

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات تحریکی L-Arginine و مهارى L-NAME بر ضخامت کورتکس و مدولای تیموس موش صحرایی باردار

سید محمد حسین نوری موگهی^۱، زهرا نادیا شریفی^۲، شبنم موثقی^۲، عطاراد السادات مصطفوی نیا^{۲*}

^۱ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۲ گروه علوم تشریحی و اعصاب شناختی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: a.mostafavinia@gmail.com

تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۰

چکیده

با توجه به نقش مهم اکسید نیتریک (Nitric oxide, NO) در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیک در سلول‌ها و بافت‌های بدن از جمله در دوره حاملگی و مراحل مختلف آن، این مطالعه تأثیر ماده‌ای بنام L-Arginine به عنوان پیش‌ساز نیتریک اکساید و ماده‌ای بنام (L-NG-Nitroarginine-Methyl Ester, L-NAME) به عنوان مهارکننده سنتز آن را بر روی تغییرات ساختاری و استریولوژیکی تیموس موش صحرایی باردار بررسی کرده است. ۳۲ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با سن متوسط هشت هفته و وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم به طور تصادفی به ۴ گروه هشت‌تایی شامل گروه کنترل، mg/kg، L-Arginine ۲۰۰، L-NAME ۲۰ mg/kg و L-NAME + L-Arginine تقسیم شدند. در روز ۱۸ حاملگی، موش‌ها با اثر بیهوش و سپس تیموس آن‌ها خارج و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. پس از پاساژ بافتی مقاطع با روش هماتوکسیلین-اوتوزین (H&E) رنگ‌آمیزی و بررسی بافت شناسی و مورفومتری انجام شد. L-Arginine با اثر تحریکی خود بر سنتز اکسید نیتریک، باعث افزایش جمعیت لنفوسیت T در تیموس و در نتیجه افزایش ضخامت کورتکس شده و از طرفی L-NAME با اثر مهارى بر سنتز اکسید نیتریک، باعث کاهش ضخامت مدولا می‌شود. تحلیل واریانس نشان داد که ضخامت کورتکس و مدولای تیموس در گروه L-Arginine در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری به ترتیب در سطح $p=0.000$ و $p=0.002$ داشت. ضخامت کورتکس و مدولا در گروه L-NAME کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل در سطح $p=0.000$ نشان داد.

کلیدواژه‌ها: اکسید نیتریک، تیموس، L-Arginine، L-NAME، مورفومتری.

مقدمه

لبول‌های ناقصی تشکیل شده که هر کدام یک بخش محیطی تیره به نام قشر (Cortex) و یک بخش مرکزی روشن به نام مغز (Medulla) دارد [۱]. کورتکس متشکل از جمعیت زیادی از

تیموس عضوی دولوبی است که در مدیاستن قرار داشته و نقشی اساسی در تکوین ایمنی طی دوره کودکی دارد. این عضو از

لنفوبلاست‌های T و ماکروفاژها در داربستی از سلول‌های رتیکولوپای تلیال است و مدولا حاوی یک شبکه سلولی متشکل از سلول‌های رتیکولوپای تلیال و لنفوسیت‌های T تمایز یافته‌ای که با تراکم کمتر کنار هم قرار گرفته‌اند است [۲]. تیموس در طی دوره‌های استرس درگیر شده و به طور حاد اندازه‌اش کوچک می‌شود، اما پس از بهبودی به حد طبیعی برمی‌گردد. تیموس در طی دوران حاملگی نیز درگیر می‌شود، فرآیندی که احتمالاً از طریق هورمون‌ها میانجی‌گری می‌شود و برای بقای جنین ضروری است [۳]. در ارتباط با نقش تیموس در طی حاملگی در انسان و تحمل جنین توسط مادر شناخت کمی وجود دارد.

زنان باردار در مقایسه با زنان غیر باردار سطوح کاهش یافته‌ای از (T cell receptor excision circles, TRECs) در جمعیت CD4+ دارند که نشان دهنده برون‌ده کاهش یافته جمعیت CD4+ از تیموس است [۴]. مشخصه تیموس در طی حاملگی فعالیت آن بوده که به صورت ایجاد ریز محیطی شامل تعداد زیادی سلول‌های T تازه مشتق شده است که در جمعیت‌های سلولی شرکت کرده و عمل سرکوبگری در حاملگی دارند، بنابراین به مهار سیستم ایمنی مادر در برابر آنتی ژن‌های پدری و جنینی کمک می‌کنند [۵]. اکسید نیتریک گازی اتمسفری و رادیکال آزاد بوده که میانجی‌گر بیولوژیکی مهمی در حیوانات و انسان است [۶]. این مولکول توسط سه اکسید نیتریک سنتز مجزا (نورونی، القایی و اندوتلیال) سنتز می‌شود که همه آن‌ها تقریباً در تمام بافت‌ها و اعضای بدن انسان بیان می‌شوند (۷). NO به دلیل داشتن خاصیت گشادکنندگی دیواره عروق، تون عروقی گردش خون عمومی و ریوی را تعدیل می‌کند. اعمال ضد ترومبوزی دارد و بعضی از پیامدهای پاسخ‌های التهابی غریزی و حاد را میانجی‌گری می‌کند [۶]. بسته به محل رهایی آن، در سیستم عصبی مرکزی و محیطی به عنوان واسطه شیمیایی، در سیستم گردش خون به عنوان تنظیم‌کننده فشار و در سیستم ایمنی به عنوان عامل سایتواستاتیک عمل می‌کند [۸].

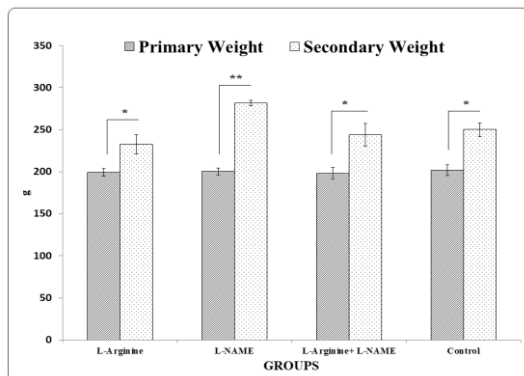
اکسید نیتریک توسط L-Arginine سنتز و باعث انبساط عضله صاف از طریق افزایش سطوح (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) می‌شود. در رحم یک سیستم L-Arginine- nitric oxide- cGMP موجود است که شل‌کنندگی عضلات رحمی را تنظیم می‌کند. عمل مهارى این

سیستم در طی زایمان و بعد از آن کمتر بوده که این پدیده نشان می‌دهد سیستم اکسید نیتریک نقش مهمی در مهار انقباضات رحمی و حفظ حاملگی دارد [۹، ۱۰]. محققین نشان داده‌اند که مهار سنتز اکسید نیتریک توسط L-NAME باعث افزایش متوسط فشارخون، وجود پروتئین در ادرار (Proteinuria)، عقب ماندگی رشد داخل رحمی و آسیب‌های اندوتلیال مویرگ‌های گلوامرولی در موش‌های صحرائی باردار می‌شود [۱۱، ۱۲]. در مطالعه‌ای، افزایش فعالیت آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین (ACE) در آنورت موش‌ها در پاسخ به تیمار با L-NAME و دگزامتازون نشان داده شد (۱۳). تحقیقات دیگری بیانگر این است که تولید NO اندوژن در موش‌های صحرائی باردار افزایش می‌یابد. این یافته نشان می‌دهد که ممکن است ماده مذکور در گشادی عروق مادری و سرکوب ایمنی رحم در طی حاملگی طبیعی شرکت داشته باشد [۱۴]. در طول دهه‌های گذشته مشخص شده که NO یکی از قوی‌ترین محرک‌های سیستم ایمنی بوده و در بیماری‌زایی و کنترل بیماری‌های عفونی، تومورها، فرآیندهای خود ایمنی و بیماری‌های مزمن تخریب‌کننده درگیر است [۱۵، ۱۶]. هم‌چنین یافته‌های مطالعات گذشته نشان می‌دهد که L-Arginine در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک، بیولوژیک و ایمونولوژیک نقش مهمی را بازی می‌کند [۱۷]. مکمل آرژینین باعث بهبود تکامل تیموس و عملکرد سیستم ایمنی در عقب افتادگی رشد داخل رحمی (IUGR) در جنین می‌شود [۱۸]. نکته جالب توجه اینجاست که اکسید نیتریک می‌تواند به مولکول‌های بسیار فعال و مضری تبدیل شود که باعث آسیب DNA، چربی‌ها یا پروتئین‌ها می‌شود و بنابراین عملکرد آن‌ها را تغییر می‌دهد. این اثر دوگانه NO، که هم در هوموستاز نقش دارد و هم به گسترش فرآیندهای آسیب‌شناسی کمک می‌کند، این مولکول را به یک هدف جالب برای درمان‌های پزشکی به ویژه در ارتباط با سیستم‌های عصبی و ایمنی تبدیل کرده است [۱۹]. با توجه به مطالب فوق‌الذکر هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر تحریکی L-Arginine و اثر مهارى L-NAME بر ضخامت کورتکس و مدولای تیموس در موش صحرائی باردار است.

مواد و روش کار

ابعاد سطح کورتکس و مدولا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحلیل داده‌ها به منظور مقایسه وزن اولیه و ثانویه موش‌ها در گروه‌های مختلف، که با استفاده از آزمون t زوج شده انجام پذیرفت، نشان داد که در همه گروه‌ها افزایش معنی‌داری در وزن موش‌ها اتفاق افتاد.

الف- یافته‌های کمی



نمودار ۱: مقایسه میانگین وزن اولیه و ثانویه در موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار در گروه‌های مختلف (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

در این مطالعه یافته‌های ریخت شناسی تیموس با اندازه‌گیری ضخامت کورتکس و مدولا از طریق نرم‌افزار Image tools III به دست آمد. نتایج مربوط به ضخامت کورتکس و مدولا در نمودارهای ۲ و ۳ نشان داده شده است. نتایج مقایسه گروه‌های مختلف به شرح زیر است: از نظر ضخامت کورتکس بین گروه L-Arginine+ و L-NAME با گروه‌های L-Arginine و L-NAME اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت در گروه L-Arginine افزایش ضخامت دیده شد. از نظر ضخامت کورتکس بین گروه کنترل با گروه‌های L-NAME و L-Arginine+L-NAME اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت در گروه کنترل افزایش ضخامت مشاهده گردید. از نظر ضخامت مدولا در گروه L-Arginine نسبت به گروه L-NAME افزایش ضخامت و نسبت به گروه کنترل کاهش ضخامت وجود داشت. از نظر ضخامت مدولا در گروه کنترل نسبت به گروه‌های دیگر افزایش ضخامت مشاهده شد. افزایش ضخامت مدولا در گروه L-Arginine+L-NAME نسبت به گروه L-NAME وجود داشت.

این بررسی از نوع تجربی (Experimental) بوده و به مدت یک‌سال در حیوان‌خانه گروه آناتومی و آزمایشگاه هیستوتکنیک بخش بافت‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. به این منظور ۳۲ سر موش صحرایی (Rat) ماده نژاد ویستار با وزنی در حدود ۲۵۰-۲۰۰ گرم و سن متوسط هشت هفته از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش در حیوانخانه تحت شرایط آزمایشگاهی و در درجه حرارت 20 ± 2 با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند تا با شرایط جدید سازگاری پیدا کنند. در طول تحقیق کلیه شرایط زیستی برای تمامی حیوانات یکسان بوده و دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. پس از انجام عمل جفت‌گیری، روز مشاهده پلاک واژینال به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. در روز صفر، موش‌های حامله به طور تصادفی در چهار گروه شامل گروه‌های کنترل، L-Arginine، L-NAME، L-NAME+L-Arginine دسته‌بندی شدند. به جز گروه کنترل، گروه‌های تجربی به ترتیب ۲۰۰ mg/kg L-Arginine، ۲۰ mg/kg L-NAME و مخلوط دو ماده L-Arginine و L-NAME را با همان دوزهای مشابه در روزهای سوم، چهارم و پنجم حاملگی به روش داخل صفاقی دریافت کردند. سپس در روز هجدهم حاملگی، موش‌ها پس از بیهوشی با اتر، تشریح شده و تیموس آن‌ها خارج و برای مطالعات میکروسکوپی آماده شد. به این ترتیب که نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شده و پس از انجام مراحل پاساژ بافتی و قالب‌گیری پارافینی، برش‌هایی با ضخامت ۵-۶ میکرون تهیه و با روش رنگ آمیزی معمولی همانوکسیلین-انوزین رنگ آمیزی شدند. برای بررسی‌های کیفی و کمی، میکروسکوپ نوری الیمپوس مدل CX31 (Olympus, Japan) و نرم‌افزار Image Tools III بکار رفت. برای آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS21 و آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و LSD استفاده شد. سطح معنی‌داری میانگین داده‌ها در همه موارد $p < 0.05$ بود.

نتایج

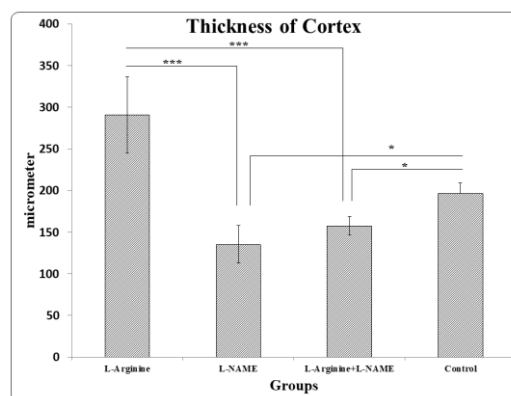
در مطالعه حاضر بعد از تزریق دو ماده L-NAME و L-Arginine به صورت جداگانه و سپس مخلوطی از آن‌ها،

دریافت‌کننده L-NAME) کاهش ضخامت کورتکس و مدولا (فلش آبی و سیاه) را نشان می‌دهد. در شماره سه (گروه دریافت‌کننده L-Arginine + L-NAME) باید به کاهش مختصر ضخامت کورتکس و مدولا (فلش آبی و سیاه) توجه شود و شماره چهار (گروه کنترل) ساختار بافتی تیموس و ضخامت کورتکس و مدولا (فلش آبی و سیاه) را نشان می‌دهد (بزرگنمایی $\times 10$ ، رنگ آمیزی H&E).

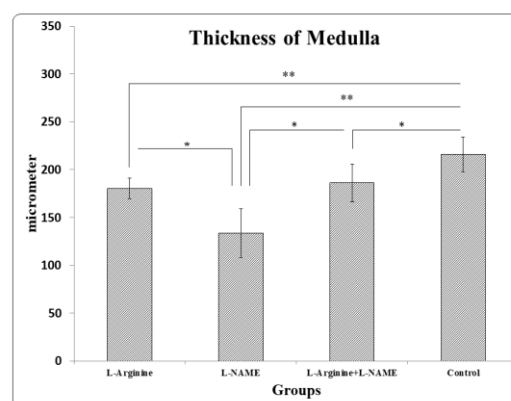
بحث

در این مطالعه تغییرات ریخت‌شناسی مشاهده شده در بافت تیموس موش صحرایی باردار بعد از کاربرد L-NAME و L-Arginine با استفاده از مشاهدات بافت‌شناسی و یک روش مورفومتریک مورد بررسی قرار گرفت. کورتکس تیموس با داشتن دانسیته‌ی نرمال از لنفوسیت‌ها توصیف می‌شود. در بررسی نسبت پارانشیم و استروما بیشتر حجم مربوط به پارانشیم است و در پارانشیم هم در مقایسه‌ی اجزای آن یعنی مدولا و کورتکس، کورتکس حجم بیشتری را به خود اختصاص می‌دهد [۲۰]. در مطالعه حاضر، L-Arginine به عنوان یک محرک تولید اکسید نیتریک در بافت تیموس موجب افزایش ضخامت کورتکس تیموس شد. Da Costa و همکاران مطالعه‌ای را برای ارزیابی عفونت انگلی خون، سطوح کورتیکوسترون، تولید NO، اندازه‌گیری‌های ریختی جنین و بافت‌شناسی قلب و جفت انجام دادند.

۲۰ سر موش صحرایی باردار نژاد ویستار (۱۸۰-۲۲۰ گرم) در چهار گروه کنترل باردار، کنترل باردار + L-Arginine، عفونی شده باردار، و عفونی شده باردار + L-Arginine قرار گرفتند. تیمار با L-Arginine ۲۱ mg/kg روزانه به مدت ۱۴ روز صورت گرفت. گروه چهارم کاهش معنی‌داری را در سطوح کورتیکوسترون و میزان عفونت خون نشان داد بنابراین بر اساس یافته‌های آن‌ها، L-Arginine می‌تواند علیه عفونت مذکور، بدن را در طی بارداری محافظت کند [۲۱]. Potenza و همکاران نیز نشان دادند که در پی ایجاد جراحی، L-Arginine می‌تواند اثر متوقف‌کننده بر روی سیستم ایمنی و تیمولیتیک بر روی تیموس داشته باشند تا اثر تروما را کاهش دهد [۲۲]. Ullewar M.P. و همکاران از یک آگونیست گیرنده GnRH به نام Leuprolide برای جلوگیری از اثر مهارکنندگی ایمنی L-Arginine استفاده کردند.

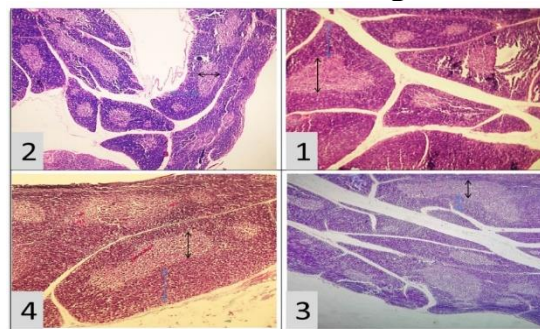


نمودار ۲: مقایسه ضخامت کورتکس در گروه‌های مورد مطالعه در موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار به روش ANOVA و آزمون LSD ($p < 0.05$; $*** p < 0.001$)



نمودار ۳: مقایسه ضخامت مدولا در گروه‌های مورد مطالعه در موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار به روش ANOVA و آزمون LSD ($p < 0.05$; $** p < 0.01$)

ب- یافته‌های کیفی



فتمیکروگراف‌های ۱ تا ۴- مقاطع بافتی تیموس گروه‌های چهارگانه را نشان می‌دهد. که در شماره یک (گروه دریافت‌کننده L-Arginine) آن باید به افزایش ضخامت کورتکس (فلش آبی) و کاهش ضخامت مدولا (فلش سیاه) توجه شود. شماره دو (گروه

می‌باشد این است که Goldbakh و همکاران بیان کردند که در تیموس جوانان نسبت کورتکس به مدولا معمولاً یک به دو است [۲۵]. در گروهی که L-Arginine+ NAME را به طور هم‌زمان دریافت کرده بود نتایج به دست آمده کاهش ضخامت کورتکس و مدولا را نسبت به گروه کنترل نشان داد در گروه L-NAME هم کاهش ضخامت کورتکس و مدولا نسبت به گروه کنترل مشاهده شد که نسبت به گروه قبلی معنی‌دارتر بود بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که L-Arginine و L-NAME تا حد زیادی اثر همدیگر را خنثی می‌کنند، ولی این احتمال وجود دارد که دوز دریافتی L-Arginine به حد کافی نبوده تا از کاهش ضخامت کورتکس و مدولا توسط L-NAME جلوگیری کند. لذا طبق مشاهدات تجربه حاضر، L-Arginine با اثر تحریکی خود بر سنتز اکسید نیتریک، باعث افزایش جمعیت لنفوسیت T در تیموس موش صحرایی باردار می‌شود در نتیجه ضخامت کورتکس افزایش و ضخامت مدولا کاهش می‌یابد. L-NAME با اثر مهارتی خود بر سنتز اکسید نیتریک باعث کاهش ضخامت کورتکس و مدولا می‌شود. به علت اهمیت بسیار زیاد عملکرد اکسید نیتریک پیشنهاد می‌شود اثرات و عوارض دوزهای مختلف این مولکول بر سایر دستگاه‌های بدن نیز مطالعه شود. هم چنین اثرات این دو ماده بر تیموس موش‌های صحرایی غیرباردار بررسی و با اثرات آن‌ها در موش‌های باردار مقایسه شود.

References:

- [1] Nishino M, Ashiku SK, Kocher ON, Thurer RL, Boiselle PM, Hatabu H. The thymus: a comprehensive review. *Radiographics*. 2006 Mar; 26(2): 335-48.
- [2] Montazeri SM. *Junqueira's Basic Histology*. First ed. Tehran, 2010:328.
- [3] Swami S, Tong I, Bilodeau CC, Bourjeily G. Thymic involution in pregnancy: a universal finding? *Obstetric medicine*. 2012 Sep; 5(3): 130-2.
- [4] Hellberg S, Mehta RB, Edström M, Forsberg A, Berg G, Winqvist O, Jenmalm MC, Ernerudh J. The export of T helper cells from thymus during pregnancy. In *Front. Immunol. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology*. Milan, Italy. -2013.
- [5] Clarke AG, Kendall MD. The thymus in pregnancy: the interplay of neural, endocrine and immune influences. *Immunology today*. 1994 Nov 1; 15(11): 545-52.

تیمار با L-Arginine با دوزهای ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ mg/kg/i.p. به مدت ۷ روز و با 100 mg s.c. Leupralide به مدت ۷ روز انجام شد. یافته‌ها نشان داد که Leupralide مانع از افزایش در سطوح NO در تیموس، مغز و تغییرات در پارامترهای ایمنولوژیکی توسط L-Arginine می‌شود [۲۳]. Y. Yang و همکاران با اندازه‌گیری غلظت‌های پلاسمایی آرژینین، اورینتین، پرولین، هومو آرژینین، اوره، متابولیت‌های اکسید نیتریک، آمونیاک، گلوتامین، اسیدهای چرب آزاد و تری‌گلیسریدها نشان دادند که اضافه کردن L-Arginine به رژیم غذایی موش‌های صحرایی به میزان ۳/۶ g/kg روزانه به مدت حداقل ۹۱ روز ایمن بوده و می‌تواند راهنمای مطالعات بالینی برای تعیین بی‌ضرر بودن کاربرد خوراکی طولانی مدت L-Arginine در انسان باشد [۲۴]. گروهی دیگر از محققین بیان کردند که در جوانان نرمال اضافه کردن ۱۸ میکرولیتر آرژینین به محتوی رژیم غذایی آن‌ها وزن تیموس و به طور ثانویه تعداد لنفوسیت‌های T را افزایش می‌دهد [۲۵، ۲۰]. با توجه به این‌که تعداد لنفوسیت‌ها در کورتکس نسبت به مدولا بیشتر است، لذا افزایش ضخامت کورتکس را می‌توان با افزایش تعداد لنفوسیت‌ها توجیه کرد که با این افزایش حجم، فضای بیشتری را نیز به خود اختصاص می‌دهد و ناحیه اشغالی توسط مدولا را کاهش می‌دهد که در همین ارتباط Mouliau و همکاران بیان کردند که تیموس دارای نقش مرکزی در تمایز سلول‌های T است و بیشتر این عملکردها در اثر تحریک در قشر رخ می‌دهد [۲۶]. Sunita در آزمایش خود بیان کرد که پاسخ ایمنی موش‌های صحرایی دریافت‌کننده L-Arginine در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. از آنجایی که L-Arginine یک پیش‌ساز شناخته شده برای NO است تصور می‌شود که NO بعد از کاربرد L-Arginine، به صورت اندوژن تولید و بنابراین تحریک‌کننده سیستم ایمنی است [۱۶]. پس می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که برای عملکرد پروتئین‌های تنظیمی مثل تیموزین و تیموپوئیتین حضور L-Arginine ضروری است، در مطالعه حاضر گروه دریافت‌کننده L-NAME کاهش ضخامت کورتکس و مدولا را نشان می‌دهد. در حالی که محققین قبلی به این نتیجه رسیدند که اثر L-NAME مشابه گروه کنترل بوده و اختلاف آماری معنی‌داری دیده نشد [۱۶]. مسأله دیگری که با یافته‌های تحقیق کنونی کاملاً در تضاد

- [6] Singh SU, Evans TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *European Respiratory Journal*. 1997 Mar 1; 10(3):699-707.
- [7] Tsutsui M, Tanimoto A, Tamura M, Mukae H, Yanagihara N, Shimokawa H, Otsuji Y. Significance of nitric oxide synthases: Lessons from triple nitric oxide synthases null mice. *Journal of pharmacological sciences*. 2015 Jan 31; 127(1):42-52.
- [8] Malinski T. The vital role of nitric oxide. *Oakland Journal Number 1: Spring 2000*. 2000 Apr 1.
- [9] Yallampalli C, Izumi H, Byam-Smith M, Garfield RE. An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1994 Jan 1;170(1):175-85.
- [10] Izumi H, Yallampalli C, Garfield RE. Gestational changes in L-arginine-induced relaxation of pregnant rat and human myometrial smooth muscle. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1993 Nov 1; 169(5):1327-37.
- [11] Nathan L, Cuevas J, Chaudhuri G. The role of nitric oxide in the altered vascular reactivity of pregnancy in the rat. *British journal of pharmacology*. 1995 Mar 1; 114(5):955-60.
- [12] Helmbrecht GD, Farhat MY, Lochbaum L, Brown HE, Yadgarova KT, Eglinton GS, Ramwell PW. L-arginine reverses the adverse pregnancy changes induced by nitric oxide synthase inhibition in the rat. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1996 Oct 31; 175(4):800-5.
- [13] Emel'yanov MO, Korystova AF, Kublik LN, Levitman MK, Shaposhnikova VV, Korystov YN. Low doses of ethanol decrease the activity of the angiotensin-converting enzyme in the aorta of aging rats and rats treated with a nitric oxide synthase inhibitor and dexamethasone. *Clinical Science*. 2012 Jan 1; 122(2):75-81.
- [14] Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna HA, Kruszyna RO, Rochelle LG, Smith RP, Chavez JE, Mosher MD. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *The FASEB Journal*. 1993 Apr 1; 7(6):566-71.
- [15] Moilanen E, Vapaatalo H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Annals of medicine*. 1995 Jan 1;27(3):359-67.
- [16] Sunita R, Goutam R, Mishra SC, Raviprakash V. Role of nitric oxide in central regulation of humoral immune response in rats. *Indian Journal of Pharmacology*. 2000 Sep 1; 32(5): 318.
- [17] Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC. The l-arginine—nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. *Atherosclerosis*. 1996 Nov 15; 127(1):1-11.
- [18] Banuls C, Rocha M, Rovira-Llopis S, Falcon R, Castello R, R Herance J, Polo M, Blas-Garcia A, Hernandez-Mijares A, M Victor V. The pivotal role of nitric oxide: effects on the nervous and immune systems. *Current pharmaceutical design*. 2014 Sep 1; 20(29): 4679-89.
- [19] Mitevska E. Histological characteristics of thymus assessed with stereological parameters after medroxyprogesterone acetate application. *Maced J Med Sci*. 2011 Dec 1;4(4):367-71.
- [20] Da Costa CM, de Freitas MR, Brazão V, dos Santos CD, Sala MA, do Prado Júnior JC, Abrahão AA. Does L-arginine availability during the early pregnancy alters the immune response of Trypanosoma cruzi infected and pregnant Wistar rats? *Experimental parasitology*. 2014 Jul 31; 142:59-66.
- [21] Zhang H, Zhao F, Nie H, Ma T, Wang Z, Wang F, Looor JJ. Dietary N-carbamylglutamate and rumen-protected l-arginine supplementation during intrauterine growth restriction in undernourished ewes improve fetal thymus development and immune function. *Reproduction, Fertility and Development*. 2018 Oct 17; 30(11):1522-31.
- [22] Potenza MA, Nacci C, Mitolo-Chieppa D. Immunoregulatory effects of L-arginine and therapeutic implications. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*. 2001 May 1; 1(1):67-77.
- [23] Ullewar MP, Umathe SN. Gonadotropin-releasing hormone agonist prevents l-arginine induced immune dysfunction independent of gonadal steroids: Relates with a decline in elevated thymus and brain nitric oxide levels. *Nitric Oxide*. 2016 Jul 1; 57:40-7.
- [24] Yang Y, Wu Z, Jia S, Dahanayaka S, Feng S, Meininger CJ, McNeal CJ, Wu G. Safety of long-term dietary supplementation with l-arginine in rats. *Amino acids*. 2015 Sep 1; 47(9): 1909-20.
- [25] Goldbach KJ. Histological and morphometric investigation of the thymus of the Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*). A thesis presented to the graduate school of the University of Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science University of Florida. 2010.
- [26] Moulian N, Truffault F, Gaudry-Talarmain YM, Serraf A, Berrih-Aknin S. In vivo and in vitro apoptosis of human thymocytes are associated with nitrotyrosine formation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2001 Jun 1; 97(11): 3521-30.

Investigation of Excitatory and Inhibitory Effects of L-Arginine and L-NAME on the thickness of the cortex and medulla of Thymus in Pregnant Rats

Noori Moogahi SMH.^{1&2}, Sharifi ZN.², Movaseghi Sh.², Mostafavinia A.^{2*}

¹ School of medicine, Tehran University of medical sciences, Tehran, Iran

² Department of Anatomy & Cognitive Neurosciences, Faculty of Medicine, Tehran Medical sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* (Corresponding author): a.mostafavinia@gmail.com

Received: July 2021

Accepted: November 2021

Abstract

Considering the important role of Nitric Oxide (NO) in many biologic processes of cells and tissues including during pregnancy and its different stages, this study investigated the effects of L-Arginine as a NO precursor and L-NAME as a NO inhibitor on structural and stereological changes of the thymus in pregnant rats. In this experimental study, thirty-two female Wistar rats, aged 8 weeks and weighing 200-250g, were randomly divided into 4 groups: Control, L-Arginine (200 mg / kg), L-NAME (20 mg / kg) and L-Arginine + L-NAME; 8 rats in each group. On the 18th day of pregnancy, the rats anesthetized with ether, then, their thymus was extracted and fixed in 10% formalin. After tissue passage, the sections were stained with H&E and the histological and morphometric studies were performed. L-Arginine with its stimulative effect on NO synthesis in thymus causes to increase T-lymphocyte population, therefore thickness of cortex is increased and thickness of medulla decreased. Analysis of variance showed that the thickness of cortex and medulla of thymus in the L-Arginine group was significantly different in comparison with the control group, with $p=0.000$ and $p=0.002$, respectively. The thickness of cortex and medulla in the L-NAME group showed a significant decrease, with $p=0.000$, compared to the control group.

Keywords: Nitric Oxide, Thymus, L-Arginine, L-NAME, Morphometry.