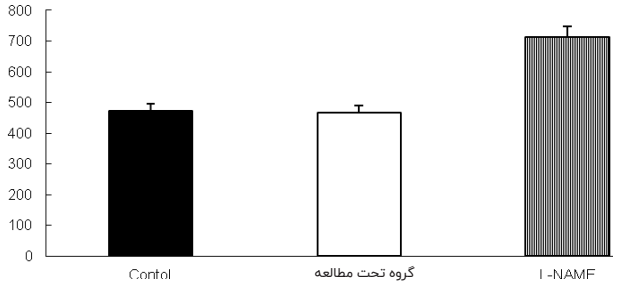
شکل ۱- پالپ سفید طحال در گروه L-NAME را نشان می‌دهد (رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی X 10)



شکل ۲- پالپ سفید طحال در گروه نرمال سالین را نشان می‌دهد (رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی X 10).



شکل ۳- گروه‌های مختلف تحت مطالعه را نشان می‌دهد که در آن معنی‌داری میان گروه L-NAME و گروه کنترل (P<۰/۰۵) و همچنین گروه L-NAME (P<۰/۰۵) و گروه نرمال‌سالین (P<۰/۰۵) * معنی‌داری (Significant)



شکل ۴- قطر متوسط پالپ‌های سفید در گروه‌های مختلف تحت مطالعه را نشان می‌دهد.

سلول‌های NK را تنظیم می‌کند (۱۶).

بوگدان و همکاران (۱۷) در مطالعه خود نشان دادند که لنفوسیت‌ها می‌توانند NO را آزاد کنند در حالی‌که ماکروفاژهای موش طی یک مکانیسم وابسته به NO موجب کاهش فعالیت لنفوسیت‌ها می‌شوند. یافته‌های آنان مؤید دخالت NO در نوعی ایمنی اختصاصی بود هرچند نقش دقیق آن تاکنون شناخته نشده است. شواهد زیادی در این زمینه بیانگر نقش NO در بروز التهابات مزمن و حاد می‌باشد.

درمان با مهارکننده‌های نیتریک اکساید می‌تواند موجب درجاتی از کاهش التهاب حاد شود در حالی‌که تجویز L-Arginine به عنوان پیش‌ساز NO باعث تشدید التهاب می‌شود(۱۹-۱۷).

در مطالعه حاضر نیز تجویز L-NAME به عنوان ماده مهارکننده NO سبب کاهش در تعداد پالپ‌های سفید طحال شده که می‌تواند بیانگر کاهش فعالیت ایمنی و لنفوسیت‌ها باشد، هرچند در اندازه متوسط قطر پالپ‌های سفید اختلاف معنی‌داری بین گروه L-NAME و کنترل وجود نداشت.

در این مطالعه با استفاده از L-NAME (مهارکننده سنتز نیتریک‌اکساید) سعی شده که شاخص‌های کمی در ایمنی‌زایی طحال یعنی تعداد و قطر متوسط پالپ‌های سفید آن‌ها با گروه کنترل مقایسه شوند. تعداد پالپ‌های سفید بطور معنی‌داری در گروه دریافت‌کننده L-NAME در مقایسه با گروه کنترل و نرمال‌سالین به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P<0/05$) که می‌تواند بیانگر نقش ایمونوژنیسیتی نیتریک اکساید در طحال باشد. هرچند از نظر قطر متوسط پالپ‌های سفید بین سه گروه مورد مطالعه تغییر معنی‌داری مشاهده نشد.

ازآنجایی که موش‌های مورد استفاده در تجربه حاضر باردار بوده و در اواخر بارداری یعنی روز هیجدهم طحال آنها خارج و مورد مطالعه قرار گرفتند، ممکن است میزان نیتریک اکساید تغییر کرده باشد. همانطور که در بعضی از مطالعات تغییرات آن را در اواخر ترم در شروع مراحل زایمان و تمایز سرویکس رحم مؤثر دانسته‌اند(۲۰) حتی در مطالعه دیگر کاهش NO در مراحل پایانی بارداری را بعنوان عامل پیشبرد مراحل زایمان ذکرکرده‌اند(۲۱). لذا به عنوان یکی از محدودیت‌های طرح پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی بررسی‌ها و تجویز در سه فاز ابتدایی، میانی و انتهایی بارداری صورت گیرد و به مقایسه آن‌ها پرداخته شود.

همچنین پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی به بررسی شاخص‌های ایمونولوژیک نظیر اندازه‌گیری اینترلوکین‌های IFNγ، IL8، IL6، IL1 و TNFα (۱۲) متعاقب تزریق پیش‌ساز و مهارکننده نیتریک اکساید پرداخته شود.

منابع

1. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. Br J Pharmacol 2006;147 1: S193–201.

2.Chen K, Pittman RN, Popel AS. Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective. Antioxid Redox Signal. 2008; 10:1185–98.

3. Wu G, Morris SM., Jr Arginine metabolism: nitric oxide and beyond Biochem J. 1998;336(Pt 1):1–17.

4. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway N Engl J Med. 1993; 329:2002–12.

5. Chen K, Popel AS. Nitric oxide production pathways in erythrocytes and plasma. Biorheology 2009; 46:107–19.

6. Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. Nat Med 1995; 1:804–9.

7. Noori Mugahi SMH, Minaee B, Mehran Nia T, AzarNia M, Shirazi R. The effect of L-Agginine and L-Name on corpus luteum and growing follicle changes in pregnant rats. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences; 2009; 17 (4): 1-8.

8. Fernandez L, Iglesias M, Biron M, Veronica A, Wolfenstein TC. Protective effect of prolactin and placental lactogen on No-induced Nb2 Lymphoma cell apoptosis. Arch Biocehm Biopsy 2003; 416(2(: 249-256.

9. Lancaster J. Nitric Oxide: Principles and actions. J Chem Neuroanat 2001; 21:249-250.

10. Ilkhanipour M, Hayat-Gheibi H, Sadeghi G. The effect of nitric oxide on percentage of platelet, red blood cells and white blood cells. Urmia Medical sciences Journal 2006;17(2):81-6.

11. Bircan FS, Balabanli B, Turkozkan N, Ozan G. Effects of Taurine on Nitric oxid and 3-Nitrotyrosine Levels in spleen during Endotoxemia. Neurochem Res 2011; 36:1978-83.

12.Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. Int immunopharmacol 2001; 1:1397-1406.

13. Wiegand SB, Traeger L, Nguyen HK, Rouillard KR, Fischbach A, Zadek F, Ichinose F, Schoenfisch MH, Carroll RW, Bloch DB, Zapol WM. Antimicrobial effects of nitric oxide in murine models of Klebsiella pneumonia. Redox Biol. 2021; 39:101826

14.Kroncke K-D, Fehsel K, Suscheck C, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. Int Immunopharmacol 2001; 1:1407-20.

15.Kim PKM, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. Int Immunopharmacol 2001; 1:1421-41.

16. Tripathi P. Nitric oxide and immune response. Indian J Biochem Biophys 2007;44(5):310-9.

17. Bogdan C. The function of nitric oxide in the immune system. Handbook of experimental pharmacology. Volume: Nitric oxide (Mayer B,ed) 2000.Springer,Heidelberg PP.443-92.

18. Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions.FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 51:443-52.

19. Lee YC, Su YT, Liu TY, Tsai CM, Chang CH, Yu HR. L-Arginine and L-Citrulline Supplementation Have Different Programming Effect on Regulatory T-Cells Function of Infantile Rats. Front Immunol. 2018 10;9: 2911.

20. Hudicek-Martincic G, Kusan-jukic M, Salihagic-Kadic A. Nitric oxide—an important signaling molecule in normal and pathological pregnancy.Lijec Vjesn 2004;126(3-4):80-5.

21.Maul H, Longo M, Saade GR, Garfield RE. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. Curr Pharm Des 2003; 9(5): 359-80.