Archive of SID

بررسی اثرات فیزیولوژیک عصاره پپتید ناتریورتیک دهلیزی (*ANP*) بر روی موش هایی که کتوکونازول دریافت کرده اند

افسانه رنجبر[۱]، دکتر مهدی نعمت بخش[۲]

چکیده

سابقه و هدف: پپتید ناتریورتیک دهلیزی (ANP) نوعی هورمون پپتیدی با ۲۸اسیدآمینه می‌باشد که در زمان کشش دهلیزها به داخل خون آزاد می شود.تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که گلوکوکورتیکوئیدها باعث بیان ژن ANP می‌شوند و سطح آن را افزایش می‌دهند. کتوکونازول نوعی داروی آنتی‌آدرنال است که میزان گلوکوکورتیکوئیدها را کاهش داده و در نتیجه میزانANP سرم کم می‌شود. لذا به منظور تعیین اثرات فیزیولوژیک عصاره ANP، این تحقیق روی موش‌هایی کتوکونازول که دریافت نموده‌اند، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر از دهلیز قلب انسان برای تهیه عصاره ANP استفاده شد. برای تهیه عصاره بافت، آن را در حلال خاصی جوشانیده تا پروتئازهای آن غیر فعال شود و بعد بافت مورد نظر در ٤درجه سانتی‌گراد هموژنه و سانتریفوژ شد. جهت تنظیم PH عصاره، عمل دیالیز بر روی آن انجام گرفت.

یافته‌ها: فشار نبض و فشار سیستولی و دیاستولی در موش‌هایی که کتوکونازول دریافت نموده بودند بالاتر از گروههای کنترل بود. به نظر می‌رسد که این پدیده به دلیل کاهش کامپلیانس عروق رخ می‌دهد. تزریق عصاره دهلیز قلب انسان به موش باعث کاهش فشار خون شریانی می‌شود و این کاهش با شیب ملایمی انجام می‌شود.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: به نظر می‌رسد که از ANP بتوان در بهبود بیماران مبتلا به آرتریواسکلروز استفاده کرد.

واژگان کلیدی: ANP، عصاره دهلیز قلب انسان، گلوکوکورتیکوئید، کتوکونازول

۱ – گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی جهرم

۲ – گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

www.SID.ir

www.SID.ir

مقدمه

پپتید ناتریورتیک دهلیزی (ANP[1]) هورمونی پپتیدی با ۲۸اسید آمینه است که از میوسیت‌های دهلیز در زمانی که جدار آنها تحت‌کشش قرار می‌گیرد به داخل خون آزاد می‌شود.ANP دارای یک سری اثرات فیزیولوژیک بر روی بدن است که عبارتند از گشاد شدن عروق از طریق شل شدن عضله صاف جدار آن، افزایش دفع ادراری سدیم و آب از طریق کلیه‌ها(۱)، مهار سنتز آلدوسترون از طریق مهار انتقال کلسترول به سیتوکروم P٤٥٠ در غشاء درونی میتوکندری (۲و۳)، کاهش ترشح رنین و در نهایت کاهش تولید آنژیوتانسین II خون(٤). ژن سنتزکننده و کنترل‌کننده این هورمون بر روی بازوی کوتاه کروموزم شماره یک قرار دارد. این ژن شامل ۳اکسون (pepdide coding region) است که به وسیله دو اینترون (Intevenig saquance) جدا می‌شود. اکسون۱ قسمت leader squance را کد می‌کند که برای هر پپتید ترشحی لازم است. اکسون۲ قسمت فعال مولکول را کد می‌کند و اکسون۳ فقط تیروزین موجود در انتهای کروبوکسیل را کند می‌کند(۵).

گلوکوکورتیکوئیدها بر روی بیان ژن ANP اثر دارند و دارای گیرنده‌ای در اینترون ۲ هستند که از این طریق میزان نسخه‌برداری DNA را کنترل می‌کنند. اهمیت گلوکوکورتیکوئیدها بر روی بیان ژن ANP توسط یک سری تحقیقات بر روی موشهای فاقد غده آدرنال تأیید شده است. این موشها قادر نیستند در جواب افزایش فشار دهلیز میزان ترشح ANP خود را بالا ببرند، مگر آنکه با گلوکوکورتیکوئیدها و یا میزالوکورتیکوئیدها درمان شوند(٦و۷).

کتوکونازول ساخت استروییدهای غدهٔ فوق کلیوی را مهار می‌کنند و ANP در تنظیم سدیم، پتاسیم، حجم خون و فشار خون نقش دارد. با توجه به اینکه ارتباطات گسترده‌ای بین گلوکوکورتیکوئیدها و سطح ANP سرم وجود دارد و در کتب مرجع این ارتباطات نادیده گرفته می‌شود و یا فقط کلیاتی از آنها ارائه گردیده است، در تحقیق حاضر موقعیت این ارتباطات مورد بررسی قرار می‌گیرد. از آنجایی که ANP خالص در کشور تولید نمی‌شود و تهیه آن از خارج هم مستلزم صرف هزینه بسیار بالایی است، در این آزمایش از عصاره دهلیز قلب انسان به جای ANP خالص استفاده شده است و چون ANP انسان و موش شباهت زیادی از لحاظ ترتیب اسید آمینه با یکدیگر دارد(۸و۹) به منظور تعیین تأثیر فیزیولوژیک عصاره ANP بر تغییرات فشارخون شریانی پرسش‌هایی که کتوکونازول دریافت نموده‌اند، این تحقیق انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در دو مرحله انجام گرفت:

در مرحله اول تحقیق به روش Exploratory survey و به منظور تهیه عصاره دهلیز قلب انسان بود. در مرحله دوم به روش Experimental این عصاره به موش تزریق و تغییرات فشارخون شریانی در یک دوره ۵۰ دقیقه‌ای بررسی شد.

برای تهیه عصاره دهلیز قلب انسان ٤٠گرم از بافت دهلیز انسانی که بیش از ۱۰ساعت از مرگ وی نگذشته بود را برداشته و برای غیرفعال نمودن پروتئازهای این بافت به مدت ۵دقیقه در محلولی ۷برابر حجم بافت جوشانیده شد. این محلول حاوی ۱مولار اسیداستیک به همراه ۲۰میلی‌مولار اسیدکلریدریک بود. محلول خنک‌شده در ٤درجه سانتی‌گراد هموژنه شده و پس از آن به مدت ۳۰دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید (۱۰). بعد از سانتریفوژ مایع رویی را برداشته و به منظور تنظیم PH عصاره، دیالیز می‌شود برای دیالیز ابتدا کیسه دیالیز آماده شد و به مدت ۱۵دقیقه در

[1]- Atrial Natriuretic Peptide

Archive of SID

Archive of SID

محلولی که حاوی ۱۰گرم در لیتر کربنات سدیم همراه با یک میلی‌مول EDTA بود قرار گرفت. سپس کیسه به مدت ۱۰دقیقه در آب مقطر جوشانیده و بعد از آن در آب مقطر سرد نگهداری شد. بعد از آماده‌سازی کیسه دیالیز عصاره در کیسه ریخته شده و در ارلن حاوی محلول دیالیز قرار داده شد. حجم محلول دیالیز ۱۰۰برابر حجم عصاره موجود در کیسه بود. محلول مورد استفاده در دیالیز شامل ۰/۲ مولار بی‌کربنات سدیم و ۰/۱۵ مولار کلریدسدیم بود. کیسه حاوی عصاره در دو نوبت ابتدا به مدت ۸ساعت و سپس به مدت ۲٤ساعت در محلول قرار گرفت. دیالیز در دمای ٤درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. بعد از انجام دیالیز دوباره عصاره در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی همان عصاره دهلیز حاوی ANP بود که در یخچال نگهداری شد.

در مرحله دوم عصاره به موش تزریق گردید. در این مطالعه از موشهای سفید آزمایشگاهی نر بالغ با وزن ۲۵۰ – ۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در قفسهای ده‌تایی در اتاقی با درجه حرارت۲۰±۲۱ و چرخه نوری کنترل شده نگهداری می‌شدند و به آب و غذا دسترسی کامل داشتند. به مدت ٤روز کتوکونازول با دوز ۱۰۰mg/kg/day از طریق صفاق به حیوان تزریق شد. به علت اینکه کتوکونازول در سرم فیزیولوژی حل نمی‌شود در برای تزریق ۰/۵cc میتل کربوکسی سلولز حل شد. موش‌هایی که کتوکونازول دریافت نمودند به دو گروه تقسیم شدند. به گروه شاهد، ۱cc سرم فیزیولوژی و به گروه مورد ۱cc عصاره دهلیز قلب انسان تزریق شد. پس از بیهوشی با سدیم فنل باربیتال با دوز ۶۰mg/kg، از طریق تراشه به دستگاه تنفس مصنوعی وصل و ورید ژوگولار و شریان رانی ایزوله و هر دو کانول شد.

تزریقات هر دو گروه شاهد و مورد از طریق ورید ژوگولار و اندازه‌گیری فشارخون توسط فیزوگراف از طریق شریان رانی انجام گرفت. مدت هر آزمایش یک ساعت پس از تزریق عصاره بود.

تغییرات فشارخون شریانی (سیستولی و دیاستولی) ۲گروه در قبل از تجویز ANP و به فاصله ۵دقیقه به ۵دقیقه بررسی شد.

یافته‌ها

تحقیق روی ۱۰ موش و در ۲گروه ۵نفری انجام گرفت. در جدول۱ میزان فشار سیستولیک و دیاستولیک نمونه‌ها به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه در قبل و بعد از تزریق عصاره ANP ارائه شده است و نشان می‌دهد در موش‌هایی که کتوکونازول دریافت کرده‌اند، ترشح گلوکوکورتیکوئیدها مهارشده، ANP سرم کاهش یافته و میزان فشارخون افزایش یافته است، اما افزایش فشارسیستولی بیش از فشار دیاستولی است.

جدول ۱ – میانگین (± میانگین انحراف معیار) فشارخون موش‌های دریافت کننده کتوکونازول در قبل و بعد از تزریق عصاره ANP (گروه مورد) یا سرم فیزیولوژی (گروه شاهد)

گروه‌ها / زمان‌بندی	شاهد		مورد	
	فشار سیستولی mmHg	فشار دیاستولی mmHg	فشار سیستولی mmHg	فشار دیاستولی mmHg
دقیقه پیش از تزریق	۱۶۰±۷/۴	۱۱۰±۵	۱۶۰±۷/۴	۱۱۰±۵
۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۶۵/۶±۵	۱۱۰±۸/۹	۱۶۵/۶±۵	۱۱۰±۸/۹
۱۰دقیقه بعد از تزریق	۱۶۵±۱۰/۷۷	۱۱۰/۶۶±۸/۱۲	۱۶۵±۱۰/۷۷	۱۱۰/۶۶±۸/۱۲
۱۵دقیقه بعد از تزریق	۱۶۰±۷/۱۵۳	۱۰۰±۸/۶۸	۱۶۰±۷/۱۵۳	۱۰۰±۸/۶۸
۲۰دقیقه بعد از تزریق	۱۶۰±۷/۳۶ ۱۵۹	۱۰۰±۹۰/۹۳	۱۶۰±۷/۳۶ ۱۵۹	۱۰۰±۹۰/۹۳
۲۵دقیقه بعد از تزریق	۱۶۰±۵/۳۶	۱۰۰±۹/۹۳	۱۶۰±۵/۳۶	۱۰۰±۹/۹۳
۳۰دقیقه بعد از تزریق	۱۶۰±۹/۷۹	۱۰۰±۱۱/۳۱	۱۶۰±۹/۷۹	۱۰۰±۱۱/۳۱
۳۵دقیقه بعد از تزریق	۱۶۰±۱۰/۱۳ ۱۵۹	۱۰۰±۱۰/۸۷	۱۶۰±۱۰/۱۳ ۱۵۹	۱۰۰±۱۰/۸۷
۴۰دقیقه بعد از تزریق	۱۶۰±۱۳/۰۶	۱۰۰/۱۱±۱۰/۹	۱۶۰±۱۳/۰۶	۱۰۰/۱۱±۱۰/۹
۴۵دقیقه بعد از تزریق	۱۶۰±۱۳/۰۶	۱۰۰±۱۲/۱۱	۱۶۰±۱۳/۰۶	۱۰۰±۱۲/۱۱
۵۰دقیقه بعد از تزریق	۱۶۲/۷±۱۲/۱۱	۱۰۲/۱۷±۲۱/۱۷	۱۶۲/۷±۱۲/۱۱	۱۰۲/۱۷±۲۱/۱۷

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۲ همین تغییرات را برای موش‌هایی دریافت‌کننده متیل کربوکسی سلولز پس از تزریق عصاره دهلیز قلب و یا سرم فیزیولوژی نشان می‌دهد. همانطور که ملاحظه می‌شود میزان تغییرات در گروه مورد به مراتب بیشتر از گروه شاهد است.

جدول ۲: میانگین (± انحراف معیار) فشار خون موش های دریافت کننده متیل کربوکسی سلولز در قبل و بعد از تزریق عصاره ANP (گروه مورد) یا سرم فیزیولوژی (گروه شاهد)

گروه / زمان	شاهد(N=5)		آزمایشی(N=5)	
	فشار سیستولی mmHg	فشار دیاستولی mmHg	فشار سیستولی mmHg	فشار دیاستولی mmHg
قبل از تزریق	۱۴۸±۸	۱۱۲±۰	۱۵۰/۶۶±۱/۸۸	۱۷/۳۳±۱/۸۸
۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۶±۴	۱۱۴±۲	۱۴۱/۳۳±۱۱/۴۶	۱۱۰/۶۶±۱/۸۸
۱۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۶±۴	۱۶۶±۴	۱۵۰/۶۶±۳/۷۷	۱۱۲±۵/۶۲
۱۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۶۰±۸	۱۱۸±۲	۱۵۰/۶۶±۳/۷۷	۱۱۳/۳۳±۹/۹۷
۲۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۸±۲	۱۱۸±۲	۱۲۵/۳۳±۴۰/۵۷	۹۳/۳۳±۱۰/۵۷
۲۵ دقیقه بعد از تزریق	±۱۶ ۱۵۸	۱۱۶±۴	۱۳۲±۱۰/۱۳	۹۷/۳۳±۱۰/۸۳
۳۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۸±۲	۱۱۸±۶	۱۱۶±۵۷/۰	۱۰۹/۳۳±۲۷/۱۹
۳۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۸±۲	±۲۴ ۱۱۶	۱۴۰±۲۹/۰۲	۱۰۸±۲۵/۹۳
۴۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۶±۴	۱۱۶±۴	۱۴۴±۳۳/۱۴	۱۱۰/۶۶±۲۸/۵۳
۴۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۸±۶	۱۱۶±۴	۱۴۱/۳۰±۲۹/۶۰	۱۱۴/۶۶±۳۰/۳۰
۵۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۸±۶	۱۱۶±۴	۱۴۴±۳۲/۲۰	۱۰۹/۳۳±۲۷/۲۰

بحث

(ANP) پپتید ناتریورتیک دهلیزی (ANP) هورمونی پپتیدی با ۲۸اسید آمینه است که از میوسیت‌های جدا دهلیز در زمانی که تحت کشش قرار می‌گیرند به داخل خون آزاد می‌شود. ANP پس از ورود به خون به بافتهای هدف خود از قبیل کلیه‌ها، غده آدرنال و عضلات صاف سیستم عروقی رسیده و اثراتی را در جهت تنظیم سدیم، پتاسیم، حجم خون، و فشار خون اعمال می‌کند. در این تحقیق از عصاره دهلیز قلب انسان به جای ANPخالص استفاده شده است. عصاره دهلیز قلب انسان بر روی موش مؤثر است. تحقیقات گذشته نشان می‌دهد کهANP انسان و موش شباهت زیادی از لحاظ ترتیب اسید آمینه با یکدیگر دارند، به طوری که در موقعیت ۱۲ در انسان اسید آمینه متیونین ولی در موش ایزولوسین است و بقیه ساختمان شبیه یکدیگر است. این تفاوت اندک در فعالیت بیولوژیکی تأثیر چندانی ندارد(۹ و۱۰).

کتوکونازول نوعی داروی آنتی‌آدرنال است که باعث مهار ترشح گلوکوکورتیکوئیدها می‌شود. تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که گلوکوکورتیکوئیدها بر روی بیان ژن ANP تأثیر دارند و باعث افزایش سطح ANP سرم می‌شوند (۶و۷). ANP باعث شل شدن عضله صاف جدار رگ و افزایش کمپلیانس سیستم عروقی می گردد. اتصال ANP به گیرنده‌های سطحی باعث فعال شدن آنزیم گوانیلات سیکلاز می‌شود که فعالیت این آنزیم، غلظت گوانوزین مونوفسفات حلقوی (CGMP) افزایش می‌دهد. cGMP پروتئین کیناز را فعال می‌کند، که این آنزیم به نوبه خود باعث افزایش فعالیت پمپ کلسیم در قشرهای سلول می‌گردد که نتیجه امر کاهش کلسیم داخل سلولی است. خروج کلسیم از سلول سبب شل شدن عضله صاف می‌شود. از طرف دیگر ANP با کاهش کلسیم داخلی سلولی از اثر تنگ‌کنندگی آنـــژیوتانسین II (AgII) جلوگیری می‌کند. AgII با فعال کردن فسفولیپاز C و افزایش کلسیم

www.SID.ir

Archive of SID

داخلی سلولی سبب انقباض عضله صاف و تنگ شدن رگ می‌شود.

ANP با کاهش ترشح رنین تولید **AgII** را کاهش می‌دهد که این مسئله به گشاد شدن بیشتر عروق کمک می‌کند. افزایش **cGMP** در سلولهای عضله صاف زنجیره سبک میوزین را دفسفریله می‌کند که این مسئله نیز باعث شل شدن عضله صاف و افزایش کمپلیانس عروق می‌شود(۱و۱۱).

در این تحقیق مشاهده شد در موشی که کتوکونازول دریافت کرده است، ترشح گلوکوکورتیکوئیدها مهار شده و **ANP** سرم کاهش یافته است این امر منجر به کاهش کامپلیانس عروق می‌شود و فشار سیستولی و دیاستولی هردو افزایش می‌یابند اما افزایش فشار سیستولی بیش از افزایش فشار دیاستولی است، در نتیجه فشار نبض افزایش می‌یابد و حالتی شبیه به آرتریواسکلروز ایجاد می‌گردد.

در آرتریواسکلروز فشار نبض به علت کاهش کامپلیانس سیستم عروقی بالا است و هر دو فشار سیستولی و دیاستولی افزایش می‌یابند. در موش‌هایی که کتوکونازول دریافت نموده‌اند در اثر تزریق عصاره دهلیز قلب، کاهش فشار به آرامی و با شیب ملایمی صورت می گیرد، و می‌توان بیانگر این موضوع باشد که **ANP** احتمالاً در کاهش فشار بیماران مبتلا به آرتریواسکلروز مؤثر است(۱و ۱۱و۱۲).

REFERENCES

1. Brenner BM, Ballermnn BJ, Cunning ME, Zeidel ML. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. Physiological 1990; 70: 665-87.

2. Butlen D, Mistaout M, Morel F. Atrial natriuretic peptide receptors along rat and rabbitde binding in microdissected glomeruli and tubules. P Fluegers 1987; 408: 356–65.

3. Chanderbhan RR, Kharroubi AT, Noland BJ, et al. Sterol carrier protein 2: further evidence for its role in adrenal steroidogensis. Endoc Res 1986; 12: 351-70.

4. Opgenorth TA, Burnett JC, Granger. JR, Scriven TA. Effects of atrial natriuretic peptide on rennin secretion in nonfiltering kidney. Am J Physiol 1986; 250 (19): F798-F801.

5. Sedan CE, Bloch KD, Zisfein J, et al. Molecular studies of the atrial natriuretic factor gene. Hypertension Dallas 1985; 7(suppl 1): 131–34.

6. Gardner DG, Hane S, Trachewsky D, et al. Atrial natriuretic peptide mRNA is regulated by glucocorticoids in vivo. Biochec Biophys Res Commun 1986; 139: 1047–54.

7. Garcia R, Debinski W, Cutkowski J, et al. Gluo- and mineralocorticoids may regulate the natriuretic effect and the synthesis and release of atrial natriuretic factor by the rat atria in vitro. Biochem Biophys Res Commun 1985; 131: 806–14.

8. Oikawa S, Imal M, Ueno AT, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor of human atrial natriuretic polypeptide. Nature 1984; 309: 724–26.

9. Kangawa K, Fukuda A, Matsuo H. Structural identification of human atrial natriuretic polypetides. Nature 1985; 397: 313–97.

10. Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of Human atrial natriuretic polypeptide (hANP). Biochem Biophys Res Commun 1984; 118: 131–39.

11. Akkerf V, Zhang X, Huox M, et al. Structure of the dimerized hormone binding domain of guanyly cyclase coples receptor . Nature 2000: 406: 701-04.

12. Yalin FA, Fatma Gaksoy, Sabah I, et al. Treatment of hypertension with perindopril reduces plasma atrial natriuretic peptide levels, left ventricular mass, and improves echocardiographic parameterd of diastolic function. Clin Cardiol 2000; 23: 437-41.

www.SID.ir