

## ایجاد مدل حیوانی نارسایی احتقانی قلب و بررسی اثر نیتریک اکسید بر تکثیر عضلات صاف عروق ریوی رتها

محمد رضا بیگدلی \*

### خلاصه:

نیتریک اکسید بوسیله آنزیم نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) از ال - آرژنین به دست می آید و نقش مهمی در تثبیت هموستازی قلب و عروق دارد. نارسایی احتقانی قلب (CHF) عموماً موجب افزایش جریان خون ریوی می شوند و اگر تحت تدابیر درمانی قرار نگیرد اغلب به هیپرتانسیون ریوی و نارسایی قلبی منجر می گردند. از این رو ما در این تحقیق با ایجاد شنت در رتها مدلی از نارسایی احتقانی قلب ایجاد کردیم تا اثر نیتریک اکسید را در نارسایی احتقانی قلب (CHF) و همچنین دیدگاه جدید درمان آترواسکلروز مورد مطالعه قرار دهیم. ما معتقدیم که افزایش جریان خون ریوی بدون تغییرات فشار خون موجب هیپرتروفی عضلات صاف شریانه های ریوی می شود. بنابراین نیتریک اکسید بوسیله میزان جریان خون در گردش خون سیستمیک تنظیم شده، از طریق تغییر بیان ژن نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی تکثیر عضلات صاف را تنظیم می کند.

هدف ما از این آزمایش ایجاد شنت آئرتوکوال در رتها به مدت ۴۹ روز برای افزایش جریان خون ریوی در طول ۷ هفته بوده که این امر موجب رشد قابل توجه دیواره میانی شریانه های ریوی می گردد.

تجزیه و تحلیل نورترن بلات نشان می دهد که سطح mRNA به طور قابل ملاحظه در ششهای شنتی در مقایسه با گروه شاهد تغییر نکرده است. اما پروتئین eNOS در شنت کم افزایش و در شنت زیاد به علت دامیناسیون eNOS - mRNA کاهش می یابد. بنابراین نیتریک اکسید در غلظتهای پایین (۵۰ - ۱۰ میکرومولار) موجب هیپرتروفی ضعیف دیواره میانی شریانه های ریوی می شود و در شنت کم و در غلظتهای بالا (۱۰۰ - ۵۰ میکرومولار) نیتریک اکسید موجب اس - نیتروزیلایسون پروتئین eNOS - دامیناسیون eNOS - mRNA و ژنهای تنظیمی در هسته سلول شده و باعث رشد قابل توجهی در عضلات صاف شریان ریوی در گروه شنت زیاد می شود. در نهایت غلظتهای بالاتر نیتریک اکسید موجب آپوپتوز و کاهش توان بقای سلولی می گردد.

واژه های کلیدی: نیتریک اکسید، شنت زیاد، شنت کم، نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی.

### مقدمه:

اکسید سنتاز بوجود می آید (۱). این واکنش عمدتاً در

سلولهای اندوتلیالی سلولهای عصبی و ماکروفاژها

اتفاق می افتد (۲). از آنجائیکه کار پایه فیزیولوژیک

نیتریک اکسید از طریق فرایند آنزیمی دامیناسیون

ال - آرژنین به ال - سیترولین در حضور آنزیم نیتریک

نیتریک اکسید از سطح آندوتلیوم مجاور سلولهای عضله عبور می‌کند و با فعال کردن گوانیلات سیکلاز و افزایش غلظت cGMP موجب افزایش قطر عروق می‌شود. افزایش جریان خون ریوی بدون تغییر در فشار خون میزان بیان ژن نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی را افزایش می‌دهد. و احتمالاً در تغییر وضعیت عروق ریوی نقش مهمی دارد. افزایش مزمن جریان خون ریوی در موشهای واجد شنت بدون تغییر فشار موجب افزایش ضخامت لایه میانی شریان ریوی می‌شود (۸). بنابراین افزایش جریان خون ریوی بدون افزایش فشار خون محرک قابل ملاحظه‌ای جهت هیپرتروفی بخش مدیال جدار عروق ریوی است.

#### مواد و روشها:

##### الف - شنت آئرتوکاوال

در این مطالعه ابتدا حیوانات بوسیله پنتوباریتال سدیم بیهوش شده آئورت پشتی و وناکاوای تحتانی جدا شده بوسیله عبور دادن سوزن استریل شماره ۲۰ برای شنت زیاد و ۲۲ برای شنت کم از میان وناکاوای تحتانی به داخل آئورت به یکدیگر مرتبط می‌شوند. سوزنها به آرامی داخل عروق شوند تا از تشکیل هماتوم بزرگ در آئورت و وناکاوای جلوگیری شود. سپس شکاف جراحی در پشت مجدداً بسته می‌شود. حیوانات Sham نیز مشابه روش فوق ولی بدون سوراخ کردن آئورت و وناکاوای برای مشاهده میزان تکثیر سلولهای عضله صاف جدار عروق مورد مطالعه قرار می‌گیرد. تعداد حیوانات در گروههای Sham، شنت زیاد و شنت کم، ده عدد بوده است.

##### ب - وسترن بلات

شش هم‌موژنه تحت شرایط دژنره در ژل

نیتریک اکسید بر روی عروق خونی است که با عمل افزایش قطر عروق موجب کاهش فشار خون می‌گردد. اکثر این اثرات بر روی عضلات صاف عروق از طریق cGMP انجام می‌گیرد که در پاسخ به تحریک NO افزایش می‌یابد (۳). همچنین NO به عنوان نروترانسمیتر در مغز و در مکانیسم دفاعی سلولهای ماکروفاژ میزبان شناخته شده است (۱ و ۲). زمانی که سلولهای ماکروفاژ تحریک می‌شوند از طریق فاکتورهایی مانند اینترلوکین ۱- یا  $\alpha$  - TNF با غلظتهای بالایی از NO نقش مهمی در بیماریهای التهابی مفاصل دارند (۳).

یکی از اثرات مهم NO بر روی سلولهای عضلات صاف عروق از طریق فعال کردن گوانیلات سیکلاز است (۴). افزایش غلظت داخل سلولی cGMP در اثر تحریک NO موجب انبساط سلول عضله صاف می‌گردد. افزایش cGMP داخل سلولی ورود یونهای کلسیم را مهار کرده به طور فعال یونهای کلسیم را از سلول خارج می‌کند. کاهش کلسیم درون سلولی می‌تواند PKC را غیر فعال کند و بدین ترتیب تکثیر سلولی وابسته به پروتئین کیناز C مهار می‌شود (۵). سطوح آستانه غلظت cGMP در فعالیت پروتئین کینازهای وابسته به cGMP بویژه زمانی که مقادیر این آنزیمها کاهش می‌یابد بسیار حائز اهمیت است. برای مثال سنتز DNA در انواع معینی از سلولهای مزانشیال مانند فیبروبلاست هامستر چینی (۶) و سلولهای کلونال RACS-1 (۷) واجد گوانیلات سیکلاز نسبت به NO غیر حساس می‌شود. نیتریک اکسید در سلولهای اندوتلیال ریوی نیز از اسید آمینه ال - آرژنین و مولکول اکسیژن در حضور آنزیم نیتریک اکسید سنتاز تولید می‌شود.

PAGE - SDS ۷/۵٪ جدا شده و سپس بلات کردن پروتئین‌ها بر روی نیتروسلولوز (Bio-Rad Bur lingama, CA) انجام می‌گیرد. بلاتها به مدت یک ساعت در دمای اتاق و غلظت ۵۰ میلی مولار اسید کلریدریک pH ۷/۴ و کلرید سدیم ۱۵٪ مولار BSA ۲٪ بلوک می‌شود. سپس بلاتها را با یک آنتی بادی eNOS موشی به مدت یک ساعت (غلظت ۱:۵۰۰ Transduction Laboratoris Lexington, K2) در دمای اتاق انکوبه می‌کنیم. سپس در دمای اتاق شستشو داده با یک anti-mouse IgG متصل به پراکسیداز به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه می‌شوند (Bio-Rad) و بدین ترتیب هر پروتئین eNOS از طریق اتصال به آنتی بادی مذکور در بلات مشخص می‌گردد.

#### نتایج:

ایجاد شنت شریانی - وریدی بین آئورت پشتی - فوقانی با وناکاواي تحتانی مطابق روش Garcia Diebold, تحمل حیوانات را به مقدار بالایی افزایش می‌دهد (۱۱). همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است افزایش بخش مدیال عروق در مقایسه با گروه Sham خیلی کم بوده است. (کمتر از ۵۰ میکرومتر) و لایه انیتما بدون تغییر باقی مانده است. یک افزایش قابل ملاحظه‌ای ۹۰-۴۰ و ۸۰-۱۹۰ میکرومتر در قطر شنت زیاد دیده می‌شود که موید افزایش ناحیه مدیال در نتیجه هیپرپلازی عضلات صاف است که دارای  $p < 0.05$  است و اثر قطعی آن تأیید می‌گردد.

در گروه شنت زیاد افزایش جریان خون ریوی موجب تغییر بیان ژن eNOS و میزان eNOS-mRNA و پروتئین eNOS در مقایسه با

حیوانات Sham می‌شود. مطابق شکل ۲ تجزیه و تحلیل وسترن بلات نشان می‌دهد که اختلاف قابل توجهی بین میزان پروتئین eNOS در ششهای حیوانات Sham و دو گروه شنت کم و زیاد وجود دارد. بطوریکه در شنت کم میزان پروتئین eNOS افزایش در شنت زیاد کاهش می‌یابد. در صورتیکه میزان eNOS - mRNA مطابق تحلیل نورترن بلات در حالت‌های شنت کم و زیاد و گروه Sham بطور قابل ملاحظه تغییر نکرده است بنابراین می‌توان چنین بیان کرد که افزایش NO موجب هیپرپلازی عضلات صاف ناحیه مدیال می‌گردد علاوه بر این NO با اثر دامپینگ بر روی eNOS-mRNA و اس - نیتروزیلاسیون بر پروتئین eNOS می‌تواند تغییراتی در بیان ژن و سطح eNOS-mRNA و پروتئین eNOS گردد.

#### بحث:

تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که eNOS دو نقش اصلی در پاسخ عروق ریوی در اثر افزایش جریان خون ریوی دارد اولاً: با افزایش بیان ژن در شریانهای کوچک موجب تسهیل پذیرش و تثبیت تحمل جریان خون می‌شود. ثانیاً: رشد سلولهای عضلات صاف عروق ریوی را تنظیم می‌کند. از این رو افزایش جریان خون به تنهایی نقش تنظیمی مهمی در eNOS ریوی ندارد. پس تنظیم eNOS بوسیله جریان خون از طریق اختلاف فشار اکسیژن بین آئورت و شریانهای ریوی صورت می‌گیرد (۸). هیپوکسی مزمن موجب افزایش را پروتئین eNOS و بیان ژن eNOS - mRNA در رتها می‌گردد (۱۰).

نیتریک اکسید با تحریک گوانیلات سیکلاز در عضله

Fig 1 : Measurement of pulmonary artery medial layer in sham and shunt lungs (  $p < 0.05$  )

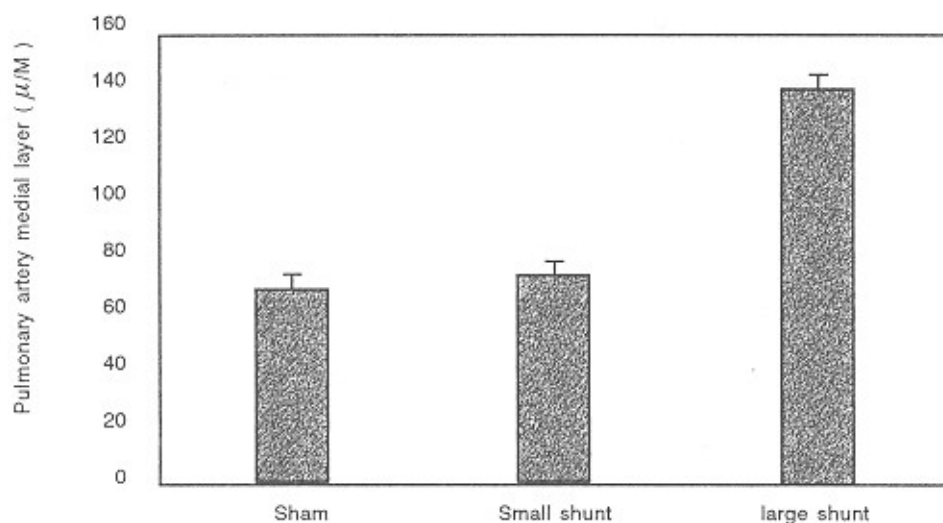
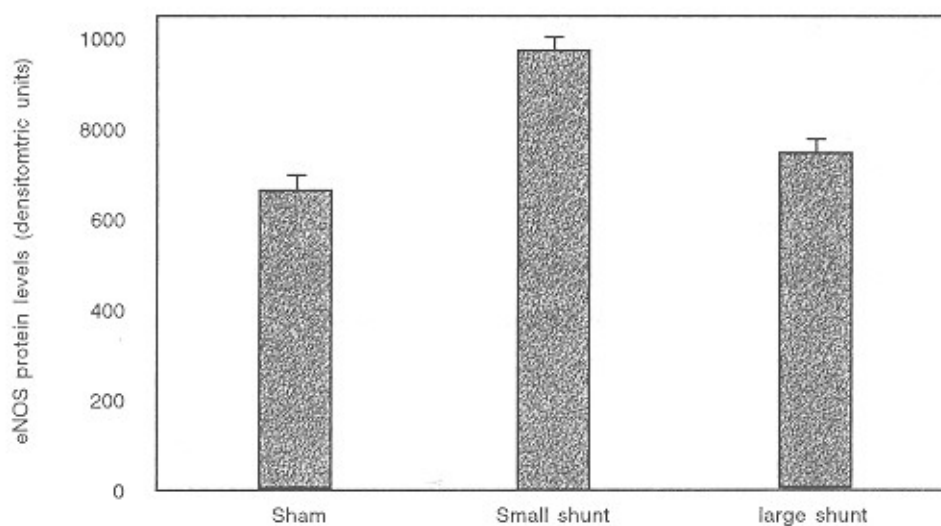


Fig 2 : Western blot analysis of endothelial nitric oxide synthase



صاف نقشهای گوناگونی بازی می‌کند. مثلاً با کاهش یون کلسیم باعث گشادی عروق می‌گردد. همچنین در غلظتهای بالای نیتریک اکسید در سلولهای مختلف اثر سیتوتوکسیک و پروآپتوتیک و در غلظتهای پائین تر اثر محافظ آپوپتوتیک دارد (۱۲ و ۱۳). اثرات شناخته شده وابسته به cGMP آن عبارتند از: تغییر پروتئین هایی که دارای اسید آمینه سیستئین هستند که از طریق اس - نیتروزیلایسون (واکنش گروههای سیستئین با نیتریک اکسید) منجر به تغییرات بعد از ترجمه پروتئین ها یا با دامیناسیون موجب صدمه به DNA می‌شود. نیتریک اکسید در غلظتهای ۵۰۰ - ۱۰۰ میکرومولار با قطعه قطعه کردن DNA موجب آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلولی) و کاهش توان بقای سلولی می‌گردد.

الغرض، اختلاف فشار اکسیژن بین آنورت و شریانهای ریوی از طریق افزایش جریان خون سبب افزایش بیان ژن eNOS می‌شود. Sessa و همکارانش نشان دادند که ورزش به مدت ۱۰ روز موجب افزایش eNOS - mRNA در اندوتلیال آنورت و افزایش فعالیت eNOS در شریانهای کرونری اپیکاردیال می‌شود. همچنین Nadaud و همکارانش نشان دادند که پروتئین eNOS - mRNA در رتها بعد از ایجاد شنت a-v افزایش می‌یابد. بنا بر شواهد مذکور ما پیشنهاد می‌کنیم که NO حاصل از پروتئین eNOS در غلظت پایین (۵۰ - ۱۰ میکرو مولار) موجب هیپرتروفی جدار مدیال شریانهای ریوی در شنت کم می‌شود و موجب افزایش پروتئین eNOS در اثر افزایش ترجمه پروتئین و بیان ژن eNOS و در غلظتهای بالا از NO (۵۰-۱۰۰ میکرو مولار) موجب اس نیتروزیلایسون پروتئین eNOS و دامیناسیون eNOS - mRNA (از دست دادن رمز و عدم

شناسایی و ترجمه بدین ترتیب کاهش پروتئین شنت eNOS در شنت زیاد) و دامیناسیون ژنهای تنظیمی در هسته سلول باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در ضخامت لایه مدیال شریانهای ریوی در شنت زیاد می‌گردد. ایجاد شنت زیاد شریانی - وریدی سیستمیک نه تنها موجب تکثیر عضلات صاف و افزایش ترنور (Turnover) سلولهای اندوتلیال شریانهای ریوی شده بلکه موجب افزایش وزن قلب، ریه و نسبت وزنه‌های قلب و ریه به بدن می‌شود ( $P < 0.05$ ; 2-fold >) افزایش معنی دار وزن قلب و ریه در حیوانات شنتی رادر مقایسه با گروه Sham را نشان می‌دهد. در غلظتهای بالاتر (۵۰۰ میکرومولار) NO بطور مستقیم از طریق دامیناسیون سیتوزین به اوراسیل در سطح انبوه موجب آسیب شدید به DNA و کشیدن ماشه آپوپتوز سلولی می‌شود.

#### کتابنامه:

- 1 - Marlto, M.A. Nitric Oxide synthase structure and mechanis. J.Biol Chem. 268, step simultaneous isolation of RNA. DNA and protein from cell and tissue samples. Biotechniques 15: 532-537, (1993).
- 2 - Moncada, S., Palmer, R.M.J., and Higgs, E.A. Nitric Oxid: Physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43, 109-142. (1991)
- 3 - Ignarro, L.J., and Kadowitz, P.J. The pharmacological and physiological role of Cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol 25, 171-191. (1985)
- 4 - Feelisch, M. and Noack, E.A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylat cyclase. J. Pharmacol

- 139, 16 - 20.(1987)
- 5 - Owen , N.E.Effect of TPA on ion flux and DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. J.Cell Boil. 101 , 454-459. (1985).
- 6 - Nakaki , T., Nakayama , M., and Kato , R . Inhibition by nitric oxide producing vasodilators of DNA syntesis in vascular smooth mascle cells . Eur.J.Pharmacol. 189, 347-353.(1990)
- 7 - Nakaki , T., Nakayama , M., Yamamoto, S. and Kato , R. $\alpha_1$  adernergic stimulation and  $\beta_2$  - adernergic inhibition of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells , Mol . Pharmacol.37,30-36.(1990).
- 8 - Allen .D., Everett , Timothy D.Le Cras, Chun Xue , Roger A.Johns.eNOS expression is not alteted in pulmonary vascular remodeling due to increated pulmomary blood flow .Am.J. 274 (lung cell. Mol.Physiol.18) L 1054-L 1065 ,(1998).
- 9 - Chomzynski , P.A reagent for the single - step simultaneous isolation of RNA. DNA and protein from cell and tissue samples. Biotechniques 15: 532 - 537 ,(1993).
- 10 - Le Cras,T.D.,C.Xue, A. Rengasamy . and R.A. Johns, Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible nitric oxide synthase gene and protein expresion in rat lung. Am. J.Physiol.270(Lung cell. Mol .Physiol.14) L 164 1170,(1996).
- 11 - Garcia , R., and S. Diebold. Simple, rapid aoriocaval shunts in the rat. Cordiovasc . Res 24:430 - 432 ,(1990).
- 12 - Dimmeler, S., Haendeler,J., Nehls, M., and Zeiher,A.M. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of ICE-like and CPP 32-like proteases .J.Exp.Med. 185, 601 - 608 ,(1997).
- 13 - Judith Haendeler, Ulrike Weiland, Andreas M. Zeiher and Stefanie Dimmeler .Effect of redox-rlated congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity , J.Nitric oxid : Biology and Chemestry, 14,282 -293 (1997).
- 14 - Stamler, J.S., Simon,D.I., Osborne ,J.A, Mullins . M.E., Jaraki, O.Michel, T. singel, D.2., and Loscalzo , J S- nitrosylation of protein with nitric oxide synthesicand characterizaltion of biologically active compounds .Proc .Natl . Acad. Sci USA 89, 444 - 447,(1992).
- 15 - Stefanie Dimmeler and Andreas M.Zeiher, Brief review nitric oxide and apoptosis : Another paradigm for the double - edged role of nitric oxided.J.Nitric oxide: Biology and chemistry (1997)
- 16 - Chang - Shine park. Hyun-sil Lee, Hei-Yung Lee.and Gopal Krishma .An unprocessed pseudogene of inducible nitric oxid synthase gene in human.J.Nitric oxide : Biology and chemistry 14, 294-300 (1997).
- 17 - Sharon Aberle.Tish Ann Young, Poonam Molberry, John Parkinson , Gobor and effective method of producing M.Rubanyi , and Katalin Kauser, Quantitative measurement for endothelial constitutive Nitric oxide synthuse in cultrued human endothelial cells, Nitric Oxide Biology and chemistry 18,226-233 (1991).

- 18 - Huwen Zhang ,Giuseppe L. Squadrito and William A. Pryor, The mechanism of theperoxynitrite- carbon dioxide reaction probed using tyrosing .Nitric Oxide , Biology and chemistry ,14 . 301 - 307 (1997).
- 19 - Chomozynski,P.A reagent for the single - Cathleen A. Davidson, Pawel M.Kaminski and Micheal S.Wolin Endogenousis .139,16-20.(1987) peroxynitrite generation causes a subsequent suppression of coronary arterial contraction to serotonin. Nitric Oxide: Biology and chemistry , 13 , 244 - 253 (1997).
- 20 - Adbel - Majid Khatib , Geraldine siegfride , Maritza Quintero , and Dragoslav R. Mitrovic , The mechanism of inhibition of DNA synthesisin articular chondrocytes from Young and Old rats by nitric Oxide, J.Nitric Oxide , Biology and chemistry 13 , 218-225 (1997).