انجماد و ذوب به طریقهٔ CPS

در این روش، نی OPS به ترتیب با ۲ میلی‌متر محیط انجمادی، ۲ میلی‌متر هوا، ۲ میلی‌متر محیط انجمادی حاوی جنین، ۲ میلی‌متر هوا و ۲ میلی‌متر محیط انجمادی پر شده (شکل 1c) و به سرعت وارد تانک نیتروژن مایع شد. برای ذوب، انتهای نی توسط انگشت نشانه بسته شده و محتوی نی در ۴۰۰ میکرو لیتر محلول سوکروز ۰/۵ مولار قرارگرفت، سپس مراحل ذوب و انکوباسیون انجام شد و جنینها به مدت ۱۲۰ ساعت مطالعه شدند (۱۰).

مطالعه جنینها

در گروه کنترل، بلافاصله پس از به دست آوردن جنینهای دو سلولی، جنینهای با ظاهر طبیعی را در محیط کشت HTF در داخل انکوباتور با ۵ درصد CO_2 کشت داده و هر ۲۴ ساعت از مراحل تکوین جنینها و تعدادجنینهای دژنره گزارش تهیه شد.

در گروههای انجمادی، پس از انجماد و ذوب جنینها، آنها را چندین بار در محیط کشت شستشو داده، سپس توسط میکروسکوپ معکوس جنینهای زنده مشخص و کشت شد. هر ۲۴ ساعت از مراحل تکوین آنها گزارش تهیه شد.

جنینهای دارای غشاء پلاسمایی، لایه زونا و بلاستومرهای سالم با سیتوپلاسم انکساری، زنده تلقی شدند.

در تمام موارد از تست χ^2 به عنوان آزمون آماری استفاده شد و سطح معنی‌دار بودن P<۰/۰۵ درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

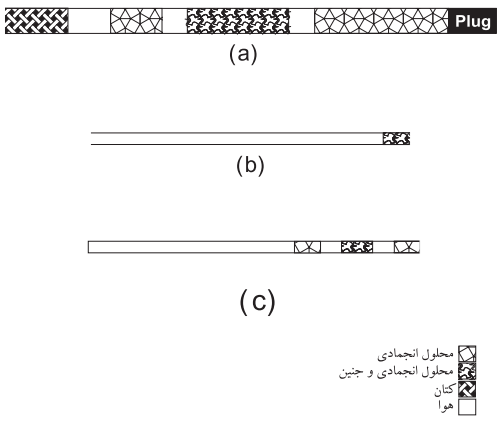
اثر انجماد بر میزان بقا جنینها

در این مطالعه تعداد ۱۹۴ جنین دو سلولی در گروه کنترل و ۴۶۵ جنین دو سلولی با روشهای مختلف منجمد شدند، C (۱۶۰)، OPS (۱۵۰) و CPS (۱۵۵). نتایج نشان داد که در گروه CPS درصد بقا جنینها پس از ذوب (۷۶ درصد) به طور معنی‌داری بیشتر از C (۶۶درصد)، (P<۰/۰۵) و OPS (۶۲درصد)، (P<۰/۰۱) بود. گروه انجمادی C و OPS اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (نمودار ۱).

اثر انجماد بر میزان تکوین جنینها

*** ۲۴ ساعت اول کشت**

میزان کلیواژ به مرحله ۸-۴ سلولی در گروه کنترل با گروههای OPS, C و CPS تقریبا یکسان بود. اما میزان تکوین به مورولا در گروههای مختلف انجمادی به طور معنی‌داری پایین‌تر از کنترل بود، به ترتیب (۰درصد، ۰درصد، ۰درصد در مقابل ۵درصد) تعداد جنینهای دژنره نیز در گروههای انجمادی C (۲۲درصد) و OPS (۲۳درصد) به طور معنی‌داری بیشتر ازکنترل (۱۱درصد) بود، به ترتیب (p<۰/۰۵) و (p<۰/۰۱). گروهCPS اختلاف معنی‌داری با کنترل نداشت.



شکل ۱: a: طریقهٔ پر کردن نی انجماد به روش معمولی، b: طریقهٔ پر کردن نی انجماد به روش OPS (نی گشیدهٔ باز)، c: طریقهٔ پر کردن نی انجماد به روش CPS (نی کشیدهٔ بسته).

جدول ۱: مقایسه تکوین جنینهای دو سلولی پس از به کار گیری روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای (C، OPS، CPS) و ۱۲۰ ساعت کشت

تیمار	تعداد	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۹۶ تا ۱۲۰ ساعت			۹۶ تا ۱۲۰ ساعت
		۴ تا ۸ سلولی	مورولا	مورولا و بلاستوسیست اولیه	بلاستوسیست انتهایی	بلاستوسیست انتهایی	بلاستوسیست وسیع شده	بلاستوسیست در حال خروج از زونا	بلاستوسیست خارج شده از زونا
کنترل	۱۹۴ (٪)	۱۶۳ (۸۴)	۹ (۵)	۱۵۰ (۷۷)	۱۵ (۸)	۱۳ (۷)	۹۷ (۵۰)	۴۴ (۲۳)	۱۴۰ (۷۲)
C	۱۰۵ (٪)	۸۲ (۷۸)	۰ (۰)^{a}	۷۴ (۷۰)	۱ (۱)^{a}	۲۷ (۲۶)^{b}	۳۴ (۳۲)^{b}	۱۲ (۱۱)^{a}	۶۱ (۵۸)^{a}
OPS	۹۶ (٪)	۷۴ (۷۷)	۰ (۰)^{a}	۶۲ (۶۵)^{a}	۱ (۱)^{a}	۱۵ (۱۶)^{a}	۳۵ (۳۶/۵)^{a}	۱۱ (۱۱)^{a}	۵۳ (۵۵)^{b}
CPS	۱۱۴ (٪)	۹۵ (۸۳)	۰ (۰)^{a}	۸۰ (۷۰)	۳ (۳)	۱۷ (۱۵)^{c}	۴۳ (۳۸)^{a}	۱۷ (۱۵)	۷۳ (۶۴)

C: انجماد با روش معمولی، OPS: انجماد با روش نی کشیده باز، CPS: انجماد با روش نی کشیده بسته، a: مقایسه C، OPS، CPS با کنترل؛ P<۰/۰۵، b: مقایسه C، OPS، CPS با کنترل: P<۰/۰۱، c: مقایسه CPS با C: P<۰/۰۵.

* پس از ۴۸ ساعت کشت

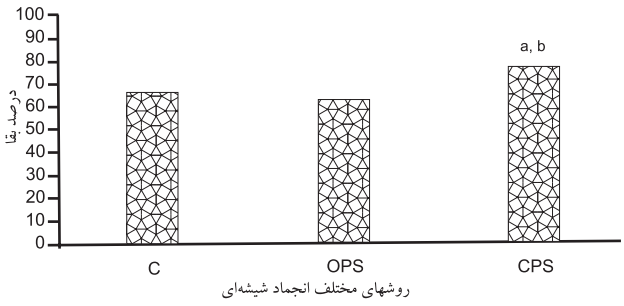
درصد جنینهای مرحله مورولا و بلاستوسیست اولیه، تنها درگروه OPS (۶۵درصد) به طور معنی داری کمتر از کنترل بود (P<۰/۰۵). درصد جنینهایی که به مرحله بلاستوسیست انتهایی رسیده بودند در گروههای C (۱درصد) و OPS (۱درصد) به طور معنی‌داری کمتر از کنترل (۸درصد) بود (P<۰/۰۵). در گروهCPS اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد. تعداد جنینهای دژنره در گروهOPS (۱۱/۵درصد) و CPS (۱۰/۵درصد) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل (۵ درصد) بود.

* پس از ۷۲ ساعت کشت

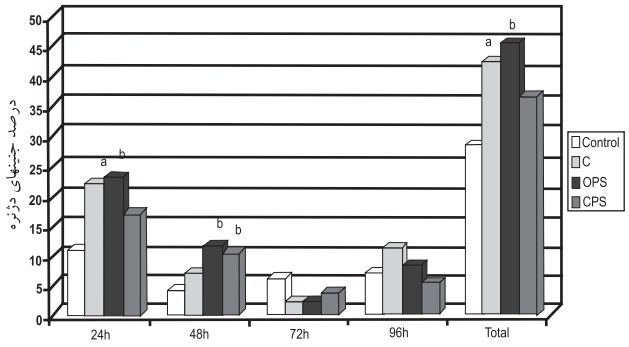
درصد جنینهای مرحله بلاستوسیست انتهایی در گروههای انجمادی C (۲۶درصد)، OPS (۱۶درصد) و CPS (۱۵درصد) به طور معنی‌داری بیشتر از کنترل (۷درصد) بود، به ترتیب (P<۰/۰۱)، (P<۰/۰۵) و (P<۰/۰۵) که نشان دهنده تاخیر در رشد جنینهای منجمد شده بود.

مقایسه گروههای انجمادی با یکدیگر نشان داد، درصد بلاستوسیستهای انتهایی در گروه CPS به طور معنی‌داری کمتر از C بود (۱۵درصد در برابر ۲۶درصد، P<۰/۰۵). بلاستوسیستهای وسیع شده در گروههای انجمادی C (۳۲درصد)، OPS (۳۶/۵درصد) و CPS (۳۸درصد) به طور معنی‌داری از کنترل (۵۰درصد) کمتر بود، به ترتیب (P<۰/۰۱)، (P<۰/۰۵) و (P<۰/۰۵). تعداد بلاستوسیستهای در حال خروج از زونا (Hatching) درگروههایC و OPS به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود (۱۱درصد و ۱۱درصد در برابر ۲۳درصد، P<۰/۰۵)، اما گروه CPS (۱۵درصد) اختلاف معنی‌داری با کنترل نداشت.

تعداد جنینهای دژنره در هیچ کدام از گروههای انجمادی اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشت.



نمودار ۱: مقایسهٔ درصد بقاء جنینهای دو سلولی موش پس از به کار گیری روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای (C، OPS، CPS). C: انجماد شیشه‌ای با روش معمولی، OPS: انجماد شیشه‌ای با روش نی کشیدهٔ باز، CPS: انجماد شیشه‌ای با روش نی کشیدهٔ بسته. a: مقایسهٔ CPS و C؛ P<۰/۰۵. b: مقایسهٔ CPS، OPS؛ P<۰/۰۱



نمودار ۲: مقایسهٔ روزانهٔ درصد جنینهای دژنرهٔ موش پس از به کار گیری روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای (C، OPS، CPS). C: انجماد شیشه‌ای با روش معمولی، OPS: انجماد شیشه‌ای با روش نی کشیدهٔ باز، CPS: انجماد شیشه‌ای با روش نی کشیدهٔ بسته. a: مقایسهٔ C، OPS، CPS با کنترل؛ P<۰/۰۵. b: مقایسهٔ C، OPS، CPS، OPS با کنترل P<۰/۰۱.

* پس از ۹۶ تا ۱۲۰ ساعت کشت

تعداد بلاستوسیستهای خارج شده از زونا در گروههای C (۵۸درصد) و OPS (۵۵درصد) به طورمعنی‌داری از گروه کنترل (۷۲درصد) کمتر بود، به ترتیب (P<۰/۰۵) و (P<۰/۰۱). اما گروه CPS (۶۴درصد) اختلاف معنی‌داری با کنترل نداشت. تعداد جنینهای دژنره نیز در هیچ کدام از روشهای انجمادی اختلاف معنی داری با گروه کنترل نداشت. پس از ۱۲۰ ساعت کشت تعداد کل جنینهای دژنره در گروه C (۴۲درصد)، OPS (۴۵درصد) بیشتر از کنترل (۲۸درصد) بود، به ترتیب (P<۰/۰۵) و (P<۰/۰۱) اما گروهCPS (۳۶درصد) اختلاف معنی‌داری با کنترل نداشت (جدول ۱، نمودار ۲).

بحث

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که درصد بقاء جنینهای دوسلولی پس از فرآیند انجماد شیشه‌ای در روش CPS بیشتر از نی معمولی و OPS است.

نتایج این پژوهش با یافته‌های Chen مطابق است. Chen اثر روشهای مختلف انجماد شیشه‌ای را بربقاء تخمکهای موش بررسی و گزارش کرد که شانس بقاء تخمکهای موش در روش CPS (۷۹درصد) و نی معمولی (۷۷درصد) بیشتر ازروش OPS (۶۷درصد) و استفاده از گریدهای میکروسکوپ الکترونی (۳۴درصد) است (۱۰).

Lopez جنینهای مرحله مورولا و مراحل مختلف بلاستوسیست خرگوش را با استفاده از روشی مشابه CPS با مخلوطی از ۲۵درصد گلیسرول و۲۵درصد اتیلن گلیکول منجمد کرد. نتایج، میزان بالاتر بقاء را در روش CPS (۸۸/۲درصد) نسبت به نی معمولی(۷۸/۸درصد) نشان داد که شبیه نتایج ما است. همچنین بلاستوسیستهای خرگوش که با روشCPS منجمد شدند میزان مشابهی از تکوین *In vivo* را پس

از ذوب نسبت به جنینهای کنترل نشان دادند (۱۱).

Kong در مطالعه ای انجماد شیشه‌ای بلاستوسیستهای موش به روش OPS را با میکروپیپت شیشه ای مقایسه کرد و نشان داد که میزان بقاء در روش OPS (۹۳/۵درصد) و روش میکروپیپت شیشه‌ای (۹۵درصد) تفاوت معنی‌داری ندارد. میزان بلاستوسیست در حال خروج از زونا نیز به ترتیب۸۸/۷درصد و ۹۳/۵درصد بود که تفاوت معنی‌داری نداشت اما به طور معنی‌داری از کنترل کمتر بود (۱۲). درصد بالاتر بقاء گزارش شده در این مطالعه نسبت به مطالعه ما احتمالا به مرحله جنینی به کار رفته است. زیرا مطا لعات زیادی نشان داده که انجماد جنین در مرحله بلاستوسیست میزان بالاتری بقاء وتکوین را نسبت به انجماد جنین در مراحل دیگر ایجاد می کند (۱۱، ۱۳).

در این مطالعه، بررسی تکوین جنینها در محیط کشت پس از عمل انجماد و ذوب نشان می‌دهد که در روش CPS تعداد بلاستوسیستهای در حال خروج از زونا و تعداد جنینهای دژنره پس از ۱۲۰ ساعت کشت اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل ندارد. اما در روشهای Ops و نی معمولی تعداد بلاستوسیستهای در حال خروج از زونا به طور معنی داری کمتر از کنترل و تعداد جنینهای دژنره بیشتر از گروه کنترل است. همچنین بررسی جدول۱ نشان میدهد که سرعت تکوین جنینها کمتر از کنترل است اما در روش Cps در اغلب موارد اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل دیده نمی‌شود. علل نتایج فوق را می توان به مزیت نی‌های کشیده شده نسبت داد. اولا: این نی‌ها به علت قطر کم، میزان محلول انجمادی کمتری را جذب می کنند. ثانیا: دیواره‌های آن نسبت به نی‌های معمولی نازکتر است، بنابراین از سرعت سرد شدن (۲۰/۰۰۰°C/min) و گرم شدن (۱۸۰/۰۰۰°C/min) بیشتری نسبت به نی معمولی برخوردارند(۲۵۰۰ °C /min). از طرفی به دلیل سرعت بالای سرد وگرم شدن، عبور از منطقه آسیب حرارتی که بین ۱۵ تا ۱۵- درجه سانتی‌گراد است، خیلی سریعتر صورت می‌گیرد. بنابراین میزان آسیب سرمایی که گزارش شده در جنینهای قبل از مورولا بسیار زیاد است، به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (۱۴، ۱۵). احتمالا درصد پایین‌تر بقاء وتکوین جنین در روش OPS نسبت به CPS به علت تماس مستقیم جنین با نیتروژن مایع باشد که یک اثر منفی بر جنین دارد.

از آنجا که آسیب به جنین طی انجماد علاوه بر نوع نی وروش پر کردن آن، بستگی به عوامل مختلفی از جمله نوع ضد یخ به کار رفته، غلظت ضدیخ، مدت زمان و دمای در معرض قرارگیری، دمای انجماد و روش آبدهی دارد (۱۶). در این مطالعه سعی شد، شرایط انجماد برای هر سه روش انجمادی یکسان باشد و فقط تغییرات نوع نی ونحوه پر کردن آن بررسی شود. علایمی از قبیل شکستگی در زونا و جنین پس از ذوب مشاهده نشد که موافق با گزارشاتی است که انجماد شیشه‌ای آسیب و شکستگی در زونا ایجاد نمی کند (۱۷).

در این مطالعه از اتیلین گلیکول به عنوان ضدیخ استفاده شده است. میزان درصد بقاء جنینها در این مطالعه در مقایسه با برخی مطالعاتی که در آنها از یک ضد یخ دیگرعلاوه بر اتیلن گلیکول استفاده شده (۲، ۱۸، ۱۹) یا ترکیبات دیگر ضد یخ به کار رفته (۴، ۶) پایین‌تر است، اما درصد تکوین جنینها تا مرحله بلاستوسیست بالاتر است. این مسأله احتمالا به خواص شیمیایی ضد یخ به کار رفته مربوط می شود. اتیلن گلیکول به علت وزن مولکولی پایین نفوذپذیری سریعی دارد، بنابراین به هنگام ذوب به سرعت ازسلولها خارج شده و عوارض کمتری بر تکوین جنین می گذارد. نتایج این پژوهش حاکی از آن است که در روش CPS درصد بقاء و تکوین جنینها به مرحله بلاستوسیست در حال خروج از زونا بیشتر از نی معمولی وOPS است، بنابراین به نظر می رسد روشCPS یک راه ساده، مناسب و ارزان برای انجمادجنین دوسلولی موش باشد. روش CPS می‌تواند به عنوان گزینه‌ای جدید برای انجماد جنین انسان نیز در نظر گرفته شود. البته لازم به ذکر است که برای استفاده از این روش در جنین انسان باید اثرات تخریبی و تغییرات ژنتیکی احتمالی به دقت مورد بررسی قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده رویان و دانشگاه آزاد اسلامی به شمارۀ۱۱۸۶/p/۸۱ است و محل اجرای آن در بخش تحقیقات پژوهشکدۀ رویان بوده است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مساعدتهای صمیمانۀ مسئولین محترم پژوهشکدۀ رویان ابراز می‌دارند.

References

1. Rall WF, Fahy GM: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196°C by vitrification. Nature (London) 1984; 313: 573-575

2. Kasai M, Niwa K, Iritani A: Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. J Reprod Fert 1981; 63:175-180

3. Nowshahri MA, Brem GJ: Effects of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos. Hum Reprod 2001; 15(11): 2368-2373

4. Nematollahi N, Rezazadeh Valogerdi M: Effect of Vero cell coculture on the development of frozen-thawed two-cell mouse embryos. J Assi Reprod Gen 1999; 16(7): 380-384

5. Ali J , Shelton JN: Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. J Reprod Fert 1993; 99: 471-477

6. Leibo SP, McGrath JJ, Cravalho RG: Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized

mouse ova as a function of cooling rate. Cryobiology 1978; 15: 257-271
7. Martino A, Songsasen N, Leibo SP: Development in to blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. Biol Reprod 1996; 54: 1059-1069
8. Vajta G, Holm P, Kuwayame M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callensen H: Open pulled straw (OPS) vitrification;a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol Reprod Dev 1998; 51: 53-58
9. Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chao KH, HO HN, Yang YS: Open pulled straw for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. Hum Reprod 2000; 15: 2598-2603
10. Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN ,Yang YS: Vitrification of oocytes using closed pulled straws(CPS) achives a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles,compared with conventional straws, open pulled straws(OPS) and grids. Hum Reprod 2001; 16: 2350-2356
11. Lopez BM,Lopez MF: Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. Theriogenology 2002;58(8):1541-1552
12.Kong IK,Lee SI,Cho SG,Cho SK,Park CS: Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. Theriogenology 2000; 53(9): 1817-1826
13. Lopatarova M, Cech S, Havlicek V, Holy L: Effect of vitrification in open pulled straws on survival of bovine embryos from superovulated cows. Acta Vet Brno 2002; 71: 93-99
14. Rall WF, Meyer TK: Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. Theriogenology 1989; 31: 683-692
15. Kasai M, Zhu SE, Pedre PB, Nakamura K, Sakuri T, Edashige K: Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. Cryobiol 1996; 33: 459-464
16. O'Neil L, Paynter SJ, Fuller BJ, Shaw RW: Murine oocyte cytoskeletal changes, fertilization and embryonic development following exposure to a vitrification solution. Cryo-Lett 1997; 18: 17-26
17. Kasai M: Principles of the cryopreservation of mammalian embryos by vitrification. Reproductive Biology Update, Out Print 1998; 414-424
18. Rezazadeh Valojerdi M, Movahedin M, Hosseini A: Improvement of development of vitrified two-cell mouse embryos by vero cell coculture. J Assi Reprod Gen 2001;19: 31-38
19. Nowshari MA, Nayuda PI, Hodges JK: Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of rapid thawed pronuclear stage mouse embryos. Theriogenology 1998; 50(7): 1001-1013

اثرهورمون های استروئیدی جنسی (۱۷ بتا استرادیول و ۵- آلفا دی هیدرو تستوسترون) بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی رت تحریک شده با TGF-β

کاظم احمدی Ph.D.[☆♦]، قاسم سلگی M.Sc.[☆]

☆دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

♦ آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۵۴۶-۱۹۹۴۵، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

پست الکترونیک: Email: kahmadi@bmsu.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۹/۲۴، پذیرش مقاله: ۸۳/۵/۶

* **هدف:** بررسی اثر ۱۷- بتااسترادیول و ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی تحریک شده با TGF-β

* **مواد و روشها:** ماکروفاژهای ریوی با روش لاواژ ریه از رت های نرسالم با سن ۱۰-۸ هفته به دست آمد. ماکروفاژهای ریوی به تعداد 1×10^{5} در یک میلی‌لیتر محیط کشت RPMI۱۶۴۰ بدون فنل رد حاوی ۱۰درصد FCS به هر چاهک پلیت ۲۴ خانه اضافه و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. پس از مدت مذکور، سلولهای غیر چسبیده (غیر ماکروفاژ) با سه بار شستشو خارج و مجددا یک میلی‌لیتر محیط کشت کامل بدون فنل رد، حاوی LPS 10μg/ml و IFN-γ100u/mlو غلظتهای مختلف هورمونهای ۱۷- بتا استرادیول و یا ۵- آلفا دی‌هیدروتستوسترون در حضور یا غیاب TGF-β را به هر چاهک افزوده و انکوباسیون در شرایط فوق به مدت ۲۴ ساعت دیگر ادامه یافت. سپس مایع رویی را برداشته و پس از سانتریفوژ ، مقدار نیتریت موجود در محلول رویی به عنوان اندیکاتوری از نیتریک اکساید به روش گریس اندازه‌گیری شد.

* **یافته ها:** نتایج نشان داد که ترشح نیتریک اکساید در پاسخ به ۵- آلفا دی‌هیدروتستوسترون و در حضور TGF-β کاهش یافته و حداقل و حداکثر کاهش به ترتیب در پاسخ به 1×10^{-10} و 1×10^{-6} مولار به دست آمد. همچنین نتایج نشان داد که این اثر کاهشی TGF-β بر ترشح نیتریک اکساید در پاسخ به هورمون ۱۷- بتا استرادیول بیشتر نمایان بوده به طوری که حداقل ۳۴/۵۲درصد و حداکثر ۶۸/۵۷درصد به ترتیب در پاسخ به 1×10^{-11} و 1×10^{-6} مولار به دست آمد.

* **نتیجه گیری:** به نظر می‌رسد که قسمتی از روند التهاب ریوی که وابسته به TGF-β است احتمالا از طریق نیتریک اکساید اعمال شده و هورمونهای جنسی نیز می‌تواند در این حالت دخیل باشند.

کلید واژگان: ماکروفاژهای ریوی، نیتریک اکساید، ۱۷- بتااستردیول، ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، تابستان ۸۳، شمارهٔ ۲۲، صفحات ۸۰-۷۵

مقدمه

ماکروفاژهای ریوی با ترشح مواد پیش التهابی، مولکولهای تنظیم کننده ایمنی، پردازش آنتی‌ژن، تجمع فیبرین، فاگوسیتوز، ترشح مواد وابسته به اکسیژن نظیر سوپر اکساید (۱) و نیتروژن (نیتریک اکساید) (۲، ۳) نقش مهمی را در دفاع میزبان به عهده دارد. نیتریک اکساید علاوه بر دفاع غیر اختصاصی علیه پاتوژنهای استنشاقی، نقش مهمی در آسیب ریوی نیز به عهده دارد (۴). به منظور سنتز و ترشح نیتریک اکساید، آرژنین به عنوان سوبسترا برای آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز مورد نیاز است. فعالیت این آنزیم در ماکروفاژها و سلولهای ایمنی وابسته به تحریک با ماده محرکی مثل LPS وIFN-γ (۵) است. از طرفی علاوه بر نقشی که نیتریک اکساید در دفاع میزبان دارد، افزایش ترشح آن ممکن است منجر به گشادی عروق، ادم و سایتوتوکسیسیتی شده و احتمالا مسئول فرایند اعمال سایتوکاین ها درریه باشد (۶). شواهد موجود نشان می‌دهند که آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز در سلولهای اپی تلیال و ماکروفاژهای افراد سالم بروز نیافته ولی در افراد آسمی احتمالا تحت تاثیر سایتوکاین ها بروز می‌یابد (۷، ۸). در این رابطه IL-4 اولین سایتوکاینی است که نقش آن در مکانیسم تنظیم نیتریک اکساید شناخته شد (۹). با تثبیت اینکه ماکروفاژها اگر قبل از تحریک با LPS وIFN-γ در معرض IL-4 قرار گیرند، قادر به کشتن انگل لیشمانیا نیستند، نقش مهاری IL-4 بیشتر مشخص گردید (۱۰، ۱۱). همچنین مطالعات نشان داده اند که TGF-β اثر مهاری بر ترشح نیتریک اکساید داشته (۱۲) در حالی که فاکتور مهار کننده مهاجرت (MIF) اثر افزایشی بر ترشح آن دارد

(۱۳). مطالعات نشان داده که چنانچه ماکروفاژها بطور توام در معرض rMIF و IL-10 قرار گیرند، IL-10 باعث توقف اثر کشندگی rMIF بر انگل لیشمانیای داخل منوسیت های انسانی شده و باعث توقف ترشح نیتریک اکساید می‌شود (۱۴). مطالعات دیگر نشان داده که هورمونهای استروئیدی جنسی نیز در حالت وابسته به دوز، ترشح نیتریک اکساید و همچنین سایتوکاینهای واسطه را در هر دو جنس نر و ماده تنظیم می‌کنند (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰).

Moncada نیز (۲۱) گزارش نمود که نیتریک اکساید در بیماریهای التهابی نقش داشته و افزایش مقدار نیتریت در مایع سینوویال و سرم بیماران روماتوئیدی تایید شده است (۲۲). به نظر می‌رسد که عمل نیتریک اکساید در این فرایند وابسته به نقش آن در مکانیسم های سایتوتوکسیک ماکروفاژهای فعال شده و اثرات ضد تکثیر سلولی آن باشد.

هدف از این تحقیق، این بود که بدانیم آیا ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی در پاسخ به هورمونهای جنس‌ی استرویید‌ی در حضور یا غیاب TGF-β تغییر می‌یابد؟

مواد و روشها

ماکروفاژهای ریوی با روش لاواژ ریه به دست آمد. برای این کار حیوان به وسیله ماده بیهوش کننده کشته و ۱۰ میلی‌لیتر PBS سرد از طریق نای به داخل ریه تزریق شد. پس از آسپیره کردن مایع حاوی سلول، نمونه ها با دور g ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب سلولی به این طریق سه مرتبه شستشو داده شد. پس از شمارش ماکروفاژها، سوسپانسیون سلولی به تعداد 1×10^{5} ماکروفاژ در میلی‌لیتر محلول متشکل از محیط RPMI ۱۶۴۰ بدون فنل رد و حاوی ۱۰ درصد FCS و ۱۶mg/ml پنی‌سیلین به حجم یک میلی‌لیتر به هر چاهک پلیت ۲۴ خانه اضافه گردید.

سلولها به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و۵درصد CO_2 در هوا انکوبه شده و پس از آن مایع رویی را برداشته و سه بار با PBS گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد شستشو داده تا سلولهای غیر ماکروفاژی از پلیت برداشته شود. مقدار یک میلی‌لیتر RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد FCS، مقدار کافی آنتی بیوتیک و LPS ۱۰μg /ml (۱۴) و IFN-γ۱۰۰U/ml به هر چاهک افزوده گردید. به منظور به دست آوردن غلظت مناسب TGF-β مورد استفاده ابتدا آزمایش در حضور غلظتهای مختلف TGF-βانجام گرفت. پس از به دست آوردن غلظت مناسب TGF-β در آزمایشات بعدی محیط کشت کامل RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰درصد FCS مقدار کافی آنتی‌بیوتیک و LPS ۱۰μg /ml (۱۴) و IFN-γ۱۰۰U/ml و ۱۷- بتا استرادیول و یا ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون با غلظتهای 1×10^{-6} الی 1×10^{-12} مولاردر حضور یا غیاب ۱۰۰ واحد TGF-β به هر چاهک اضافه و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت مجددا در شرایط فوق انکوبه شدند .سپس مایع رویی را برداشته و پس از سانتریفوژ نمودن مقدار نیتریت به عنوان اندیکاتوری از نیتریک اکساید با روش گریس (۲۳) اندازه‌گیری شد. بدین منظور مقدار ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی به علاوه ۵۰ میکرولیتر از محلول گریس (سولفانیل آمید ۱درصد در اسید فسفریک ۲/۵ درصد، N – نفتیل‌اتیل‌دی آمین دی هیدرو کلراید ۰/۱ درصد) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار گرفت. میزان جذب نوری به وسیله دستگاه الایزا ریدر (Multiskan) در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. غلظت نیتریت موجود در مایع رویی، پس از رسم منحنی استاندارد مربوط به غلظت های مختلف نیتریت سدیم، محاسبه شد (۲۳).

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و روش آماری Npar Test (Mann-Whitney) تجزیه وتحلیل آماری شد.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که TGF-β اثر کاهشی بر ترشح نیتریک اکساید داشته و حداکثر کاهش در پاسخ به TGF-β ۱۶۰ U/ml به دست آمد (نمودار ۱) لذا پس از سه بار تکرار آزمایش غلظت مناسب (اپتیمم) ۱۰۰ واحد در آزمایشات بعدی استفاده گردید. همچنین مشخص شد که ۱۷- بتا استرادیول رهایش نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی را کاهش داده به طوری که حداقل و حداکثر کاهش به ترتیب در پاسخ به 1×10^{-10} و 1×10^{-6} مولار ایجاد شد ($p<0.05$) (نمودار ۲). این کاهش در حضور ۱۰۰ واحد TGF-β بیشتر بود ($p<0.05$) (نمودار ۳، جدول ۱). به طور مثال جدول یک نشان می‌دهد که مقدار نیتریک اکساید در پاسخ به ۱۰۰ واحد TGF-β به مقدار ۳۰/۹۵ درصد کاهش و در حضور ۱ نانومولار ۱۷ بتا استرادیول ۱۲/۸۵ درصد کاهش داشته است.

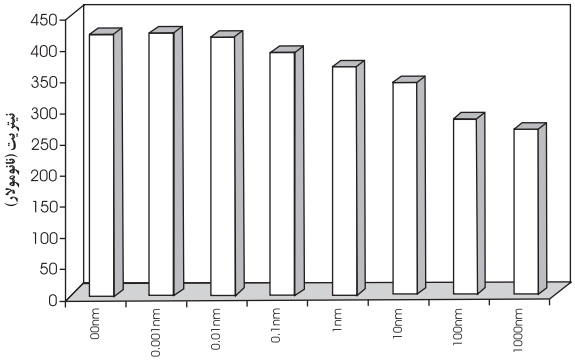
جدول ۱: کاهش ترشح نیتریک اکساید (بر حسب درصد) تحت غلظتهای مختلف هورمون ۱۷ – بتا استرادیول تنها یا استفاده توام از ۱۰۰ واحد TGF-beta و غلظتهای مختلف هورمون ۱۷ – بتا استرادیول

غلظت هورمون بر حسب مولار	کاهش ٪	
	۱۷- بتا استرادیول (فقط)	۱۷- بتا استرادیول و TGF-beta (توام)
1×10^{-12}	۰۰	۳۰/۹۵
1×10^{-11}	۱/۱۹	۳۴/۵۲
1×10^{-10}	۷/۱۴	۴۰
1×10^{-9}	۱۲/۸۵	۴۳/۸۰
1×10^{-8}	۱۹/۰۴	۵۰/۷
1×10^{-7}	۳۲/۸۵	۶۴/۲۸
1×10^{-6}	۳۶/۹۰	۶۸/۵۷

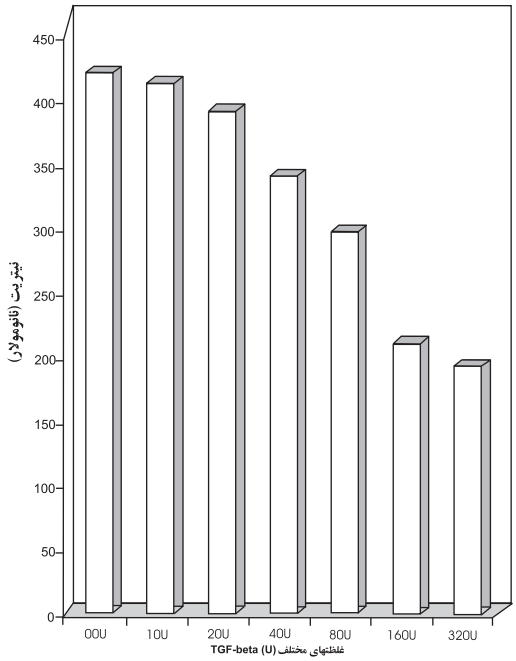
جدول ۲: افزایش ترشح نیتریک اکساید (بر حسب درصد) تحت غلظتهای مختلف هورمون ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون تنها یا استفاده توام از ۱۰۰ واحد TGF-beta و علظتهای مختلف هورمون ۵ – آلفا دی هیدروتستوسترون

غلظت هورمون بر حسب مولار	افزایش ٪	
	۵- آلفا دی هیدروتستوسترون (فقط)	۵- آلفا دی هیدروتستوسترون و TGF-beta (توام)
۱×۱۰^{-۱۲}	۴/۲۸	(کاهش) ۲/۸۵
۱×۱۰^{-۱۱}	۷/۱۴	۰۰
۱×۱۰^{-۱۰}	۱۶/۶۶	۴/۷۶
۱×۱۰^{-۹}	۳۸/۰۹	۲۸/۵۷
۱×۱۰^{-۸}	۵۲/۳۸	۴۰/۴۷
۱×۱۰^{-۷}	۷۸/۰۹	۶۶/۶۶
۱×۱۰^{-۶}	۹۱/۶۶	۸۵/۷۱

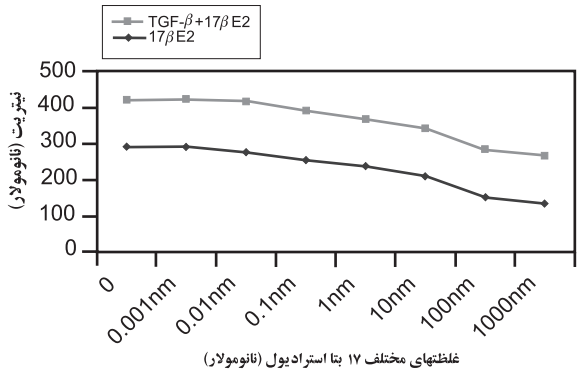
در حالی که وقتی این دو به صورت توام استفاده شد مقدار کاهش به ۴۳/۸درصد رسیده است. نتایج حاصل از اثر ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون نشان داد که TGF-β اثر افزایشی هورمون فوق را در رهایش نیتریک اکساید کاهش داده است (نمودار ۴، ۵، ۶). حداقل و حداکثر کاهش به ترتیب در پاسخ به ۱×۱۰^{-۱۰} و ۱×۱۰^{-۶} مولار هورمون مردانه ایجاد شد ($P<0.02$). جدول ۲ اثر افزایشی۵- آلفا دی هیدروتستوسترون را در حضور یا غیاب TGF-β به صورت درصد نشان می‌دهد. به طور مثال ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون در غلظت ۱×۱۰^{-۱۲} مولار افزایش ۴/۲۸ درصدی را در ترشح نیتریک اکساید داشته و در همین غلظت در حضورTGF-β کاهش ۲/۸۵ درصد را داشته است (جدول ۲).



نمودار ۲: اثر ۱۷ – بتا استرادیول بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی

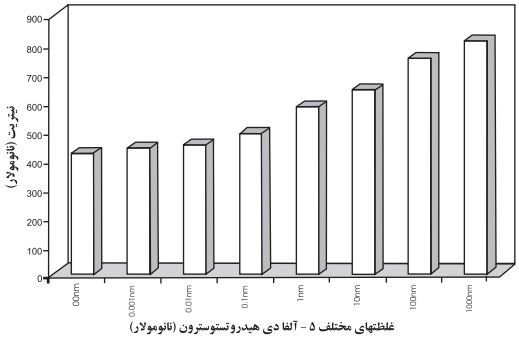


نمودار ۱: اثر TGF-β بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی

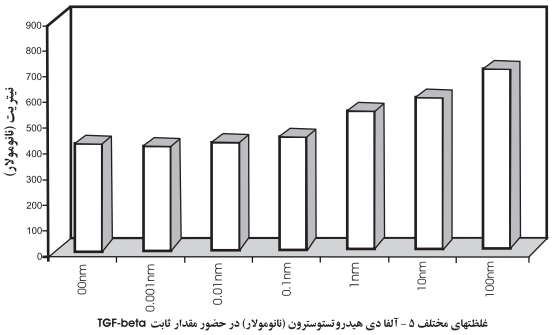


نمودار۳: اثر غلظتهای مختلف ۱۷ بتا استرادیول بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی در حضور یا عدم حضور مقدار ثابت TGF-β

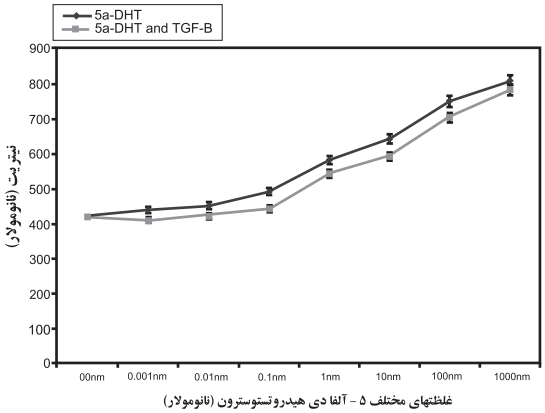
در حالی که در حضور TGF-β تنها، کاهش برابر با ۳۰/۹۵درصد بوده است. در غلظت ۱×۱۰^{-۱۱} مولار اثر افزایشی ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون و اثر مهاری TGF-β برابری کرده و تغییری در سطح نیتریک اکساید مشاهده نمی‌شود (جدول ۲).



نمودار ۴: اثر ۵ – آلفا دی هیدروتستوسترون بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی



نمودار ۵: TGF-beta باعث کاهش اثر ۵ – آلفا دی هیدروتستوسترون بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی شد



نمودار ۶: اثر ۵ – آلفا دی هیدروتستوسترون بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی در حضور یا عدم حضور مقدار ثابت TGF-beta

بحث

مطالعات قبلی نشان داده که ۱۷- بتا استرادیول باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی می‌شود در حالی که۵- آلفا دی هیدروتستوسترون باعث افزایش ترشح آن می‌گردد (۱۵، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷) همچنین Dind و همکارانش (۱۲) نشان دادند که TGF-β بر ترشح نیتریک اکساید اثر مهاری دارد در حالی که IFN-γ اثر افزایشی دارد. در این مطالعه اثر هورمونهای جنسی استروییدی بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی در حضور یا غیاب TGF-βمورد مطالعه قرار گرفت. همان طور که در نمودار ۳ نشان داده شده، هورمون زنانه ۱۷- بتا استرادیول که خود به تنهایی قادر به کاهش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش بوده است، وقتی به صورت توام با TGF-β استفاده شد توانسته باعث کاهش بیشتری در ترشح این رادیکال آزاد توسط ماکروفاژهای ریوی رت شود (جدول ۱). نتایج حاصل از این تحقیق با یافته‌های دیگران همخوانی داشته (۱۵، ۲۲) با این تفاوت که نوع ماکروفاژها در اینجا ریوی بوده و از اهمیت بیشتری برخوردار است.

تجربیات قبلی ما نشان داد که ۵- آلفادی هیدروتستوسترون باعث افزایش ترشح نیتریک اکساید می‌شود (۱۵، ۲۷). در این مطالعه نتایج نشان داد که TGF-βهمچنین قادر بوده است باعث کاهش اثر افزایشی ۵- آلفادی هیدروتستوسترون بر ترشح نیتریک اکساید شود (نمودار ۶، جدول ۲). ولی اثر کاهشی TGF-β ضعیف‌تر از اثر افزایشی ۵- آلفا دی هیدروتستوسترون بر ترشح آن بوده به طوری که TGF-βنتوانسته اثر افزایشی را به طور کامل مسدود و مقدار ترشح آن را به کمتر یا حداقل مساوی با مقدار ترشح آن در گروه کنترل (۴۲۰ نانو مول در هر چاهک) برساند. بلکه فقط توانسته با اثر افزایشی آن مقابله و ترشح آن را به کمتر از حد ماکزیمم برساند. نظر به اینکه نیتریک اکساید یکی از مواد دخیل در فرآیندهای التهابی است (۲۱، ۲۲) و معمولا از داروهای استروییدی جهت جلوگیری از التهاب استفاده می‌شود، لذا اثرات هورمونهای استروییدی در این حالت به خاصیت ضد التهابی آنها بر می‌گردد. از طرفی گزارشات نشان داده که نیتریک اکساید احتمالا در فرآیند ضایعات ریوی خصوصا فیبروز نقش دارد (۲۸). لذا با توجه به نقش تثبیت شده TGF-βدر فرآیند فیبروز ریه (۲۹) و اثرات مثبت IFN-γ در بهبود ضایعات ریوی ناشی از TGF-β می‌توان ارتباط این سایتوکاینها با ترشح نیتریک اکساید را نشان داد.

چون IFN-γ از یک طرف باعث افزایش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی (۱۵) و ریوی می‌شود و از طرفی نشان داده شده که تجویز این فاکتور باعث بهبود روند التهاب در ریه و جلوگیری از پیشرفت فیبروز ریه می‌شود. این در حالی است که TGF-β از یک طرف باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای ریوی در *in vitro* گردیده واز طرف دیگر در *in vivo* باعث افزایش روند التهاب در ریه شده و IFN-γ مخالف آن عمل می‌نماید (۲۸، ۲۹). لذا می‌توان پیشنهاد کرد که احتمالا اثر این دو سایتوکاین در روند التهاب از طریق ترشح نیتریک اکساید صورت می‌گیرد. همچنین در *in vivo* به دلیل تداخل سایتوکاینهای مترشحه از سلولهای T اثرات TGF-β بر ترشح نیتریک اکساید با اثر آن در *in vitro* احتمالا متفاوت است.

اثر هورمونهای جنسی در این فرایند از آن جهت حائز اهمیت است که تا کنون گزارشی مبنی بر تفاوت جنسی در فرآیند ضایعات