

اثر نیتریک اکساید بر میزان درصد پلاکتها، درصد گلبولهای قرمز و تعداد گلبولهای سفید

دکتر مینو ایلخانی پور^۱، دکتر حسین حیات‌غیبی^۲، دکتر گودرز صادقی^۳

تاریخ دریافت 84/02/28، تاریخ پذیرش 84/11/05

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: در حالی که نیتریک اکساید به شکل دارو مصرف زیادی دارد، تاثیرات نیتریک اکساید بر بسیاری از فاکتورهای زیستی هنوز ناشناخته است. نیتریک اکساید تاثیرات مهمی در فرایندهای فیزیولوژیک دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی چگونگی تاثیر نیتریک اکساید بر میزان درصد پلاکتها، درصد گلبولهای قرمز و تعداد گلبولهای سفید می‌باشد.

مواد و روشها: در این بررسی ۲۵ خوکچه هندی نر با وزن متوسط 316 ± 2 گرم به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم گردید. گروه A (تزریق سرم فیزیولوژی) گروه B (تزریق متیلن بلو) Methylene Blue گروه C (تزریق ال-نیم NitroL-Arginine-Methylester) گروه D (تزریق ال-آرژنین L-Arginine) و گروه E (تزریق نیتروگلیسرین) Nitroglycerine. تزریقها به صورت زیرجلدی (sc) انجام شد و پس از سه روز نمونه‌های خونی جمع‌آوری گردیدند. فاکتورهای درصد پلاکتها و درصد گلبولهای قرمز و شمارش گلبولهای سفید، به وسیله دستگاه Melet. MS. Cell Counter ساخت فرانسه اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که در گروه E افزایش نیتریک اکساید به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) باعث کاهش میزان درصد پلاکتها گردید و در گروههای B و C که مهارکنندگان تولید نیتریک اکساید دریافت کرده بودند، شاهد افزایش درصد پلاکت بودیم. نتایج حاصله نشان داد که در گروه E و D شاهد کاهش هماتوکریت و در گروه C شاهد افزایش هماتوکریت بودیم اما اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ نشان داده نشد و در مورد گلبولهای سفید نتایج حاصله از این کار تحقیقاتی نشان داد که ال-آرژنین به طور بارزی منوسیتها را افزایش داد و نیتروگلیسرین، این افزایش را در سطح لنفوسیتها اعمال کرد ولی نیتروگلیسرین، گرانولوسیتها را کاهش داد، اما در سطح ۵٪ اختلافات معنی‌دار نبود.

بحث و نتیجه‌گیری: نیتریک اکساید حاصل از داروها می‌تواند در فاکتورهای خونی اثرات بارزی به وجود آورد، با توجه به اینکه تحقیقات در مورد اثرات نیتریک اکساید تاحدی جدید و تازه می‌باشد و در بسیاری از موارد پاسخهای متناقض مشاهده می‌شود، می‌بایست به بسیاری از موارد توجه بیشتری مبذول گردد.

کلواژگان: نیتریک اکساید، هماتوکریت، نیتروگلیسرین، بلودومتیلن، گلبولهای قرمز، گلبولهای سفید، پلاکت.

مجله پزشکی ارومیه، سال هفدهم، شماره دوم، ص ۸۶-۸۱، تابستان ۱۳۸۵

آدرس مکاتبه: دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، دکتر مینو ایلخانی پور

مقدمه

بدن مورد توجه قرار گرفت. به عنوان مثال تنظیم‌کننده دستگاه قلبی-عروقی، تنظیم‌کننده فشارخون، تنظیم‌کننده انقباض عضلات صاف، مدیاتور سیستم ایمنی و... (۱). این ایده که یک گاز بتواند به عنوان یک پیامبر آندوژن در

قبل از سالهای ۱۹۸۶ نیتریک اکساید به عنوان یک گاز پیش‌نیاز acid rain اتمسفر شناخته شده بود و به عنوان یک گاز سمی حاصل از سیگار مورد بررسی قرار می‌گرفت. به مرور زمان نیتریک اکساید به عنوان یک گاز تنظیم‌کننده بسیاری از سیستمهای

^۱ استادیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه

^۲ استادیار گروه فیزیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

^۳ دانشیار گروه فارماکولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

گونادوترپین مؤثر است (۱۱). افزایش نیتریک اکساید باعث افزایش هورمون رشد می‌گردد (۱۲).

طبق مقالات موجود، نیتریک اکساید در تنظیم اکثر هورمونها موثر است. البته چگونگی عملکرد نیتریک اکساید به دوز و میزان فعالیت NOS و فعالیت نوع ایزوفرمهای NOS بستگی دارد. نیتریک اکساید در انتقال و متابولیسم قند در بدن دخالت دارد. نیتریک اکساید در چگونگی تون برونشهای تنفسی نقش بسیار اساسی دارد (۱۳). هدف از انجام این کار تحقیقاتی، بررسی تزریق زیرجلدی دهنده‌های نیتریک اکساید بوده که آیا این روش تزریق می‌تواند باعث تغییراتی در میزان درصد پلاکتها، درصد گلبولهای قرمز (هماتوکریت) و تعداد گلبولهای سفید گردد یا خیر؟ با روش تزریق زیرجلدی (SC) قبلاً این تجربه انجام نگرفته است.

مواد و روش کار

این تجربه بر روی ۲۵ قطعه خوکچه هندی نر با وزن متوسط 2 ± 316 گرم انجام شده است. حیوانات به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم بندی شدند و هرگروه در فقههای جداگانه نگهداری شدند. شرایط محیطی و تغذیه‌ای برای تمام گروهها به طور کامل یکسان بوده و گروهها در دمای آزمایشگاه $22-21^{\circ}\text{C}$ ، در سبک ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از دو روز آدپتاسیون با محیط، موشهای هرگروه ماده‌ای را به صورت تزریق زیرجلدی دریافت کردند. گروهها و مواد دریافتی به شرح زیر بودند:

گروه A: سرم فیزیولوژی

گروه B: بلودومیتیلن ($10 \text{ mg/kg b.w. per day}$)

گروه C: L-NAM ($25 \text{ mg/kg b.w. per day}$)

گروه D: L-Arginine ($150 \text{ mg/kg b.w. per day}$)

گروه E: نیترو گلیسرین ($10 \text{ mg/kg b.w. per day}$)

بلودومیتیلن و L-NAME به عنوان مهارکنندگان نیتریک اکساید و L-Arginine و نیتروگلیسرین به عنوان دهندگان نیتریک اکساید مصرف شدند.

پس از طی مرحله آدپتاسیون به ترتیب هرکدام از خوکچه‌ها پس از توزین داروی مورد آزمایش، خود را با روش زیر جلدی متناسب با وزن و دوبار در روز (۸ صبح و ۴ بعداز ظهر) دریافت کردند. پس از سه روز تزریق هرکدام از خوکچه‌ها به طور جداگانه، توزین و متناسب با وزن برای بی‌هوشی سدیم تیوپنتال (50 mg/kg bw)

پستانداران عمل کند، باعث شد که رابرت فورچگوت^۱ و همکارانش در سال ۱۹۹۸ جایزه نوبل را به دست آوردند (۲). اثر نیتریک اکساید بر سیستم عروقی کوتاه مدت است اما امروزه گفته می‌شود که NO بر روی تکثیر سلولها و عملکرد هورمونها اثرات دراز مدت به جا می‌گذارد.

نیتریک اکساید در بدن، از اسید آمینه ال-آرژینین تحت تاثیر فعالیت آنزیم NOS به دست می‌آید (۳).

تا به حال سه نوع NOS شناخته شده‌اند که براساس منشاء و محل تولید آنها به سه گروه تقسیم می‌شوند.

eNOS, nNOS و iNOS (۴).

نیتریک اکساید یک رادیکال آزاد ساده است که در عین حال یک پیامبر ثانویه، یک اتوکوئید، یک عامل پاراکرین، یک NT و یا یک هورمون نیز می‌تواند باشد. استفاده از نیتریک اکساید در درمان، از سالها قبل معمول بوده است (۵). NO می‌تواند عامل افزایش فعالیت سیستم ایمنی بدن باشد و افزایش تعداد گلبولهای سفید و افزایش قدرت ایمنی بدن، از اعمال نیتریک اکساید در بدن می‌باشد (۶). در عین حال نتیجه تحقیقات نشان می‌دهد که افزایش میزان نیتریک اکساید می‌تواند عامل مهم آسیب بافتی نیز باشد.

دیابت اتوایمیون به علت افزایش فعالیت ماکروفازها و اثرات سیتوتوکسیک Th به وجود می‌آید که کلید ایجاد این بیماری، افزایش فعالیت و میزان NOS می‌باشد. نارسایی کبد، دفع بافت و عوارض دیگر می‌توانند ناشی از افزایش میزان نیتریک اکساید باشند (۷). یکی از علل شناخته شده بیماری آلزایمر، افزایش ترشح IL6 و IL1 می‌باشد. نیتریک اکساید باعث کاهش ترشح IL6 توسط ماکروفازها می‌گردد. بنابراین می‌توان نیتریک اکساید را به عنوان عاملی جهت کاهش پیشرفت بیماری آلزایمر به حساب آورد.

استروژن، به عنوان یک عامل افزایش دهنده نیتریک اکساید معرفی شده است (۸). nNOS در امر انتقال درد بسیار مهم است و شاید NO به عنوان یک مدیاتور درد مطرح باشد و شاید افزایش گلوتامات همراه است با آزاد شدن NO. در هر صورت مسئله درد و نیتریک اکساید علی‌رغم پاسخهای متناقض، با یکدیگر در ارتباط هستند (۹). در کاهش عملکرد عضلات اسکلتی بعد از آلودگی به سم باکتریایی E.coli به طور معنی‌داری افزایش نیتریک اکساید و بخصوص افزایش فعالیت iNOS و اثرات تیروزین نیتروزیلاسیون مشاهده می‌شود (۱۰).

نیتریک اکساید در تنظیم هورمونهای

¹ Robert Furchgoot

اثر نیتریک اکساید بر میزان درصد پلاکتها، درصد گلبولهای قرمز و تعداد گلبولهای سفید

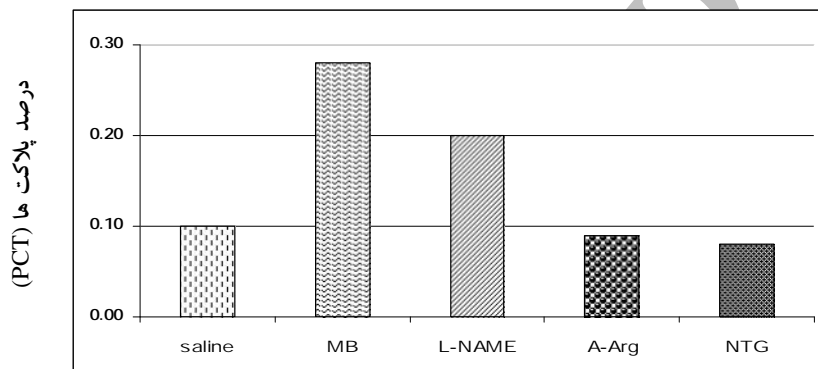
آماري، معنی دار در نظر گرفته شد.

نمودار ۱ میانگین \pm خطای معیار میزان درصد پلاکتها (Pct) را در گروههای شاهد، بلودومتیلن L-NAME، L-Arginine و نیتروگلیسرین نشان می دهد. همانطور که ملاحظه می گردد، نیتروگلیسرین و L-Arginine به طور معنی داری با $p < 0.05$ باعث کاهش درصد پلاکتها گردید. تفاوتها مشاهده شده بین ۵ گروه دارای اختلاف معنی دار بودند.

دریافت کردند. بعد از بی هوشی کامل، خون گیری به طور مستقیم از داخل بطن قلبی انجام گرفت و خون در لوله های مخصوص حاوی EDTA جمع آوری و توسط دستگاه Melet. Ms. Cell Counter ساخت فرانسه فاکتورهای لازم اندازه گیری گردید.

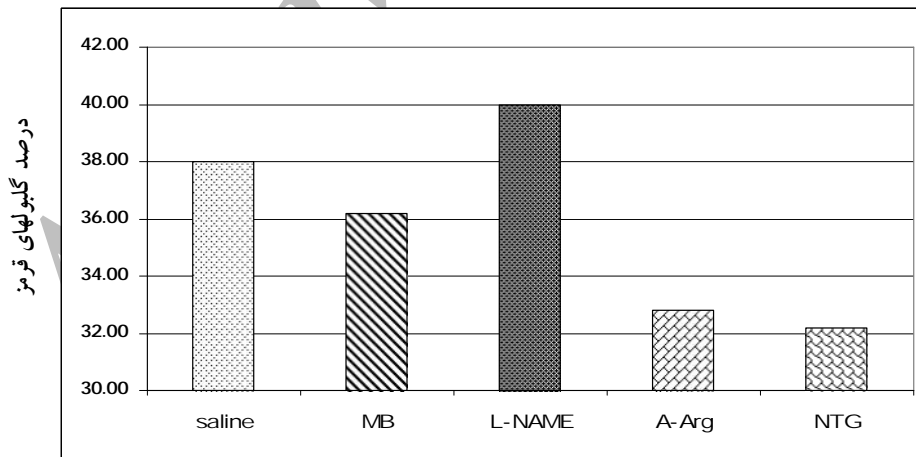
نتایج

نتایج به دست آمده به وسیله آزمون آماری ANOVA یک طرفه (One Way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفتند و $p < 0.05$ از نظر



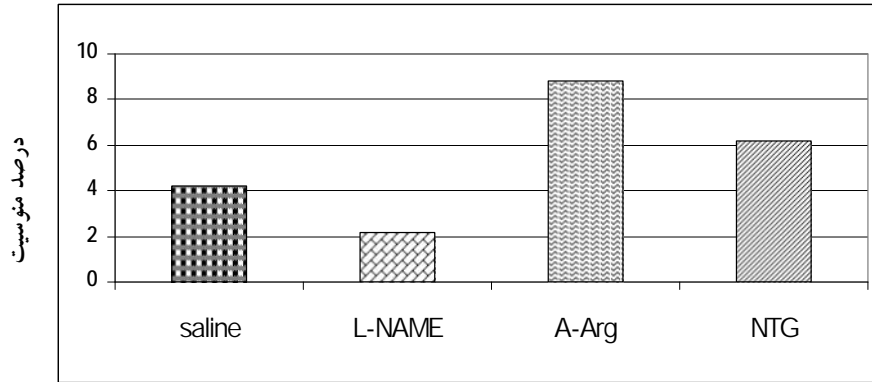
گروههای آزمایشی

نمودار شماره ۱: میانگین \pm خطای معیار میزان درصد پلاکت در گروه شاهد، متیلن بلو، ال-نیم، ال-آرژنین و نیتروگلیسرین در خونچه های هندی نر (تفاوت بین گروهها معنی دار بود. $p < 0.05$)



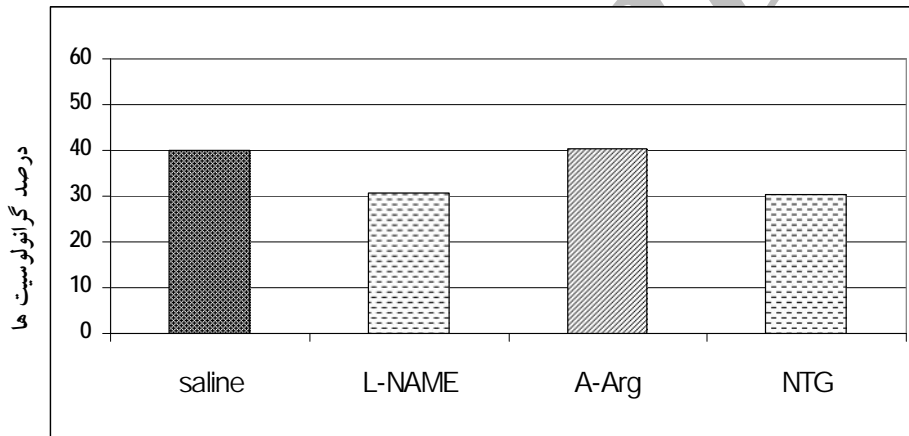
گروههای آزمایشی

نمودار شماره ۲: میانگین \pm خطای معیار میزان هماتوکریت در گروه شاهد، متیلن بلو، ال-نیم، ال-آرژنین و نیتروگلیسرین در خونچه های هندی نر. تفاوت معنی داری بین گروهها مشاهده نگردید.



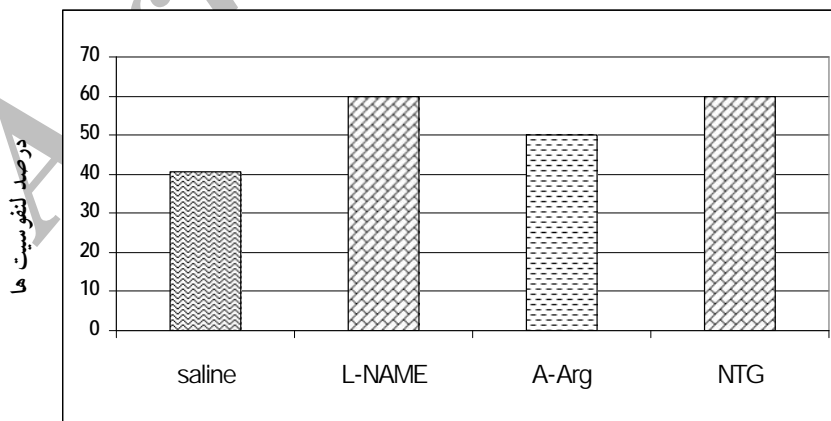
گروههای آزمایشی

نمودار شماره ۳: میانگین \pm خطای معیار میزان منوسیت در خون در گروههای شاهد، متیلن بلو، ال-نیم، ال-آرژنین و نیتروگلیسیرین در خوکچه هندی نر. تفاوت معنی داری بین گروهها مشاهده نگردید.



گروههای آزمایشی

نمودار شماره ۴: میانگین \pm خطای معیار میزان گرانولوسیت خون در گروههای شاهد، متیلن بلو، ال-نیم، ال-آرژنین و نیتروگلیسیرین در خوکچه هندی نر. تفاوت معنی داری بین گروهها مشاهده نگردید.



گروههای آزمایشی

نمودار شماره ۵: میانگین \pm خطای معیار میزان لنفوسیت های خون در گروههای شاهد، متیلن بلو، ال-نیم، ال-آرژنین و نیتروگلیسیرین در خوکچه هندی نر. تفاوت معنی داری بین گروهها مشاهده نگردید.

پس جا دارد که در مورد استفاده از داروهای تولید کننده نیتریک اکساید توجه بیشتری به عوارض جانبی این داروها معطوف گردد. در مطالعه حاضر نشان داده شده که کاهش و افزایش نیتریک اکساید می تواند در میزان درصد پلاکتها مؤثر باشد، پس می توان نتیجه گرفت که نیتریک اکساید می تواند یک عامل کنترل کننده میزان پلاکت در خون باشد. در بعضی از مطالعات، نیتریک اکساید را به عنوان یک عامل حفاظت کننده دیواره عروق، در جهت ممانعت از تجمع پلاکتها بیان کرده اند (۱۷)، و قبل از این، مطالعات نشان داده که نیتریک اکساید می تواند آپوپتوزیس در مگاکاریوسیتها را افزایش دهد (۷).

مطالعات در مورد اثر نیتریک اکساید بر فاکتورهای خونی نشان داده که اگر NO به شکل استنشاقی استفاده شود تقریباً هیچ گونه اثری بر فاکتورهای خونی به جا نمی گذارد، در حالی که نتایج این بخش، نشان می دهد تزریق زیرجلدی نیتروگلیسرین که تولید کننده NO می باشد، می تواند بر فاکتورهای خونی مؤثر باشد (۱۸). مطالعات انجام شده در رابطه با نیتریک اکساید و خون ارتباط نسبتاً مشخصی بین سرطان خون و iNOS نشان داده است (۱۹).

مطالعات دیگری در رابطه با اثر نیتریک اکساید بر مگاکاریوسیتها نشان می دهد که با استفاده از نیتریک اکساید اندازه مگاکاریوسیتها افزایش نشان می دهد (۲۰) که البته در این کار تحقیقاتی در رابطه با اندازه سلولها، عملیاتی انجام نگرفته، اما نتایج حاصل از این تحقیق تأثیر نیتریک اکساید بر تعداد منوسیتها که حاصل از مگاکاریوسیتها هستند را مد نظر قرار داده است. نتایج نشان داده که نیتریک اکساید می تواند باعث افزایش تعداد منوسیتها گردد که البته از نظر آماری معنی دار نبودند.

نتایج حاصله از این کار تحقیقاتی نشان داد که تولید کنندگان و مهارکنندگان نیتریک اکساید همه با یک مکانیسم و بر روی یک فاکتور مشخص عمل نمی کنند؛ چنانکه ال-آرژنین به طور بارزی باعث افزایش منوسیت می گردد، درحالی که نیتروگلیسرین به این شکل عمل نمی کند.

نمودارهای ۳ و ۴ و ۵ تاثیر افزایش دهنده و کاهش دهنده نیتریک اکساید را بر میزان گلبولهای سفید خون نشان می دهند. اما همانطور که نمودارها گویا می باشند هر نوع ماده ای، به طور عملی بر روی نوع خاصی از گلبولهای سفید مؤثر است. در نمودار ۳ نشان داده شده که ال-آرژنین به طور بارزی باعث افزایش منوسیت و نمودار ۴ نشان داده که نیتروگلیسرین به طور مختصر باعث کاهش گرانولوسیتها و نمودار ۵ نشان داده که ال-آرژنین نسبت به ال-نیم و نیتروگلیسرین به طور مختصری باعث کاهش لنفوسیتها گردیده تفاوتها معنی دار نبود.

بحث

در این مطالعه مشاهده گردید که نیتریک اکساید می تواند به طور عملی در میزان پلاکتها، گلبولهای سفید و گلبولهای قرمز تفاوتی را ایجاد کند. از آنجا که مصرف داروهایی که تولید نیتریک اکساید می کنند در نارسایی های قلبی بسیار معمول است، پس جا دارد که در مورد نیتریک اکساید و اثرات جانبی آن در بیماران قلبی توجه بیشتری گردد، زیرا تولید بیش از حد نیتریک اکساید علاوه بر تأثیر بر روی فاکتورهای خونی، می تواند به عنوان یک رادیکال آزاد و نیز به عنوان یک عامل اکسیدان مطرح گردد. امروزه مسئله استرس اکسیداتیو به عنوان عاملی برای انواع بیماریها، همچون سرطان (۱۴) و دیابت (۱۵) مورد توجه و بررسی می باشد. در این مطالعه از دهنده های نیتریک اکساید و مهارکنندگان تولید نیتریک اکساید استفاده شده و مطالعات به طور عملی نشان داده اند که پیش ساز اولیه نیتریک اکساید، یعنی ال-آرژنین نمی تواند باعث اثرات اکسیداتیو گردد. در مطالعه ای برای بررسی اثر اکسیداتیو در سلولهای کشت شده کلپوی از ال-آرژنین استفاده گردید (۱۶) و اثری دیده نشد. اما تا به حال مطالعه ای در مورد چگونگی اثرات جانبی نیتروگلیسرین که خود یک تولید کننده نیتریک اکساید است انجام نگرفته، با توجه به مطالعات انجام شده که نشان می دهد نیتریک اکساید می تواند بر میزان هورمونها، فاکتورهای خونی، سلولهای عضلانی و سیستم تنفسی، مؤثر باشد (۱،۳،۵،۶).

References:

01. Sadeghi-Hashjin G, Henricks PA, Folkerts G, Verheyen AK, Van der Linde HJ, Nijkamp FP. Bovine tracheal responsiveness in vitro: Role of the

epithelium and nitric oxide. *Eup Respir J* 1996; 9(11): 2286-2293.

02. Furchgott RF, Ignarro LJ, Murad F, Press release: The 1998 Nobel Prize in physiology or medicine; the nobel

- assembly at karolinska institutet, 1998, October 12.
03. Kaminski HJ, Andrade FH. Nitric oxide: Biologic effects on muscle and role in muscle diseases. *Neuromuscul Disord.* 2001; 11(6-7):517-524.
 04. Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Dumer J. Nitric oxide: Comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* 2001; 6(4):177-183.
 05. Murad F. Nitric oxide signaling: Would you believe that simple free radical could be a Second messenger, autacoid, paracrine substances, neurotransmitter and hormone. *Recent Prog Horm Res* 1998; 53: 43-59.
 06. Fernandez L, Iglesias M, Biron M, Veronica A, Wolfenstein TC. Protective effect of prolactin and placental lactogen on No-induced Nb2 Lymphoma cell apoptosis. *Arch Biochem Biophys.* 2003 15; 416(2):249-256.
 07. Lancaster J. Nitric oxide: Principles and actions. *J Chem Neuroanat* 2001; 21: 249-250.
 08. Mccarty MF. Vascular nitric oxide, sex hormone replacement, and fish oil may help to prevent Alzheimer's disease by suppressing synthesis of acute phase cytokines. *Med Hypotheses* 1999; 53 (5): 369-374.
 09. Jacques E, Devulder MD. Could nitric oxide be an Important Mediator in opioid tolerance and Morphine Sid effects? *J Clin Anesth* 2002, 14: 81-82.
 10. EL-Dwairi Q, Comtois A, Guo Y, Hussain SN. Endotoxin induced skeletal muscle contractile dysfunction: Contribution of nitric oxide synthases. *Am J Physiol* 1998; 274: C770-779.
 11. Barnes MJ, Lapanowski K, Rafols-JA, Lawson DM, Dunbar JC. Chronic nitric Oxide deficiency is associated with altered Luteinizing hormone. *Exp Biol Med* 2002; 227(9): 817-822.
 12. Tsumori M, Murakami Y, Koshimura K, Kato Y. Growth hormone-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone stimulate nitric oxide production in 17beta-estradiol-primed rat anterior pituitary cells. *Endocrine* 2002; 17(3): 215-218.
 13. Sadeghi Hashjin G, Folkerts G, Henricks PA. Relaxation of guinea – Pig trachea by sodium nitroprusside: Cyclic GMP and nitric oxide involved. *Br J Pharmacol.* 1996; 118 (3): 466-470.
 14. Kitano H, Kitanishi T, Nakanishi Y, Susuki M, Takeuchi E, Yazawa Y, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human thyroid papillary carcinomas. *Thyroid J* 1999; 9(2): 113-117.
 15. Smukler SR, Tang L, Wheeler MB, Salapatek A M. Exogenous nitric oxide and endogenous glucose-stimulated beta-cell nitric oxide augment insulin release. *Diabetes* 2002; 51(12): 3450-3460.
 ۱۶. صوفی آبادی م، گل ع، حیدر پور ب، بابازاده م: اثر مهارى نیتريك اكساید در جلوگیری از كاهش ویتامین E پلاسمایی به هنگام تزریق آهن دکستران در موشهای صحرائی نر، مجله پزشکی ارومیه، ۱۳۸۳، سال پانزدهم، شماره ۲، صص ۱۱۵-۱۲۱.
 17. Wang CR, Zhu Y, Holushka PV, Lincoln TM, Mendelsohn ME. Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: *in vivo* phosphorylation of thromboxane by cyclic GMP-dependent protein kinase: *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(9): 4888-4893.
 18. Alvin C. Effects of inhaled nitric oxide on blood elements: A novel therapy for Sickle Cell disease. *Respir Care* 1999; 44(3): 340-347.
 19. Nozoe T, Yasuda M, Honda M, Inutsuka S, Korenaga D. Immunohistochemical expression of cytokine induced nitric oxide synthase in colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 2002; 9(3):521-524.
 20. Battinelli E, Willoughby SR, Foxall T, Robert Valeri C, Loscalzo J. Induction of platelet formation from megakaryocytoid cells by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(25):14458-14463.