

مقاله پژوهشی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

جلد دوم، شماره سوم و چهارم تابستان و پائیز ۱۳۸۲

اثر تنظیمی هورمونهای استروئیدی تخمدانی بر تولید نیتریک اکساید

علی گل^۱، محمد صوفی آبادی^۲، مهدی عباس نژاد^۳، محمد رضا پرویزی^۴

خلاصه

سابقه و هدف: نیتریک اکساید مولکولی است که در بسیاری از فرایندهای بیولوژیک بدن نقش دارد. عوامل مختلفی در تنظیم تولید نیتریک اکساید دخالت داشته و به نظر می‌رسد هورمون‌های جنسی استروئیدی هم اثر تنظیمی بر تولید آن داشته باشند، این مطالعه به منظور تعیین اثر هورمون‌های پروژسترون و استروژن بر میزان تولید نیتریک اکساید در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان انجام گردید.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۲۰ سر موش صحرایی ماده بصورت دو طرفه اوارکتومی شده و ۱۴ روز پس از عمل جراحی، به سه گروه تقسیم شدند: گروه پروژسترون که هورمون پروژسترون را به میزان ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بصورت زیر جلدی دریافت کردند، گروه استروژن که داروی استرادیول بنزوات را به میزان ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم بصورت زیر جلدی دریافت نمودند و گروه پروژسترون-استروژن که هر دو هورمون با مقادیر فوق به آنها تزریق گردید، علاوه بر این هورمون‌ها در هر گروه از پیش ساز نیتریک اکساید (ال-آرژنین) به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بصورت داخل صفاقی، هم‌چنین مهارکننده رقابتی آنزیم مولد نیتریک اکساید (ال-نیم) با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بصورت داخل صفاقی و حلال داروها (گروه کنترل) استفاده شد. ۶ ساعت پس از تیمار حیوانات، از آنها خون گیری به عمل آمد و سپس نیتريت - نیترات (از متابولیت‌های پایدار نیتریک اکساید) سرم نمونه‌ها با روش شیمیایی گریس مورد اندازه گیری قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تجویز پروژسترون سطح نیتريت - نیترات سرم را کاهش داد که این اثر توسط ال-آرژنین معکوس گردید. بر عکس، استرادیول موجب افزایش سطح نیتريت - نیترات سرم شد که ال-نیم این اثر را مهار کرد. تجویز توأم این دو هورمون تغییر مهمی را در میزان نیتريت - نیترات سرم ایجاد نکرد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های فوق نشان می‌دهد که هورمون‌های جنسی زنانه در تنظیم تولید نیتریک اکساید نقش داشته و ممکن است برخی از اثرات این هورمون‌ها در بافت‌های هدف از طریق سیستم نیتريت اکساید وساطت شود.

کلیدواژه‌ها: هورمونهای استروئیدی جنسی زنانه، نیتریک اکساید، نیتريت - نیترات

۱- استادیار گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)

۲- استادیار گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

۳- استادیار گروه فیزیولوژی دانشگاه شهید باهنر کرمان

۴- مربی گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

مقدمه

استروئیدی جنسی بستگی دارد. برای مثال شیوع بیماری‌های عروقی در جنس مؤنث در سنین باروری از جنس مذکر کمتر است که احتمالاً به علت افزایش تولید نیتریک اکساید ناشی از افزایش سطح استروژن می‌باشد [۱۳]. مضافاً اینکه میزان تولید نیتریک اکساید در طول دوره جنسی موش‌ها تغییر یافته و در دوران بارداری میزان متابولیت‌های اکسید شده نیتریک اکساید افزایش می‌یابد [۱۱]. NO یک رادیکال آزاد ناپایدار است و ابتدا بسرعت به نیتريت و سپس ظرف یکساعت، حدود ۹۵ درصد آن به نیتريت تبدیل می‌شود. نیتريت و نیتريت از محصولات پایدار اکسیداسیون NO هستند. و از شاخص‌های معتبر شیمیایی اندازه‌گیری مقدار تولید نیتریک اکساید و فعالیت آنزیم NOS محسوب می‌شود [۱۲، ۱۷]. از آنجایی که معمولاً در طب بالینی استروژن و پروژسترون به طور توأم تجویز و در سال‌های اخیر به عنوان درمان جایگزین پس از یائسگی مصرف آنها توصیه شده است و از سوی دیگر هنوز بدرستی اثر تداخلی هورمون‌های استروژن و پروژسترون بر سیستم مدولاتوری نیتریک اکساید شناخته نشده است. هدف این مطالعه بررسی اثر مجزا و توأم این دو هورمون بر میزان تولید نیتریک اکساید از طریق اندازه‌گیری غلظت نیتريت - نیتريت سرم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۱۲۰ موش صحرایی ماده از نژاد اسپراگ داوولی با محدوده وزنی 230 ± 17 گرم استفاده و همه موش‌ها به صورت دو طرفه اوارکتومی شده و پس از ۱۴ روز استراحت، به‌طور تصادفی به سه گروه اصلی تقسیم شدند: ۱- گروه پروژسترون که هورمون پروژسترون را به میزان ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بصورت زیر جلدی دریافت کردند، ۲- گروه استروژن که داروی استرادیول بنزوات را به میزان ۱۰

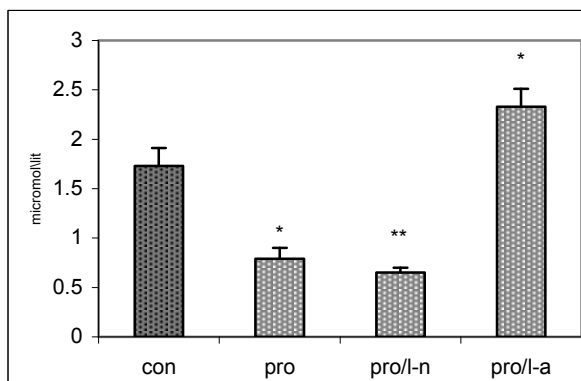
استروژن و پروژسترون از استروئیدهای تخمدانی مهم در جنس ماده بشمار می‌روند. که طی روندهای متابولیک از کلسترول سنتز می‌شوند. این هورمون‌ها دارای آثار وسیعی در دستگاه‌های مختلف بدن بویژه تولید مثل هستند و اعمال آنها از طریق اتصال به گیرنده‌های داخل سلولی ویژه صورت می‌گیرد. تا دهه اخیر تصور دانشمندان بر این بود که بروز اثر این هورمون‌ها فقط از طریق اتصال به این گیرنده‌ها و تغییر میزان کپی‌برداری از DNA در هسته و در نهایت سنتز پروتئین‌ها صورت می‌گیرد، ولی یافته‌های جدید نشان می‌دهد این هورمون‌ها گیرنده‌های غیرژنومی و شاید غشایی هم دارند که بیشتر آثار سریع آنها را وساطت می‌نمایند [۴]. هر چند که مکانیسم اثر دقیق همه هورمون‌های استروئیدی بدرستی شناخته نشده است، ولی شواهدی در دست است که یکی از راه‌های بروز اثر این هورمون‌ها در بافت‌های هدف، تنظیم فعالیت سیستم نیتریک اکساید است [۶، ۱۲، ۱۷]. نیتریک اکساید (NO) مولکول گازی شکلی است که به عنوان یک مدیاتور بزرگ اندوژن، در بسیاری از واکنش‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک بدن نقش دارد [۹]. این ماده از تبدیل اسید آمینه ال-آرژینین به ال-سیترولین طی واکنشی که توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) کاتالیز می‌شود، تولید می‌گردد. تاکنون سه ایزوفرم این آنزیم به نام‌های عصبی، اندوتلیالی و القائی (eNOS, iNOS, nNOS) شناسایی شده است [۱۱]. محدوده فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتاز وسیع بوده و عوامل متعددی از جمله برخی هورمون‌ها می‌توانند در تنظیم فعالیت آن و در نتیجه بر میزان تولید نیتریک اکساید نقش داشته باشند [۱۲، ۱۷]. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که میزان پایه نیتریک اکساید در دو جنس، از هم متفاوت بوده که این پدیده به نوع هورمون‌های

این آزمون از محلول نیتريت سدیم به عنوان استاندارد استفاده شد.

در ادامه، داده‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست‌های تکمیلی آن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در کلیه آزمون‌ها حداکثر خطای ۵ درصد مورد پذیرش قرار گرفت. داده‌ها به صورت Mean ± SEM نشان داده شدند

نتایج

۱- اثر پروژسترون بر نیتريت- نیتريت- سرم : غلظت سرمی نیتريت - نیتريت گروهی که پروژسترون و یا پروژسترون / ال-نیم را با هم دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت (به ترتیب $p < 0.05, 0.01$) ولی در گروهی که پروژسترون و ال- آرژینین را با هم دریافت کرده بودند، افزایش یافت ($p < 0.05$). (نمودار ۱).



نمودار ۱: اثر تزریق پروژسترون (pro)، ال-نیم (l-n) و ال-آرژینین (l-a) بر غلظت نیتريت-نیتريت سرم موشهای فاقد تخمدان

۲- اثر استرادیول بر نیتريت - نیتريت- سرم: غلظت سرمی نیتريت - نیتريت گروهی که استرادیول و یا استرادیول / ال - آرژینین توام دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($p < 0.05$). ولی نیتريت- نیتريت- سرم گروهی که

میکروگرم برکیلوگرم بصورت زیر جلدی دریافت نمودند و ۳- گروه پروژسترون-استروژن که هر دو هورمون (پروژسترون به میزان ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و استرادیول بنزوات به میزان ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم) بصورت زیر جلدی به آن‌ها تزریق گردید علاوه بر این هورمون‌ها در هر گروه از پیش ساز نیتريك اكساید (ال-آرژینین) به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بصورت داخل صفاقی و مهارکننده رقابتی آنزیم سازنده نیتريك اكساید (ال-نیم) با دوز ۶۰ میلی‌گرم برکیلوگرم بصورت داخل صفاقی، نیز استفاده شد، در ضمن به گروه‌های کنترل حلال داروها تزریق گردید. ۶ ساعت پس از تیمار، حیوانات با اثر بیهوش شده و پس از بازکردن شکم از طریق قلب از همه نمونه‌ها خونگیری به عمل آمد. آنگاه با سانتریفوژ سرد سرم جداسازی و تا روز آزمایش در حرارت ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، سپس نیتريت - نیتريت نمونه‌ها با روش کلریمتری‌گریس اندازه‌گیری گردید. لازم به ذکر است که شرایط نگهداری همه حیوانات یکسان و استاندارد بود و جهت محدودسازی ورود نیتريت اگزوزن به بدن از طریق غذا، کلیه حیوانات ۲۴ ساعت قبل از آزمون از غذا محروم و فقط آب مقطر دریافت می‌کردند. روش کلریمتریکی اندازه‌گیری نیتريت - نیتريت بدین صورت بود: ابتدا با استفاده از اسید فلوئوروآستیک ۱۰ درصد و سانتریفوژ، سرم دیپروتئینه و سپس اسید یته سرم با سود سوزآور ۵ درصد خنثی شد تا از تخریب آنزیم نیتريت ردوکتاز جلوگیری شود، آنگاه نیتريت با استفاده از آنزیم نیتريت ردوکتاز به نیتريت تبدیل شد، زیرا نیتريت واکنش رنگ‌گیری خوبی با معرف‌های گریس ندارد، سپس معرف‌های واکنش گریس به نمونه‌های آزمون افزوده شد و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری نمونه‌ها در درجه حرارت اطاق، میزان جذب در ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزاید اندازه‌گیری گردید، در

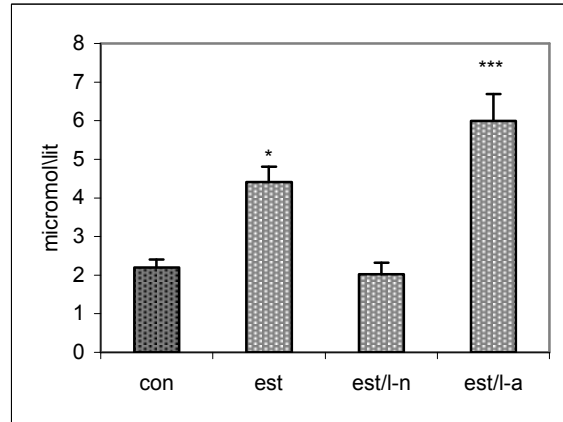
نمودار ۳: اثر تزریق پروژسترون (*pro*) و استرادیول (*est*) توام ال-نیم (*l-n*) و ال-آرژینین (*l-a*) بر غلظت نیتريت-نیترات سرم موشهای فاقد تخمدان

استرادیول ال نیم دریافت کرده بودند کاهش داشت ولی از نظر آماری معنی دار نبود (نمودار ۲).

بحث

یافته‌های این تحقیق بر نقش تنظیمی استروئیدهای جنسی در تولید نیتريك اكساید تأکید دارد.

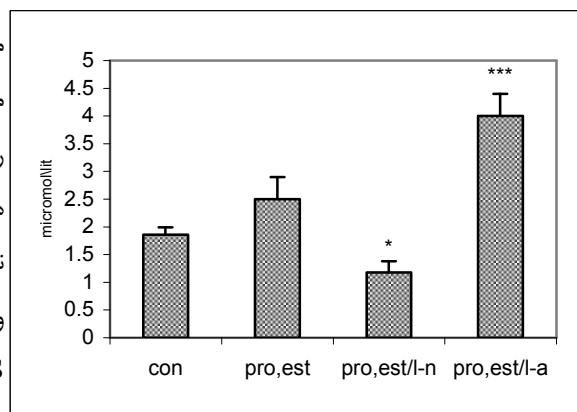
در این مطالعه تجویز پروژسترون موجب کاهش سطح معنی‌دار نیتريت-نیترات سرم شد، که ال-نیم این اثر را تقویت و ال-آرژینین آن را مهار نمود. در مورد تأثیر پروژسترون بر سیستم نیتريك اكساید مطالعات اندکی صورت گرفته، که نتایج متفاوتی را نیز در پی داشته است، ولی شواهد حاکی از آن است که نیتريك اكساید در این میان نقش مهمی دارد [۱۸]. به نظر می‌رسد اثر پروژسترون وابسته به شکل تجویز و نوع بافت و جنس نمونه متغیر باشد [۱۵] برای مثال افزایش پایدار پروژسترون در دوران حاملگی موجب بیان آنزیم نیتريك اكساید سنتاز القائی در جفت، سرویکس و رحم می‌شود [۲]. در همین ارتباط، واینر معتقد است که بر خلاف استروژن، پروژسترون اثری بر فعالیت نیتريك اكساید سنتاز بافت‌های محیطی خوکچه هندی و موش صحرائی ندارد ولی در دستگاه عصبی این حیوانات موجب مهار آنزیم نیتريك اكساید سنتاز می‌شود [۱۹]. در پژوهش دیگر، تجویز استروژن موجب افزایش تولید نیتريك اكساید در رحم موش‌های بدون تخمدان شد و پروژسترون تولید آن را کم کرد [۱] که این یافته با نتیجه مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. مکانیسم اثر پروژسترون بر تولید نیتريك اكساید هنوز به درستی شناخته نشده است ولی احتمال تأثیر این هورمون بر فعالیت پایه آنزیم NOS و بیان m-RNA آن در تحقیقات اخیر مطرح گردیده است [۲].



نمودار ۲: اثر تزریق استرادیول (*est*)، ال-نیم (*l-n*) و ال-آرژینین (*l-a*) بر غلظت نیتريت-نیترات سرم موشهای فاقد تخمدان

۳- اثر پروژسترون و استرادیول بر نیتريت-نیترات سرم:

تزریق پروژسترون و استرادیول توام باعث افزایش غلظت سرمی نیتريت - نیترات سرم نسبت به گروه کنترل شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود، تجویز ال-نیم به نمونه‌هایی که این دو هورمون را به‌طور توأم دریافت کرده بودند، موجب کاهش نیتريت - نیترات سرم و تجویز ال- آرژینین باعث افزایش سطح نیتريت - نیترات شد (به ترتیب 0.01, 0.05) (نمودار ۳).



کنترل شد که معنی دار نبود، در یک تحقیق نسبتاً مشابه، سطح نیتريت - نیترات سرم متعاقب اوارکتومی موش‌ها کاهش قابل توجهی پیدا نمود، اما در گروهی که استروژن مکمل جایگزین گردید، دچار کاهش نشد و نیز در گروهی که دو هورون را توأم دریافت کردند کاهش نیتريت- نیترات ناچیز بود [۱۶]. در پژوهش دیگری اثر گشاد کنندگی استرادیول بر عروق توسط پروژسترون به طور نسبی مهار شد [۵]. اطلاعات کمی در مورد کنش متقابل این دو هورمون در دست است تحقیقاتی که بروی بافت ایزوله رحم انجام شده نشان می‌دهد که پروژسترون تعداد گیرنده‌های استروژن را کاهش و بیان m-RNA آن را نیز کم می‌کند [۵].

به‌طور کلی، نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌کند که این دو هورمون استروئیدی بر تنظیم تولید نیتريك اکساید در جنس ماده تاثیر دارند و حداقل یکی از مسیرهای بروز اثر هورمونهای جنسی، درگیر کردن سیستم نیتريك اکساید می‌باشد و ممکن است مسیر عمل این دو هورمون در بافت‌های هدف، مشترک ولی عکس هم باشد. هر چند که استروژن به مراتب بیش از پروژسترون توانایی کنترل این سیستم را داراست. احتمال می‌رود که برخی از آثار معکوس این دو هورمون از سطح گیرنده شروع شده و یا فرایندهای پس از گیرنده را درگیر کند. شناخت جزئیات بیشتر نحوه عمل و انتقال پیام هورمون‌های استروئیدی، تحقیقات وسیع‌تر ملکولی را طلب می‌کند.

در این تحقیق، تجویز استروژن موجب افزایش چشمگیر سطح نیتريت- نیترات سرم شد، که این اثر توسط ال-نیم مهار و با ال-آرژینین تقویت گردید. نتیجه حاضر در راستای یافته پژوهش‌های اخیر است. در یک مطالعه با تجویز استروژن به موش‌های فاقد تخمدان مشاهده شد که میزان آنزیم نیتريك اکساید سنتاز اندوتلیالی و فعالیت آن بطور بارزی افزایش یافت [۵]. بعلاوه استعمال استرادیول به‌صورت پماد پوستی در گروهی از زنان یائسه باعث افزایش سریع سطح پلاسمایی نیتريك اکساید گردید و این اثر با تکرار تجویز حفظ شد [۳]. همچنین در دوران حاملگی متناسب با افزایش غلظت استرادیول پلاسما، میزان تولید نیتريك اکساید بسیاری از بافت‌ها مانند مغز افزایش می‌یابد [۱۹].

در مورد ساز و کار این هورمون باید گفت: استروژن قادر است با القای بیان آنزیم مولد نیتريك اکساید و افزایش فعالیت آن از طریق فسفریلاسیون رزیدوهای سرینی آنزیم، تولید نیتريك اکساید را در طی دقایقی افزایش دهد [۸]. استروژن همچنین می‌تواند با کاهش آنیون پر اکساید که از عوامل مهم تخریب نیتريك اکساید است بر طول اثر آن بیفزاید [۶]، به علاوه استروژن قادر است که با فسفریلاسیون کانالهای NMDA و افزایش کنداکتانس یون‌ها بویژه کلسیم، تولید نیتريك اکساید را در سیستم عصبی افزایش دهد [۱۴].

در این پژوهش تجویز توأم دو هورمون موجب افزایش اندک سطح نیتريت- نیترات سرم نسبت به گروه

منابع

- [1] Buhimschi I A, Yallampalli C et al: Distinct regulation of nitric oxide and cyclic guanosine phosphat production by steroid hormones in the rat uterus. *Mol Hum Reprod* . 2000 ; 6 (5) : 404-14.
- [2] Chwalisz.K, winterhager.E, Thienel T, Garfield RE: Synergistic role of nitric oxide and progesterone during the establishment of pregnancy in the rat. *Hum Rep*. 1999; 14(2):542-52.
- [3] Cicinelli E et al: Effect of short-term transdermal estradiol administration on plasma levels of nitric oxide in

- postmenopausal women. *Fertile Stril*. 1998; 69(1):58-61.
- [4] Cooper E .J, Ston. A, File. S: Effects of naturally occurring neurosteroid on GABA IPSP during development in rat hippocampal or cerebellar slices. *J Physiol*. 1995; 2:437-49.
- [5] Coustodia LN ,Novill OA ,Callardia P: Effect of gonadal steroids on progesterone receptor and estrogen receptor and vitellogenin expression in mal turtles. *J Exp Zool*. 2004; 301(1):15-55.
- [6] Darable BC, Pendarics C ,Krust A et al: Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res*. 2002; 90(4): 413-19.
- [7] Frank A, Bechaward D: Functional significance of steroid modulation of GABAergic neurotransmission. *Hormones and Behavior* 1995; 299:131-140.
- [8] Haynes MP, Sinha D, Russell KS: Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide via the PI3-Kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Research*. 2000; 87(8):677-82.
- [9] Lancaster J R: Nitric oxide: principles and actions .California Academic Press. 1996; pp:3-37.
- [10] Mesiano S, Chan E et al: Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* . 2002 ; 87(6):2924-38.
- [11] Ogando D, Farina M et al: Steroid hormones augment nitric oxide synthase activity and expression in rat uterus, *Reprod Fertil Dev*. 2003; 15(5):269-74.
- [12] Okutomi T, Nometo K: Nitric oxide metabolite in pregnant women before and after delivery *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1997 ; 79(3):222-6.
- [13] Rahimian R, Laher I, Dube G, Van Breemen C: Estrogen and selective estrogen receptor modulator LY 117018 enhance release of nitric oxide in rat aorta *Pharmacol EXP*. 1997; 283(1):116-22.
- [14] Ruifen B, Boroutman G: The tyrosinase and mitogen activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci*. 2000; 97:3602-7.
- [15] Slles J, Polin N: Non genomic action of progesterone in rat aorta, *Cell Signal*. 2002; 14(5): 431-6.
- [16] Vanbezojen R, Que T: Plasma nitrite and nitrate level are regulated by ovarian steroids in rats, *J Endocrinol*. 1998; 159:27-34.
- [17] Warembourg M, Leory D, Jolivet A: Nitric oxide synthase in the guinea pig preoptic area and hypothalamus: distribution, effect of estrogen, and colocalization with progesterone receptor *J Comp Neurol* .1999 May 3; 407(2):207-27.
- [18] Wieser F ,Gruber DM ,Tschugguel W: Huber JC: Progesterone and nitric oxide , *Zentrald Gynakol*. 1997; 119 (12):12-6.
- [19] Winer CP, Tampion LP: Nitric oxide and pregnancy, *Seminars in Perinatology* .1997; 21:207-80