مهارکننده‌ی نیتریک اکساید سنتاز در یک رفتار وابسته به دُز بلوغ میوزی اووسیت گوسفند را مهار می‌کند

مهدی حیدری عمله[1]، احمد زارع شحنه[2]، عباس ابویسانی[3]، سلمان نصرالهی[1]

۱. دانشجویان کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، دانشگاه تهران 2. استاد گروه علوم دامی، دانشگاه تهران 3. استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

نیتریک اکساید (NO) توسط ایزوفرم‌های مختلف آنزیم نیتریک اکساید سنتاز(NOS) در سلول‌های پستانداران تولید می-شود. نشان داده شده است که نیتریک اکساید یک واسطه برای بلوغ میوزی در اووسیت بسیاری از پستانداران است. به نظر می‌رسد هیچ گزارشی در مورد اثر این ترکیب بر بلوغ برون‌تنی اووسیت گوسفند وجود ندارد. لذا در این آزمایش مهارکننده‌ی آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (L-NAME) در غلظت‌های مختلف (0، 0.1و 1 میلی‌مولار) مورد استفاده قرار گرفت تا اثرات کاهش میزان نیتریک اکساید بر بلوغ میوزی اووسیت گوسفند ارزیابی شود. نتایج نشان داد که L-NAME در یک رفتار وابسته به دُز بلوغ میوزی و خروج اولین جسم قطبی را بطور معنی‌داری در اووسیت گوسفند مهار می‌کند. همچنین این مطالعه سازگار با سایر مطالعات مرتبط نشان داد که سیستم NO/NOS در بلوغ میوزی اووسیت گوسفند موثر است.

کلمات کلیدی: نیتریک اکساید سنتاز، بلوغ میوزی، اووسیت گوسفند

مقدمه

درک فرآیندهایی که در بلوغ کمپلکس کومولوس-اووسیت (COC) درگیر می‌شوند برای بهبود تکنیک‌های مرتبط با تولیدمثل مهم است. تغییرات سلولی که در این کمپلکس در طی بلوغ رخ می‌دهند هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند. آنزیم نیتریک اکساید سنتاز(NOS) که وظیفه‌ی تولید نیتریک اکساید (NO) را از ال- آرژنین و اکسیژن دارد، دارای سه ایزوفرم مختلف در سلول‌های پستانداران است. این ایزوفرم‌ها عبارتند از: 1) NOS عصبی (nNOS)، 2) NOS اندوتلیال (eNOS) و 3) NOS القایی (iNOS). دو ایزوفرم اول وابسته به کلسیم و کالمودولین بوده و ایزوفرم آخر به صورت مستقل از کلسیم و کالمودولین نیتریک اکساید را تولید می‌کند (13). سیستم NO/NOS در اعمال تولیدمثلی همچون استروئیدسازی، فولیکول‌سازی، تخمک‌ریزی و بلوغ میوزی اووسیت دخیل است (9). بلوغ اووسیت در صورت کمبود این آنزیم‌ها آسیب می‌بیند و لذا پیشنهادکننده‌ی این است که NO یک واسطه در بلوغ میوزی اووسیت است.

برای مطالعه اثر کمبود نیتریک اکساید روی بلوغ اووسیت از روش‌ها و مواد مختلفی استفاده می‌شود. بعنوان مثال جابولانکا-شریف (1998) از موش‌هایی که ژن آنزیم نیتریک اکساید سنتاز آن‌ها حذف شده بود استفاده کرد. در مطالعات دیگری از چندین دارو که به لحاظ ساختاری مشابه ال-آرژنین هستند استفاده شده است (1، 2، 7و 9). این داروها به صورت رقابتی فعالیت نیتریک اکساید سنتاز را مهار می‌کنند. از این داروها می‌توان Nω-nitro-L-argininemethyl ester (L-NAME)، aminoguanodin (AG) و N^{w}-nitro-L-arginine (L-NNA) را نام برد. AG یک مهارکننده‌ی اختصاصی برای iNOS است، در حالیکه L-NAME تمامی ایزوفرم‌های نیتریک اکساید سنتاز را مهار می‌کند(7).

بنابراین، مطالعه اخیر به منظور بررسی اهمیت سیستم NO/NOS در بلوغ اووسیت گوسفند انجام شد و اثرات مهار نیتریک اکساید سنتاز توسط L-NAME بر بلوغ برون‌تنی و بلوغ هسته‌ای اووسیت گوسفند مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش

جمع‌آوری تخمدان و انتخاب اووسیت‌ها

تخمدان‌های گوسفندی در یک فصل غیرتولیدمثلی از یک کشتارگاه محلی جمع‌آوری و توسط یک فلاسک حاوی سالین استریل(NaCl 0.9%) با دمای 38 درجه سانتی‌گراد که با آنتی‌بیوتیک ها (100 IU/ml پنی‌سیلین و 100µg/ml استرپتومایسین) مکمل شده بود به فاصله ی 3-1 ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. فولیکول‌های با قطر مناسب با استفاده از سوزن شماره 20 که به یک پمپ خلا متصل شده بود آسپیره شدند. کمپلکس‌های اووسیت-کومولوس (COC) توسط محیط شستشو(TCM-199-HEPES) که با 5% FBS، پنی‌سیلین و استرپتومایسین و 3-ایزو-1- متیل‌گزانتین (IBMX، 0.5 mM برای توقف میوز در حین دستکاری) مکمل شده بود جدا می‌شدند. IBMX سنتز آنزیمی که آدنوزین مونو فسفات حلقوی (cAMP) را تجزیه می‌کند، مهار می‌کند (3). در این آزمایش اووسیت‌های با سیتوپلاسم یکنواخت و روشن و واجد حداقل 4 لایه سلول‌های کومولوس متراکم استفاده شدند.

بلوغ برون‌تنی

COCهای انتخاب شده 4 بار با محیط شستشو اولیه و فاقد IBMX شسته می‌شدند و سپس برای بلوغ به پتری‌دیش پلاستیکی دارای قطره‌های 50µl محیط کشت که زیر روغن معدنی بودند منتقل می‌شدند و به مدت 26 ساعت در انکوباتور با دمای 38.5 درجه سانتی‌گراد، 5% CO_2 و 95% رطوبت منتقل می‌شدند. محیط کشت بلوغ مورد استفاده TCM-199 بود که با 10% FBS، FSH 0.5 µg/ml، LH 5 µg/ml، 1µg/ml استرادیول و پنی‌سیلین و استرپتومایسین مکمل شده بود.

ارزیابی بلوغ هسته‌ای

بعد از دوره‌ی بلوغ، اووسیت‌ها به صورت مکانیکی و به کمک پیپت از سلول‌های کومولوس جدا می‌شدند. بعد از آن اووسیت‌ها بین لام و لامل قرار می‌گرفتند و بمدت 48-24 ساعت در نسبت 3 به 1 از اتانول و اسید استیک قرار می‌گرفتند و در انتهای این دوره با اورسئین 1% رنگ‌آمیزی می‌شدند و برای تعیین مراحل بلوغ هسته‌ای، با میکروسکوپ اینورت با بزرگنمایی ×400 مشاهده می‌شدند.

طراحی آزمایش

غلظت‌های مختلف L-NAME (0و 0.1و 1 میلی‌مولار) برای ارزیابی تاثیر آن بر بلوغ هسته‌ای اووسیت‌های گوسفندی به محیط کشت بلوغ اضافه شد. چنین غلظت‌هایی توسط بو و همکاران (2003) و جابالونکا-شریف (2000) در موش استفاده شده است.

آنالیز آماری

نتایج اثر مهارکننده بر بلوغ اووسیت با استفاده از آزمون کای‌اسکوار ارزیابی شد و بدین منظور از نرم‌افزار SAS و رویه‌ی GENMOD استفاده گردید.

نتایج وبحث

در این مطالعه تاثیرات حاصل از کمبود نیتریک اکساید بر بلوغ برون‌تنی اووسیت گوسفند و به منظور تعیین اثر این پیامبر سلولی بر روی بلوغ اووسیت ارزیابی گردید. نتایج حاصله نشان داد که مهارکننده‌ی NOS در یک رفتار وابسته به دُز بلوغ میوزی و خروج اولین جسم قطبی را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد به طوریکه با افزایش دُز میزان تاثیر بیشتر بود (جدول 1). این نتایج، با مشاهدات و گزارشات مطالعات دیگری که در خوک(11)، موش صحرایی(5)، گاو(9) و موش(1) انجام شده است مطابقت دارد.

در مطالعات پیشین در گونه‌های مختلف مشخص شده بود که فعالیت NOS برای بلوغ میوزی اووسیت ضروری است (1، 2، 5، 9، 11). این آزمایش نیز تایید کرد که NOS برای بلوغ میوزی اووسیت گوسفند مهم است. همانطور که گفته شد آنزیم نیتریک اکساید سنتاز برای تولید نیتریک اکساید از ال-آرژنین و اکسیژن استفاده می‌کند. مهارکننده‌ی L-NAME آنالوگی از ال-آرژنین است و به عنوان یک مهار کننده‌ی رقابتی برای NOS عمل می‌کند. L-NAME بعنوان یک مهارکننده‌ی غیر اختصاصی، انتقال MI-MII را متوقف کرد. این مهارکننده تمامی ایزوفرم‌های NOS را مهار نموده و بلوغ میوزی اووسیت را در یک رفتار وابسته به دُز مهار می‌کند.

اگرچه برخی از مطالعات(4و 7) از اثرات سوء مهارکننده‌های NOS بر مورفولوژی اووسیت گزارش کرده اند، اما در این مطالعه چنین تاثیری مشاهده نشد که با برخی مطالعات دیگر (10) سازگار است. احتمالا اثر سوء مهارکننده‌ها بر مورفولوژی اووسیت در برخی از مطالعات به غلظت‌های بالای مهارکننده یا نوع مهارکننده (مثل AG) مربوط است. مشخص شده است که در بعضی از گونه‌ها عمل نیتریک اکساید از طریق cGMP میانجیگری می شود. در موش نشان داده شده است که NO به گوانیل سیکلاز متصل شده و آن را فعال می‌کند که منجر به افزایش cGMP می‌شود. cGMP نیز بوسیله‌ی فعال کردن فسفودی استراز (که وظیفه‌ی تجزیه‌ی cAMP را بر عهده دارد) میزان cAMP را کاهش می‌دهد که در نهایت منجر به ادامه‌ی بلوغ میوزی می‌شود(4). این مکانیسم بیشتر در جوندگان گزارش شده است و مکانیسم عمل نیتریک اکساید در اووسیت سایر پستانداران هنوز بخوبی مشخص نشده است.

به طور خلاصه، نتایج این مطالعه نظریه دخیل بودن فعالیت NOS در بلوغ میوزی اووسیت گوسفند را حمایت می کند و به نظر می‌رسد که نیتریک اکساید نقشی را در بلوغ اووسیت گوسفندی و پیشرفت MII ایفا می‌کند اما مکانیسم عمل دقیق آن نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

Nitric oxide synthase (NOS) inhibitor inhibits meiotic maturation of ovine oocyte in a dose-dependent manner

Mehdi Heidari amale[1], Ahmad Zareh Shahne[2], Abbas Abavisani[3], Salman Nasrollahi[1]
1,2. Department of animal science, university of Tehran 3. Department of veterinary medicine, Ferdowsi university of Mashhad

Abstract
Nitric oxide (NO) is generated by different isoforms of nitric oxide synthase (NOS) in mammalian cells. It has been demonstrated that nitric oxide is a mediator for meiotic maturation of oocyte in many mammalian. It seems that there is any report about the effect of NO on in vitro maturation of ovine oocyte. Therefore, this experiment was designed to study effects of NO deficiency on ovine oocyte maturation using different

concentrations of L-NAME as a NOS inhibitor (0, 0.1, 1 mM). The results indicated that L-NAME significantly inhibits the meiotic maturation and first polar body extrusion in a dose-dependent manner in ovine oocyte. Also, this study along with other compatible studies showed that NO/NOS system is essential for meiotic maturation of sheep oocyte.

Keywords: nitric oxide synthase, meiotic maturation, sheep oocyte

منابع

1) Bu, S., G. Xia, et al. (2003). "Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro." Mol Cell Endocrinol 207(1-2): 21-30.
2) Bu, S., H. Xie, et al. (2004). "Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways." Mol Cell Endocrinol 223(1-2): 85-93.
3) Eppig, J. J., Downs, S. m., (1984). "Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. " Bio.Reprod 30: 1-11
4) Jablonka-Shariff, A., LISA, M. (2000). "Nitric Oxide Is Essential for Optimal Meiotic Maturation of Murine Cumulus-Oocyte Complexes In Vitro. " Molecular reproduction and development 55: 412–421
5) Jablonka-Shariff, A., R. Basuray, et al. (1999). "Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats." J Soc Gynecol Investig 6(2): 95-101.
6) Jablonka-Shariff, A. and L. M. Olson (1998). "The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes." Endocrinology 139(6): 2944-54.
7) Matta, S. G., M. C. Caldas-Bussiere, et al. (2009). "Effect of inhibition of synthesis of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide by aminoguanidine on the in vitro maturation of oocyte-cumulus complexes of cattle." Anim Reprod Sci 111(2-4): 189-201.
8) Pires, P. R., N. P. Santos, et al. (2009). "Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes of cattle." Anim Reprod Sci 116(3-4): 233-43.
9) Schwarz, K. R. L., Pires, P. R. L., de Bem, T. H. C., Adona, P. R., Leal, C. L. V. (2010). "Consequences of nitric oxide synthase inhibition during bovine oocyte maturation and meiosis and embryo development. "Anim Reprod Sci 45: 75-80
10) Sengoku, K., N. Takuma, et al. (2001). "Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro." Mol Reprod Dev 58(3): 262-8.
11) Tao, Y., Z. Fu, et al. (2004). "Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation." Mol Cell Endocrinol 222(1-2): 93-103.
12) Tao, Y., H. Xie, et al. (2005). "Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation." Zygote 13(1): 1-9.
13) Viana, K. S., M. C. Caldas-Bussiere, et al. (2007). "Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the in vitro maturation of bovine oocytes." Anim Reprod Sci 102(3-4): 217-27.

جدول1. تاثیر غلظت‌های مختلف L-NAME بر روی پیشرفت بلوغ میوزی اووسیت گوسفند

تیمار(L-NAME)	تعداد اووسیت	مرحله‌ی بلوغ هسته‌ای	
		% متافاز I	%متافاز II
کنترل	157	24/84 ±0/24	75/16±0/18[a]
0/1 mM	127	36/22 ± 0/21	63/78 ± 0/18[b]
1 mM	140	59/28± 0/18	40/72 ± 0/17[c]

- حروف متفاوت بیانگر معنی‌دار بودن نتایج است ($p < 0.05$)