

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 Piryaee, 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) enzyme 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 any expression 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

مقاله پژوهشی

بررسی بیان ایزوفورم اندوتلیالی آنزیم سنتز کننده نیتریک اکساید در لوله 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، نویسنده 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 وسیله عملکرد آنزیم سنتز کننده نیتریک اکساید (eNOS)، تولید می شود و در تنظیم تعداد زیادی از وقایع تولید مثلی که در لوله فالوپ اتفاق می افتد مشارکت دارد. هدف از این مطالعه بررسی بیان eNOS، در سلول های مژک دار و ترشحات اپیتلیوم لومینال لوله 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 لوتال 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 ایمنونوهیستوشیمی قرار گرفتند.

یافته ها: مکان یابی پروتئین eNOS در سلول های ترشحاتی 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 لوتال 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 مژک دار و ترشحاتی اپیتلیوم لومینال زنان حامله ترم در مقایسه با زنان در فاز لوتال، می تواند نشان دهنده یکسان بودن فعالیت و عملکرد مژک ها در این دو گروه باشد.

کلید واژه ها: eNOS، لوله فالوپ، حاملگی

مقدمه

علاوه بر عملکرد های فیزیولوژیکی ذکر شده، نیتریک اکساید (NO)، در تنظیم تولید مثل پستانداران، دخیل می باشد (۴-۷). NO، همچنین شمار زیادی از اعمال تولید مثلی جنس مؤنث را در پستانداران کنترل کرده و به نظر می رسد، تنظیم کننده اصلی پاراکراین، در فرایندهای تولید مثلی، همانند ترشح 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

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 مهمی است که در فرایندهای فیزیولوژیکی متعددی، از جمله ترشح هورمون، التهاب و عملکرد ایمنی و انتقال نورونی نقش دارد (۳).

بینیم آیا تغییرات فیزیولوژیکی که در هنگام زایمان اتفاق می افتد، می تواند بر روی بیان eNOS در لوله فالوپ، تأثیر گذار باشد.

مواد و روش‌ها

تمام تکنیک‌ها، روش‌ها و انتخاب بیماران، توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به تصویب رسید.

جمع آوری نمونه و آماده سازی بافت‌ها

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

گروه مورد

این گروه شامل ۱۰ نفر از زنان حامله سالم ترم بودند که به دلیل بستن لوله‌های رحم برای جلوگیری از بارداری، زایمان آن‌ها از طریق سزارین انجام می‌شد. میانگین سنی این افراد، ۳۵/۶ بود. زنانی که دچار عفونت بودند، یا این که، از طریق القاء، زایمان آن‌ها انجام می‌شد از این مطالعه خارج شدند.

گروه کنترل

این گروه شامل ۱۰ نفر از زنان غیر حامله ای بود که در فاز لوتئال از چرخه قاعدگی بودند و میانگین سنی آن‌ها ۳۸/۳ سال بود و به دلیل بیماری‌های خوش خیم رحمی که لوله‌های فالوپ را تحت تأثیر قرار نداده بود، تحت عمل هیستکتومی قرار می‌گرفتند.

در این مطالعه، در حدود 1 cm^3 از بافت آمپول لوله‌های فالوپ، توسط جراح 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 تکنیک ایمونوهیستوشیمی آماده گردد.

ایمونوهیستوشیمی

برای انجام تکنیک ایمونوهیستوشیمی، نمونه‌های جمع آوری شده از بافت لوله فالوپ ابتدا در محلول فرمالین بافری ۱۰٪ تثبیت شدند. سپس بافت‌ها در پارافین قرار داده شدند و بعد از قالب گیری، برش‌های $3 \mu\text{m}$ از آن‌ها تهیه شد که بر روی لام‌هایی که با پلی-ال-لازین 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، برش‌هایی که از بافت‌های آغشته به پارافین تهیه شده بود، در محلول زایلبل، پارافین زدایی شده و با استفاده از سری‌های الکل نزولی آب دهی شدند. در مرحله بازیافت آنتی ژن هم، لام‌ها در محلول بافر 10 mmol/L اسید سیتریک با $\text{pH}=6.0$ قرار داده شده و سپس در داخل دستگاه میکروویو، برای مدت زمان حدود ۱۴ دقیقه قرار گرفتند. سپس اسلاید‌ها 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-

گونه‌های متعدد پستانداران، یافت می‌شوند (۸-۱۱). کاهش باروری در موش‌های مؤنث، که از نظر ایزوفورم‌های eNOS و iNOS معیوب می‌باشند، دیده شده است (۱۲). علاوه بر این، بررسی‌های اخیر، دلایل قانع کننده‌ای ارائه کرده‌اند، مبنی بر این که، نیتریک اکساید، می‌تواند تمام وقایع تولید مثلی که در لوله رحم اتفاق می‌افتد را تحت تأثیر قرار دهد (۱۶-۱۳).

لوله‌های فالوپ پستانداران، ارگان‌های بسیار تخصصی هستند که شرایط مطلوب را برای بلوغ گامت، لقاح و تکامل اولیه رویان، فراهم می‌کنند (۲). اگر یکی از این اعمال مهم لوله 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 لوله فالوپ به وسیله انقباض عضله صاف و زنش مژک‌ها، کنترل می‌شود (۱۷). اگرچه اهمیت نسبی هر کدام از این، مکانیسم‌ها ناشناخته است، ولی شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اعمال مژک‌ها نقش اصلی را در حرکت رویان ایفا می‌کند. زیرا، هنگامی که فعالیت عضله صاف لوله فالوپ، به وسیله ایزوپروتونول، آگونیست بتا آدرنژیک، مهار می‌شود، در زمان کلی انتقال رویان از طریق لوله فالوپ، اختلافی وجود ندارد، و این نشان دهنده آن است که، مژک‌ها به تنهایی قادر به انتقال رویان از بین لوله می‌باشند (۱۷). در جنس مؤنث، سلول‌های مژک دار اپیتلیوم لومینال، قسمتی از مجاری دستگاه تولید مثل را مفروش کرده‌اند و نشان داده شده است که، مژک‌ها، در انتقال گامت، تخم و رویان نقش اساسی دارند (۳).

مطالعات اخیر، نشان داده‌اند که، زنش مژک‌ها به وسیله مکانیسم وابسته به NO، تنظیم می‌شود (۱۸). علاوه بر این، نشان داده شده است که، سطوح پایین NO، با عملکرد معیوب مخاط، در مجاری فوقانی هوایی (۳)، مرتبط می‌باشد. همچنین، بیمارانی که دیس کینزی مژه‌ای اولیه دارند، دچار جهش، در ژن بیان کننده ایزوفورم اندوتلیالی آنزیم سنتز کننده نیتریک اکساید (eNOS)، هستند (۱۹).

از لحاظ فراساختاری نشان داده شده است که eNOS در جسم قاعده‌ای میکروتوبول‌های مژک‌ها، لوکالیزه شده است و نیتریک اکساید (NO) تعداد زنش مژک‌ها را تحریک می‌کند. این یافته‌ها، نشان دهنده نقش مهم نیتریک اکساید، در تنظیم عملکرد مژک‌ها می‌باشد. تنظیم تعداد زنش مژک‌ها (CBF)، به وسیله نیتریک اکساید، از طریق مسیر پیام رسانی NO-cGMP می‌باشد، که نشان دهنده آن است که، نیتریک اکساید برای زنش مژک‌ها ضروری می‌باشد (۳). علاوه بر این یافته‌ها نشان می‌دهند که، تعداد زنش مژک‌ها وابسته به سطح هورمون‌ها می‌باشد و در شرایط آزمایشگاهی، فعالیت آن‌ها به وسیله آنژیوتانسین II و پروژسترون تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۲۰). بنابراین، با توجه به این که مطالعات نشان داده‌اند که تولید نیتریک اکساید در سلول‌های مژک دار اپیتلیوم تنفسی مجاری هوایی از طریق eNOS می‌باشد (۳)، در این مطالعه تصمیم گرفته ایم تا از طریق اندازه گیری میزان بیان ایزوفورم اندوتلیالی آنزیم سنتز کننده نیتریک اکساید (eNOS)، در لوله فالوپ، نقش eNOS را در عملکرد مژک‌ها نشان داده و

در این مطالعه، اختلاف در رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی بین دو گروه از طریق تست U Mann Whitney و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۱۶ مورد بررسی قرار گرفت. در این مقاله مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار تلقی گردید.

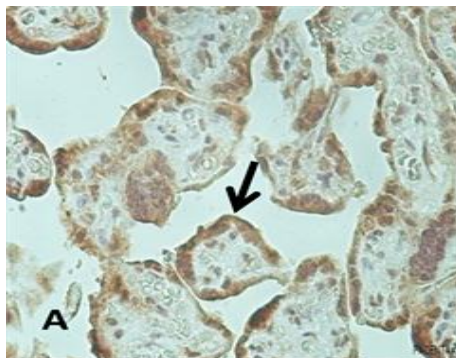
یافته‌ها

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 نمونه کنترل مثبت در این مطالعه، که برای صحت رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی eNOS، مورد استفاده قرار گرفت، نمونه جفت انسان انتخاب شده بود که پروتئین eNOS در آن به میزان بالایی بیان شد (شکل ۱). نمونه بافت گرفته شده از جفت انسان که در غیاب آنتی بادی اولیه با PBS، اینکوبه شده بود و به عنوان کنترل منفی به شمار می رفت، رنگ آمیزی منفی علیه eNOS را نشان داد. رنگ آمیزی مثبت آنتی بادی eNOS در تمام نمونه های بافتی تهیه شده از لوله فالوپ زبانی که در فاز لوتئال از چرخه قاعدگی بودند و زنان حامله که زایمان ترم داشتند، مشاهده گردید (شکل ۳ و ۲). در این مطالعه، سلول های مژک دار و ترشحي اپیتلیوم لومینال در هر دو گروه، رنگ آمیزی مثبت از خود نشان دادند و آنتی بادی علیه eNOS، تمام سیتوپلاسم سلول های اپیتلیالی را نشان دار کرد. همچنین رنگ آمیزی مثبت علیه eNOS انسانی، در دیواره عروق در هر دو گروه دیده شد. در این مطالعه، در سلول های عضله صاف لوله 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 ترشحي اپیتلیوم لومینال زنان در فاز لوتئال و زنان حامله با زایمان ترم، مشاهده نمی شود ($P > 0/05$; نمودار ۱).

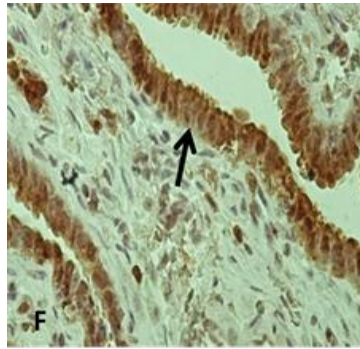
پراکسیداز در حدود ۱۵ دقیقه، اینکوبه شدند، تا عمل پراکسیداز اندوزن خنثی شود. بعد از شستشوی مجدد، اسلایدها با محلول بلاکر سرم بزی ۱/۵ درصد (شرکت داکو، دانمارک) پوشانده و برای ۳۰ دقیقه در داخل اتاقک مرطوب در دمای اتاق قرار داده شدند تا از اتصال غیر اختصاصی آنتی بادی جلوگیری شود. در مرحله بعد، لام های پوشیده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

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

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



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

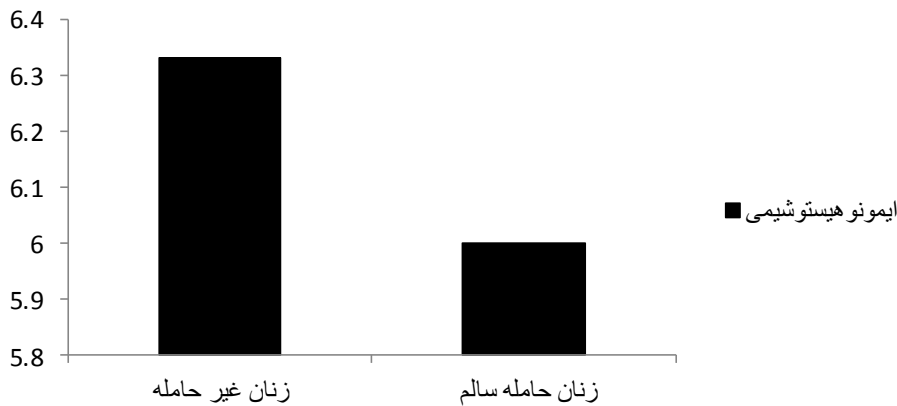


شکل ۲: تصویر حاصل از میکروسکوپ نوری بیانگر مکان یابی ایمونوهیستوشیمیایی مثبت آنزیم eNOS در بافت لوله فالوپ زنان غیر حامله در فاز لوتئال از چرخه قاعدگی. فلش سیاه رنگ اشاره به اپیتلیوم لومینال دارد. تصویر با بزرگنمایی ۴۰× گرفته شده است.



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

ایمونو هیستوشیمی



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

از زنان، زمانی اتفاق می افتد که، مژک های آن ها دارای عملکرد و تحرک نسبی باشد. این امر تأیید کننده نقش مهم مژک ها در عملکرد صحیح لوله فالوپ می باشد (۲). علاوه بر این، مطالعات نشان می دهند که، تعداد زنش مژک ها (CBF)، در مجاری هوایی از طریق مسیر پیام رسانی نیتریک اکساید-گوانوزین مونوفسفات حلقوی (NO-cGMP) تنظیم می شود. همچنین، آزاد شدن NO در مخاط نای خرگوش و تولید cGMP در اپیتلیوم مجاری هوایی انسان، قبلاً گزارش شده است. همچنین، مهار آنزیم سنتز کننده نیتریک اکساید (NOS)، تحریک تعداد زنش مژک ها را که توسط محرک بتا-آدرنژیک القاء شده است تضعیف می کند (۲۳).

مطالعات متعدد، نشان داده اند که نیتریک اکساید (NO)، در اکثر وقایع تولید مثلی که به طور طبیعی در لوله فالوپ پستانداران، اتفاق می افتد، دخالت دارد (۱۶ و ۱۳). در پستانداران، سلول های مژک دار، قسمتی از دستگاه تولید مثل اپیتلیوم مجاری تنفسی و بطن های سیستم عصبی مرکزی را مفروش کرده اند. حضور NO در مجاری تنفسی، با کشف NO، در هوای بازدمی و مکان یابی eNOS، در اپیتلیوم مجاری هوایی و ریه، نشان داده شده است (۳). زنانی که دچار سندرم مژه بدون حرکت، هستند، از مشکلات نازایی رنج می برند (۲۲). افراد مبتلا به این بیماری دارای مقدار NO کمتری در هوای بازدمی هستند. حاملگی موفق در این گروه

جنینی، در زنان باردار قبل و بعد از زایمان انجام شد، مشاهده شد که هیچ اختلاقی در فعالیت و بیان آنزیم NOS در میومتریوم، جفت یا غشاهای جنینی قبل و بعد از زایمان ترم وجود ندارد (۲۸). آن‌ها پیشنهاد کردند که در انسان، کاهش در فعالیت و بیان آنزیم NOS در شروع زایمان ترم دخالتی ندارد، و این یافته بر خلاف بررسی‌های انجام شده بر روی حیوانات است که در آن‌ها، شروع زایمان با کاهش فعالیت و بیان NOS همراه است (۲۹) و (۲۸).

بنابراین، نتایج حاصل از این مطالعه، نشان دهنده آن است که شروع زایمان در انسان‌ها، با کاهش در فعالیت و بیان eNOS در نتیجه، تغییر در فعالیت مژک‌ها همراه نمی‌باشد. همچنین با توجه به یافته‌های قبلی، که نشان می‌دهند، میزان نیتریک اکساید بر روی تعداد زنش مژک‌ها مؤثر است (۲۳)، می‌توان از نتایج این تحقیق چنین استنباط کرد که تعداد زنش مژک‌ها، در سلول‌های مژک‌دار لوله فالوپ در زنان حامله ترم با میزان آن در زنان غیر حامله که در فاز لوتئال از چرخه قاعدگی بودند، برابر است. بنابراین، با توجه به این که نتایج حاصل از یافته‌های قبلی نشان می‌دهند میزان بیان eNOS، در اپیتلیوم پوشاننده مجاری هوایی با میزان فعالیت مژک‌ها مرتبط می‌باشد (۲۳)، می‌توان با بررسی بیان این آنزیم در لوله فالوپ زنان حامله در ماه‌های مختلف بارداری و زنان غیر حامله در مراحل مختلف چرخه قاعدگی، به میزان مقدر بیان طبیعی آن در سلول‌های اپیتلیالی لوله فالوپ زنان حامله، در ماه‌های مختلف یک بارداری طبیعی پی برد. سپس، با معلوم شدن میزان بیان طبیعی eNOS، در سلول‌های مژک‌دار و ترشحات اپیتلیوم لوله فالوپ زنان حامله، در طول ماه‌های مختلف حاملگی طبیعی خصوصاً در اوایل بارداری، می‌توان مقدار آن را با بیان eNOS، در لوله فالوپ زنانی که مشکلات مرتبط با نازایی دارند، مقایسه کرد و بررسی کرد که آیا میزان بیان این آنزیم در این گروه‌ها متفاوت است. پس با توجه به این که احتمال دارد افزایش زنش غیرطبیعی مژک‌ها، در لوله فالوپ، باعث حرکت سریع تخم و رویان و در نتیجه سقط و نازایی شده، و نیز کاهش تعداد زنش مژک‌ها، باعث کاهش فعالیت مژک‌های فیمبریا شده، که در نتیجه آن، فیمبریاهای لوله فالوپ نمی‌توانند تخمک آزاد شده از تخمدان را با حرکت مژک‌ها به سوی خود بکشند و احتمال آن وجود دارد که تخمک به داخل شکم آزاد شود و در نهایت به واسطه لقاح در داخل شکم منجر به حاملگی داخل شکمی شود، می‌توان با اندازه‌گیری مقدار بیان eNOS، به طور غیرمستقیم پی به فعالیت مژک‌ها 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 مژک‌ها تأثیر سوء گذاشته و باعث بروز این مشکلات شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به بیان eNOS در سلول‌های ترشحاتی و مژک‌دار اپیتلیوم لوله فالوپ، احتمالاً این آنزیم در عملکرد مژک‌ها تأثیرگذار می‌باشد، و با توجه به این که میزان بیان این آنزیم در افراد حامله طبیعی و زنان غیر حامله سالم برابر است، تغییرات بیان

همچنین، مطالعات قبلی نشان داده‌اند که نقص اولیه حرکت مژه با جهش در ژن eNOS همراه است (۳). بیشتر اعمال بیولوژیکی NO از طریق پروتئین گیرنده آن به نام گوانیلات سیکلاز محلول (sGC)، که گوانوزین تری فسفات را به cGMP کاتالیز می‌کند، انجام می‌شود. سپس cGMP پروتئین کیناز G را فعال می‌کند که در تنظیم تعداد زنش مژک‌ها مشارکت دارد (۲۳). علاوه بر این، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که، eNOS، sGC و PKG در سلول‌های اپیتلیوم مجاری هوایی موش صحرائی مکان یابی شده‌اند و این سلول‌ها، به صورت فعال، نیتریک اکساید تولید می‌کنند که تعداد زنش مژک‌ها را در مجاری هوایی تنظیم می‌کند (۲۳). علاوه بر آن، مطالعات قبلی نشان می‌دهند که، ظاهر و تعداد زنش مژک‌ها (CBF)، در لوله رحم در طول چرخه منظم قاعدگی در پستانداران، تغییر می‌کند. در خرگوش‌ها میزان زنش مژک‌ها، در لوله رحم، در روزهای دوم و سوم جفت‌گیری تا ۲۰٪ افزایش می‌یابد، که با زمان حرکت تخم در لوله رحم مرتبط می‌باشد (۲۴). با وجود این، در مطالعاتی که در لوله فالوپ انسان انجام شده است توافق کلی، در میزان تعداد زنش مژک‌ها، در طول چرخه قاعدگی وجود ندارد (۲۲). دلیل این امر، به واسطه روشهای متفاوت برای ارزیابی تعداد زنش مژک‌ها و همچنین، پارامترهای مختلفی است که برای تعیین مراحل چرخه قاعدگی در انسان، تعیین می‌شود (۲۲). همچنین، بیان ایزوفورم‌های NOS و نیکوئین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات- دیافوراز (مارکر غیراختصاصی و هیستوشیمیایی برای تعیین فعالیت تمام ایزوفورم‌های NOS)، در طول چرخه قاعدگی طبیعی در لوله رحم انسان، موش صحرائی و خوک تغییر می‌کند (۲۵). این نتایج امکان این فرضیه را قوت می‌بخشد که تغییرات در NO تولید شده، توسط ایزوفورم‌های مختلف NOS، در شرایط متغیر فیزیولوژیکی بدن، ممکن است در تنظیم اعمال مهم لوله فالوپ، از جمله زنش مژک‌ها نقش داشته باشد (۲۵). در حقیقت ثابت شده است که بیان و فعالیت eNOS تحت تأثیر میزان β -۱۷-استرادیول و پروژسترون قرار دارد (۲۶). در اپیتلیوم لوله فالوپ، گیرنده β -استرادیول و نیز، گیرنده پروژسترون، شناسایی شده‌اند و گزارش شده است که بیان این رسیپورها نیز در طول چرخه منظم قاعدگی تغییر می‌کند (۲۷). بنابراین، با توجه به نتایج تحقیقات قبلی، که نشان داده بودند تغییرات در بیان eNOS با تغییرات چرخه قاعدگی و سطح هورمون‌ها تغییر می‌کند، مطالعه حاضر، به بررسی بیان ایزوفورم اندوتلیالی آنزیم سنتزکننده نیتریک اکساید (eNOS)، در لوله فالوپ زنان حامله، هنگام زایمان و در زنان غیر حامله، در فاز لوتئال از چرخه قاعدگی، پرداخت. نتایج این مطالعه نشان داد که، میزان بیان eNOS، در لوله فالوپ زنان حامله در هنگام زایمان با میزان آن در زنان غیر حامله، در فاز لوتئال برابر است.

در حقیقت، این مطالعه، اولین تحقیق است که ثابت بودن میزان بیان eNOS را در سلول‌های مژک‌دار لوله فالوپ انسان، در هنگام زایمان گزارش می‌کند. و نشان می‌دهد که میزان بیان این آنزیم با شروع زایمان تغییر نمی‌کند. از سوی دیگر، در یک مطالعه که توسط تامسون و همکاران، بر روی بافت رحم، جفت و غشاهای

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 تشکر خود را از همکاران این مرکز ابراز می دارند.

آن، می تواند 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 لوله فالوپ، می توان، 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.

References

- Alderton WK, Cooper CE. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2006; **357**: 593-615.
- 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.
- Zhan X, Li D, Johns RA. Expression of endothelial nitric oxide synthase in ciliated epithelia of rats. *J Histochem Cytochem* 2003; **51**: 81-87.
- Herrero MB, Gagnon C. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *J Androl* 2001; **22**: 349-356.
- Dixit VD, Parvizi N. Nitric oxide and the control of reproduction. *Anim Reprod Sci* 2001; **65**: 1-16.
- 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.
- Maul H, Longo M, Saade GR. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des* 2003; **9**: 359-380.
- 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.
- Thomson AJ, Telfer JF, Kohlen 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.
- 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.
- Chwalisz K, Garfield RE. Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Hum Reprod* 2000; **15**: 96-111.
- Tranguch S, Huet-Hudson Y. Decreased viability of nitric oxide synthase double knockout mice. *Mol Reprod Dev* 2003; **65**: 175-179.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Shaw LV, Dey SK, Critchley HOD, Horne AW. Current knowledge of the etiology of human tubal ectopic pregnancy. *Human Reproduction* 2010; **16**: 432-444.
- Rodriguez PC, O'Flaherty CM, Beconi MT, Beorlegui NB. Nitric oxide-induced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. *Anim Reprod Sci* 2005; **85**: 231-242.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lyons RA, Saridogan E, Djahanbakhch O. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update* 2006; **12**: 363-372.
- 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.
- Borell U, Nilson O and Westman A. Ciliary activity in the rabbit Fallopian tube during oestrus and after copulation. *Acta Obstet Gynecol* 1957; **36**: 22-28.
- 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.

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, Kohlen 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.