

## بررسی تأثیر نیتریک اکساید بر حجم، وزن و بافت‌شناسی قلب موش صحرایی باردار

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۱۱

### چکیده

مریم خانه‌زاد<sup>۱</sup>، سید محمد حسین نوری موگهی<sup>۲</sup>، ثریا پروری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
<sup>۳</sup> دانشجوی دکترا، گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

**مقدمه:** نیتریک اکساید (NO) مولکول کوچک چربی دوستی است که توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز از پیش‌ساز L-Arginine در بسیاری از اندام‌های بدن تولید می‌شود.

**هدف:** با توجه به نقش مهم نیتریک اکساید در بسیاری از فرایندهای بیولوژیک بدن خصوصاً سیستم قلبی-عروقی، هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات تحریکی و مهاري آن بر قلب است.

**مواد و روش‌ها:** ۴۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم و سن متوسط ۸ هفته، بعد از اطمینان از بارداری به پنج گروه (n=8) تقسیم شدند. به جز گروه کنترل بقیه گروه‌ها به ترتیب ۱mg/kg نرمال‌سالین، L-Arginine، L-NAME و مخلوط دو ماده L-Arginine و L-NAME را با همان دوزهای مشابه در روزهای سوم، چهارم و پنجم حاملگی به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. سپس در روز ۱۸ حاملگی بیهوش و قلب حیوانات خارج و بعد از اندازه‌گیری وزن و حجم به روش هماتوکسیلین اتوزین (H&E) رنگ‌آمیزی و تغییرات بافت‌شناسی با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

**یافته‌ها:** در بررسی مقایسه‌ای با آزمون ANOVA علیرغم افزایش حجم و وزن قلب در گروه L-NAME، اختلاف آماری معناداری بین گروه‌ها دیده نشد، ولی بیشترین تغییرات بافتی نسبت به سایر گروه‌ها در گروه L-NAME قابل رؤیت بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که L-NAME در مرحله بارداری می‌تواند به واسطه کاهش سطح NO باعث تغییرات بافت‌شناسی در بافت قلب شود.

**کلمات کلیدی:** قلب، موش صحرایی، نیتریک اکساید، L-Arginine، L-NAME

\* نویسنده مسئول: تهران، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه بافت‌شناسی، صندوق پستی ۶۴۴۷-۱۴۱۵۵  
۰۲۱-۸۸۹۵۳۰۰۸  
E-mail: noorimoo@sina.tums.ac.ir

### مقدمه

نیتریک اکساید (NO) یک مولکول چربی دوست با نیمه عمر کوتاه است که در بسیاری از اندام‌های بدن تولید شده و به عنوان یک پیامبر داخل سلولی و بین سلولی در کنترل بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک بدن دخالت دارد. از جمله پدیده‌هایی که نیتریک اکساید در آنها نقش اساسی دارد می‌توان به رشد سلولی، آپوپتوز، انتقال پیام‌های عصبی، تنظیم جریان و فشارخون، تنظیم تونوسیت‌های عروق، اثر بر تشکیل مجاری تناسلی، عملکرد کلیه، پیش‌سازهای بافت عصبی و مکانیسم دفاعی اشاره کرد.<sup>۱،۲</sup>

تولید این ماده توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (Nitric Oxide Synthase=NOS) از پیش‌ساز L-Arginine صورت می‌گیرد که برای این کار از اکسیژن و کوفاکتورهایی نظیر نیکوتین-آدنین

دی‌نوکلئوتید فسفات (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADPH) استفاده می‌شود. این آنزیم سه ایزوform نورال (Neural NOS =nNOS)، القایی (Inducible NOS=iNOS) و اندوتلیال (Endothelial NOS =eNOS) دارد.<sup>۳</sup> نیتریک اکساید تولید شده توسط nNOS و eNOS در فرایندهای داخل سلولی و نیتریک اکساید حاصل از iNOS در فرایندهای التهابی درگیر است.<sup>۱</sup> منشأ اصلی نیتریک اکساید در قلب، آنزیم eNOS است که در اندوتلیوم عروق و میوسیت‌های قلبی ظهور و از طریق گشادی عروقی (Vasodilatation) عملکرد قلب را تنظیم و علاوه بر آن در ریخت‌زایی دریچه‌های قلبی، رگ‌زایی و تغییر وضع عروق پس از تکامل نقش دارد. مهار فعالیت NOS از طریق انقباض عروق باعث افزایش فوری در فشار خون شده که به عنوان یک فاکتور مهم در

مراحل آماده‌سازی بافتی، برش‌هایی با ضخامت ۵ تا ۶ میکرون از ناحیه میومتر بطن چپ تهیه شد. نمونه‌ها پس از رنگ‌آمیزی معمولی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) با میکروسکوپ نوری الیمپوس (Olympus) مدل CX31 ساخت ژاپن بررسی شدند (۵).

#### روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

با استفاده از برنامه آماری SPSS داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (Mean  $\pm$  SD) ارائه شدند. جهت مقایسه بین گروهی مقادیر پارامترها، از آزمون واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و سپس آزمون Tukey استفاده شد و مقادیر با ( $P < 0/01$ ) به عنوان حداقل سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

##### یافته‌های ماکروسکوپی و کمی

حجم و وزن قلب در گروه L-NAME نسبت به سایر گروه‌ها افزایش یافته بود، ولی این تفاوت اختلاف آماری معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان نداد ( $P < 0/01$ ) (نمودارهای ۱ و ۲).

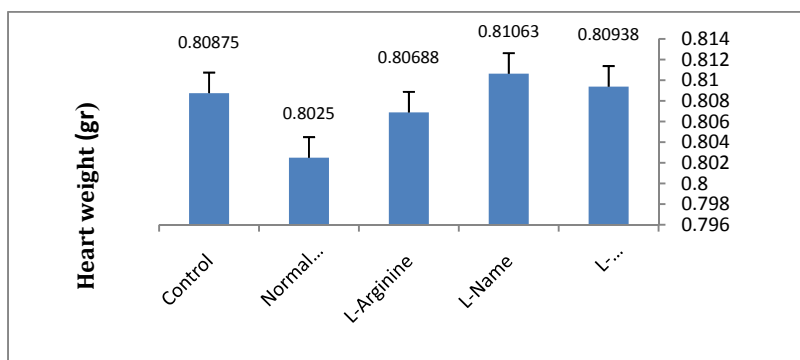
##### یافته‌های میکروسکوپی و کیفی

ساختار قلب رت‌ها در گروه نرمال‌سالین تفاوت قابل ملاحظه‌ای با گروه کنترل نداشت. در گروه L-Arginine نیز شباهت بسیاری به بافت طبیعی وجود داشت و فقط گشادگی عروق (Vasodilation) و در نتیجه آن احتقان (Congestion) در عروق دیده شد. مشاهده فتومیکروگراف‌های مربوط به گروه L-NAME بیشترین تغییرات ایجاد شده را نسبت به سایر گروه‌ها داشت. در این فتومیکروگراف‌ها ساختار منظم عضله قلب به هم خورده و خطوط تیره و روشن در بعضی سلول‌ها از بین رفته و ارتشاح سلول‌های التهابی و احتقان (Congestion) گلبول‌های قرمز نیز دیده شد (فتومیکروگراف‌های ۱ و ۲).

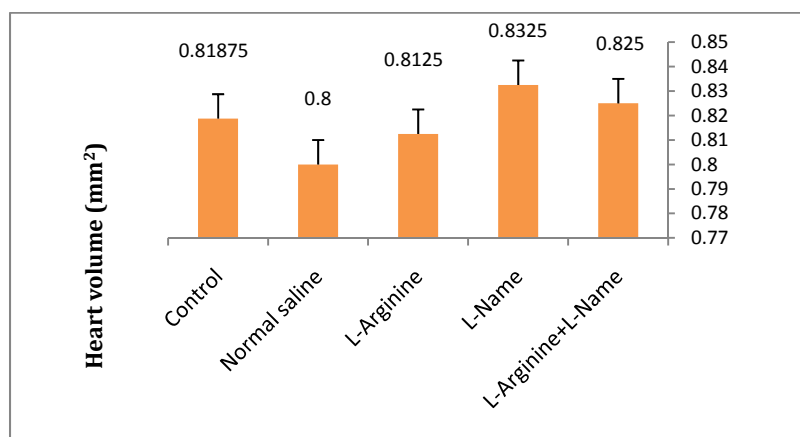
نارسایی قلبی سبب آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها می‌شود. لذا آزاد شدن مداوم نیتریک اکساید برای حفظ فشار خون طبیعی ضروری است.<sup>۴</sup> با توجه به شیوع روزافزون بیماری‌های قلبی-عروقی و عوارض گسترده آن و به خصوص اهمیت این موضوع در دوران بارداری از یک طرف و نقش NO در عملکرد سیستم قلبی-عروقی از طرفی دیگر، بر آن شدیم تا با انجام این مطالعه، جامعه علمی را در دستیابی به کشف درمان‌های جدید در بیماری‌های قلبی-عروقی، کاهش مرگ و میر ناشی از آن و نیز ارتقای سطح بهداشت باروری یاری نماییم.

#### روش بررسی

در این مطالعه تجربی-مداخله‌ای از ۴۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با وزن متوسط ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم و سن متوسط هشت هفته تهیه شده از انستیتو رازی، استفاده شد. هر پنج سر موش (۱ نر + ۴ ماده) مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت، در یک قفس استیل و در شرایط استاندارد از نظر دما، نور، رطوبت و تغذیه نگهداری شدند. مشاهده پلاک و اژینال نشان از انجام جفت‌گیری بود که به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. موش‌های حامله در پنج گروه کنترل، نرمال‌سالین، L-Arginine، L-NG-Nitroarginine Methyl Ester = L-NAME و مخلوط دو ماده L-Arginine، L-NAME (تهیه شده از شرکت سیگمای آلمان) تقسیم شدند. به جز گروه کنترل بقیه گروه‌ها به ترتیب نرمال‌سالین با دوز ۲ ml/kg L-Arginine، ۲۰۰ mg/kg L-NAME با دوز ۲۰ mg/kg و مخلوط دو ماده L-Arginine و L-NAME را با همان دوزهای مشابه، به صورت تزریق داخل صفاقی در روزهای سوم، چهارم و پنجم دریافت کردند. موش‌ها در روز هجدهم حاملگی با اتر بیهوش و قلب آن‌ها خارج شدند. با توجه به این که حجم قلب بر رشد عضلات، اندازه عروق و عملکرد قلب مؤثر است، جهت تعیین حجم قلب به روش حجم‌سنجی، از یک استوانه مدرج و مایعی با جرم حجمی مشخص مانند آب و برای اندازه‌گیری وزن بافت‌ها از ترازویی با دقت یک صدم گرم استفاده شد. در نهایت نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند و بعد از



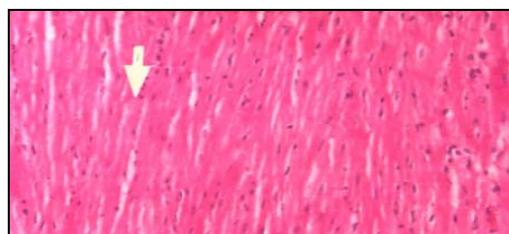
نمودار ۱: مقایسه وزن قلب در گروه‌های مختلف (n=۸, P&lt;۰/۰۱).



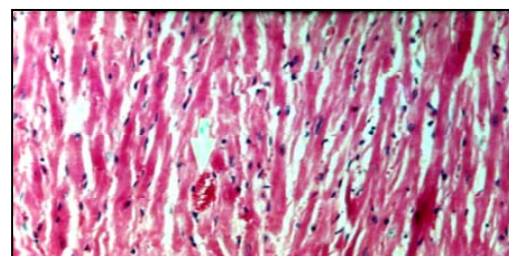
نمودار ۲: مقایسه حجم قلب در گروه‌های مختلف (n=۸, P&lt;۰/۰۱).

## بحث

در بررسی‌های ماکروسکوپی کم‌کی، حجم و وزن گروه L-NAME نسبت به سایر گروه‌ها افزایش یافته، ولی این تفاوت در حجم و وزن قلب بین گروه‌های مختلف معنی‌دار نبود که با نتایج تحقیقات دیگر همخوانی دارد.<sup>۶</sup> این نتایج را شاید بتوان با نقش L-NAME در فعال کردن فیبروبلاست‌ها و به دنبال آن افزایش تولید کلاژن و بافت فیبروز و هیپرتروفی شدن سلول‌ها توجیه کرد. علاوه بر این L-NAME در افزایش آزادسازی سیتوکروم C و آپوپتوز مؤثر است. نتایج این تحقیق نشان داد که تزریق L-Arginine به عنوان پیش‌ساز NO منجر به گشادی عروق (Vasodilation) و احتقان خونی (Congestion) می‌شود که با نتایج تحقیق لیو (Liu P.)<sup>۷</sup> مطابقت دارد. همچنین بسیاری از محققین معتقدند که NO یکی از مهم‌ترین گشادکننده‌های عروق کرونر است.<sup>۹،۸</sup> در تجویز هم‌زمان L-NAME، L-Arginine تغییرات غیرطبیعی در ساختار قلب مشاهده نشد که ممکن است این امر به دلیل اثر مهار



فتومیکروگراف ۱: مقطع طولی از عضله بطنی گروه کنترل (رنگ‌آمیزی و هماتوکسیلین-ائوزین بزرگنمایی ۲۰).



فتومیکروگراف ۲: مقطع طولی از عضله بطنی گروه L-NAME (رنگ‌آمیزی و هماتوکسیلین-ائوزین بزرگنمایی ۲۰).

عروقی و سایر سیستم‌ها مورد بررسی قرار داده‌اند و برخی از محققین اعلام کرده‌اند مسدودکننده‌های NOS باعث مهار بلوغ اووسیت می‌شوند.<sup>۱۴</sup> در مطالعه‌ای دیگر گزارش شده که ماده مذکور بر جسم زرد و فولیکول‌های در حال رشد اثر تخریبی دارد که در حضور استفاده از مهارکننده‌های تولید نیتریک اکساید تعدیل می‌شود.<sup>۱۱</sup>

### نتیجه‌گیری

مصرف L-NAME در دوره بارداری می‌تواند به واسطه کاهش سطح NO باعث تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت قلب شود. علاوه بر این تأثیر NO بر عملکرد سیستم‌های مختلف بدن وابسته به غلظت آن بوده و این نقش دوگانه باعث شده است که از این مولکول به عنوان یک شمشیر دولبه یاد شود.

### References

1. Razavi H.M, Hamilton J.A, Feng Q. Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. *Pharmacology and Therapeutics* 2005; 106: 147-162.
2. Kawahara K, Hachiro T, Yokokawa T, Nakajima T, Yamauchi Y, Nakajima Y. Ischemia/reperfusion-induced death of cardiac myocytes: possible involvement of nitric oxide in the coordination of ATP supply and demand during ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 2006; 40(1):35-46.
3. Mondillo C, Pagotto RM, Piotrkowski B, Reche CG, Patrignani ZJ, Cymeryng CB, et al. Involvement of nitric oxide synthetase in the mechanism of histamine-induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis via histamine receptor subtypes in Sprague-Dawley rats. *Biol Reprod*, 2009; 80(1):144-52.
4. Ganong. William F. Review of Medical Physiology. New York, McGraw-Hill Company, 22th edition. 2005; Chapter 31: 599.
5. Noori SMH, Mahmmoud zadeh Sagheb HR, Heidari Z. [Applied methods and Terminology of Histotechnology, Stereology & Morphology]. 4<sup>th</sup> Ed. ,Tehran; I. R of Iran, University of Medical Sciences Publications. 2013: 65-86. [In Persian].
6. Zanolini M, Faro R, Araujo EG, Guaraldo AM, Antunes E, De Nucci G. Protective effects of BAY 41-2272 on hypertension, heart and cardiomyocyte hypertrophy induced by Chorionic L-NAME treatment in rat. *J Cardiovascular Pharmacol.* 2006; 47(3):391-5.

L-NAME بر تولید نیتریک اکساید حاصل از L-Arginine باشد، این یافته توسط برخی دیگر از محققین نیز گزارش شده است.<sup>۱۱</sup> بنابراین می‌توان اظهار داشت که L-NAME و ترکیبات مشابه آن جهت کاهش آسیب‌های بافتی حاصل از NO مؤثر هستند. بیشترین تغییرات بافتی به دنبال تزریق L-NAME مشاهده شد که در توجیه آن می‌توان به نقش L-NAME در مهار تولید نیتریک اکساید، ایجاد احتقان مویرگی و به دنبال آن حضور فاکتورهای التهابی اشاره کرد، یافته‌های حاصل با نتایج تحقیقات انجام شده در این زمینه همسو است.<sup>۱۲</sup>

پژوهشگران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که کمبود eNOS به نقص در تشکیل عروق کرونری، افزایش آپوپتوز، نقص مادرزادی در دیواره قلبی، کاهش تکثیر کاردیومیوسیت‌ها و در نتیجه سبب هیپرتروفی قلب به صورت جبرانی می‌شود.<sup>۱۳</sup> علاوه بر نتایج این تحقیق مطالعات بسیاری اثر نیتریک اکساید را بر سیستم قلبی-

7. Liu P, Forman J, Carsia R, Hock C E. L-NAME enhances micro circulatory congestion and cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemia/reperfusion in rat. *2002;17(3):185-92.*
8. Guyton A C, Hall J E. *Medical Physiology.* 11th ed. Philadelphia: Elsevier Inc. 2006; 199-200.
9. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45(1):18-31.
10. Karambaksh A, Noori S M H, Hassan Zadeh G R, Tak Zaree N. Excitatory and inhibitory effects of nitric oxide on weight, size, and histological changes of rat cerebellum. *TUMJ* 2013; 70(10): 595-600. [In Persian]
11. Noori SMH, Minaee B, Mehran Nia T, AzarNia M, Shirazi R. The effects of L-Arginine and L-NAME on corpus luteum and growing follicle changes in pregnant rats. *IUMJ*, 2009; 17(4):1-8.
12. Liao X, Liu JM, Tang A, Shang Y, Wang SQ, Chen LY, Chen Q. Nitric oxide signaling in stretch-induced apoptosis of neonatal rat cardiomyocytes. *FASEB J.* 2006; 20(11):1883-5.
13. Yin Liu, Qing ping Feng. NOing the heart: Role of nitric oxide synthase-3 in heart development. *Differentiation* 2012; 84(1):54-61.
14. Voznesenskaia TIU, Blashkiv TV. The effect of NO synthetase blockers, NO donors and anti-ovarian antibodies on murin eoocytes. *Eksp Klin Farmakol.* 2002; 65 (4):30-2.