

تحقیقی

اثر دی متیل آرژنین نامتقارن و ان جی - مونو متیل آرژنین بر مهار فعالیت نیتریک اکسید سنتاز

دکتر منیژه کدخدایی ایادرائی^۱، دکتر علی محمد ملک عسکر^۲، مراد رستمی^{۳*}، دکتر محمد آبرومند^۴، دکتر علیرضا خیراله^۵

۱- دانشیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز. ۲- استادیار گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز.

۳- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز. ۴- استادیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز.

چکیده

زمینه و هدف: نیتریک اکسید سنتاز (NOS) آنزیمی است که در تولید نیتریک اکسید (NO) نقش دارد. علیرغم اثرات مفید NO در سیستم‌های مختلف بدن، تولید بیش از حد آن به خاطر تولید گونه‌های نیتروژن فعال (RNS) و نیتروزیلاسیون پروتئین‌ها، دارای اثرات سمی است. این مطالعه به منظور تعیین اثر دی متیل آرژنین نامتقارن (ADMA) و ان جی - مونو متیل آرژنین (L-NMMA) بر مهار فعالیت نیتریک اکسید سنتاز انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه آزمایشگاهی آنزیم NOS طی مراحل هموژنیزاسیون، رسوب با سولفات آمونیوم اشباع و کروماتوگرافی روی ستون‌های DEAE-32 Cellulose و 2',5'-ADP-agarose از ۵۰۰ گرم بافت تازه کلیه گوسفند جدا گردید. طی مراحل جداسازی میزان پروتئین به روش برادفورد و فعالیت آنزیم NOS به روش گریس اندازه‌گیری شد و اثرات مهارکنندگی ADMA و L-NMMA در غلظت ۲۵ میکرومولار بر فعالیت NOS تعیین گردید.

یافته‌ها: فعالیت ویژه و بازده خالص‌سازی NOS به ترتیب ۰/۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین و ۰/۹ درصد به دست آمد. وزن ملکولی آنزیم با استفاده از SDS-PAGE، ۵۴ KD حاصل شد. ADMA و L-NMMA در غلظت‌های ۲۵ میکرومولار موجب کاهش فعالیت آنزیم به ترتیب در حدود ۷۶ درصد و ۶۱/۲ درصد گردید. میزان Km آنزیم NOS در غیاب و در حضور ADMA و L-NMMA به ترتیب ۵/۳۲ میکرومول، ۳۱/۲۵ میکرومول ($P < 0/001$) و ۱۴/۲۹ میکرومول ($P < 0/001$) به دست آمد و در Vmax آنزیم NOS در غیاب و یا در حضور این ترکیبات تغییری ایجاد نشد.

نتیجه‌گیری: ADMA و L-NMMA دارای اثر بازدارندگی رقابتی بر فعالیت آنزیم NOS بوده و ADMA در مقایسه با L-NMMA دارای قدرت بازدارندگی بیشتری است.

کلید واژه‌ها: نیتریک اکسید سنتاز، دی متیل آرژنین نامتقارن، ان جی - مونو متیل آرژنین، کلیه

* نویسنده مسؤول: مراد رستمی، پست الکترونیکی morad_r56@yahoo.com

نشانی: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، تلفن و نمابر ۰۶۱۱-۳۳۳۲۰۳۶

وصول مقاله: ۹۰/۱۱/۳۰، اصلاح نهایی: ۹۱/۹/۲۰، پذیرش مقاله: ۹۲/۳/۱۹

مقدمه

و cGMP نیز متعاقباً سبب باز شدن عروق خونی می‌گردد. NO همچنین در فعالیت‌های مختلف از جمله ایمونولوژیک و هورمونی عمل می‌نماید (۳ و ۲). NO مشتق شده از اندوتلیوم عروق، یک عامل شل‌کننده عضلات صاف بوده و یک واسطه مهم کشش عروقی به شمار می‌آید. NO نقش مهمی در کنترل هورمونی محور نورواندوکراین بازی نموده که از میان آنها به جلوگیری از ترشح هورمون آزاد کننده هورمون رشد و تنظیم آزاد شدن هورمون جسم زرد (LH) می‌توان اشاره نمود. تعدادی از عملکردهای پلاکت شامل اتصال و تجمع آنها به وسیله تولید NO توسط پلاکت‌ها و سلول‌های اندوتلیال کنترل می‌شود (۴). آزاد شدن NO در

نیتریک اکسید (NO) یک رادیکال آزاد بوده و در بسیاری از اعمال فیزیولوژیک و پاتولوژیک سیستم‌های بیولوژیک، نقشی کلیدی ایفا می‌نماید (۱). NO از تبدیل ال-آرژنین به ال-سیترولین، به وسیله خانواده‌ای از آنزیم‌ها موسوم به نیتریک اکسید سنتاز (NOS) (EC.1.14.13.39) ایجاد می‌شود. این واکنش به کوفاکتورهای مختلفی از قبیل NADPH، FMN، FAD، تتراهیدروبیوپترین، کلسیم، کالمودولین و اکسیژن مولکولی نیاز دارد (۲). NO از طرفی به عنوان یک انتقال‌دهنده سیگنال، عمل نموده و گوانیل سیکلاز را فعال و سبب تبدیل GTP به cGMP شده

پانکراس گاو (۲۹ و ۳۰)، مغز گوسفند (۵)، استافیلوکوکوس آرتوس (۱) و گونه‌های نوکاردیا (۳۱) جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی شده‌اند. با توجه به اینکه تاکنون خصوصیات کینتیکی آنزیم NOS از کلیه و چگونگی اثر این مهارکننده‌ها در شرایط آزمایشگاهی بر آنزیم NOS جدا شده از کلیه مورد مطالعه قرار نگرفته است؛ در این مطالعه جداسازی آنزیم NOS از کلیه گوسفند انجام و خصوصیات کینتیکی و همچنین مقایسه اثر مهارکنندگی ADMA و L-NMMA بر فعالیت این آنزیم بررسی شد.

روش بررسی

این مطالعه آزمایشگاهی در گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز از مهرماه ۱۳۸۷ تا دی ماه ۱۳۸۸ انجام شد.

مواد مورد استفاده

تریس-HCL، EDTA، Phenylmethylsulfonyl fluoride، Cellulose، Leupeptine، (PMSF)، DEAE-32، 2',5'-ADP-agarose از شرکت آمریکای سیگما، سولفات آمونیوم، Dithiothritol، آکریل آمید، بیس آکریل آمید، تمد، کوماسی بلو، پر سولفات آمونیوم، سدیم دو دسیل سولفات از شرکت آلمانی مرک، پروتئین مارکر کمپلکس از شرکت فرمنتاس و کیت اندازه‌گیری فعالیت NOS از شرکت آمریکایی کال بیو کم خریداری شدند.

جداسازی NOS از کلیه

در این مطالعه برای استخراج آنزیم NOS از کلیه گوسفند، ابتدا ۵۰۰ گرم بافت تازه کلیه گوسفند (۹ عدد کلیه) در داخل بافر A (تریس-HCL ۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۱ میلی‌مولار، Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1mg/ml، Leupeptine 10mg/ml با pH=۷/۴) بر روی ظرف حاوی یخ، جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه منتقل شد. در ابتدا کلیه‌ها را با بافر A شستشو داده و تمیز نمودیم. پس از قطعه کردن کلیه‌ها، ۹۰۰ میلی‌لیتر بافر A (۱۰۰ میلی‌لیتر بافر A به ازای هر کلیه) به آنها اضافه شد. ابتدا هموریزاسیون به مدت ۵ دقیقه در سرعت بالا انجام شد. سپس با استفاده از سانتریفوژ با سرعت بالا مدل Damon/IEC، در $3000 \times g$ و در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی (Supernatant) که حاوی آنزیم بود؛ جدا و برای ادامه مراحل تخلیص آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. برای تخلیص آنزیم از رسوب دادن به کمک سولفات آمونیوم ۳۰ و ۷۰ درصد و سپس کروماتوگرافی تعویض یونی آنیونی با استفاده از ژل دی اتیل آمینو اتیل ۳۲ سلولز (DEAE-32 Cellulose) انجام گردید (۳۲). شستشوی ستون کروماتوگرافی با بافر A تا زمان رسیدن pH بافر خروجی به ۷/۴

ماکروفاژها در هنگام عمل علیه پاتوژن‌ها و ویروس‌های مختلف داخل سلولی می‌تواند القا شود (۵).

اهمیت NO در تنظیم هموستاز عروقی، هدایت عصبی، دفاع علیه عوامل عفونی (۱)، حرکت سلولی (۳)، عملکرد میوکارد (۶)، شوک عفونی (۷)، تنظیم عملکرد مدولای کلیه (۸)، بیماری‌های ریوی (۹)، پروسه‌های تولید مثلی ماده (۱۰)، تنظیم دمای بدن و تب (۱۱)، عملکردهای مختلف سیستم تولید مثلی مرد و قدرت باروری اسپرم (۱۲)، تعادل نروترانسمیتر در گانگلیای پایه و در پاتولوژی بیماری پارکینسون (۱۳)، عملکرد بازدارندگی غیرمستقیم بر آزاد شدن β -آندورفین (۵)، تبدیل پرولپراسیون به افتراق در طی نوروزن، عمل بازدارندگی بر تکثیر نوروبلاست به صورت *in vivo* در سیستم عصبی مهره‌داران و بی‌مهرگان (۱۴)، تنظیم ترشح شیر، عملکرد حافظه و مهار متابولیسم سلول‌های تومور (۵) به خوبی اثبات شده است. همچنین NO دارای نقش‌های فیزیولوژیک متعددی از جمله تنظیم همودینامیک گلوامرول‌ها و توبول‌ها (۱۰)، وساطت ناتریورز فشاری (۱۱)، برقراری پرفیوژن مدولا (۱۲)، نقش فیدبک گلوامرولی-توبولی (۱۳)، مهار بازجذب توبولی سدیم (۱۴) و تعدیل فعالیت اعصاب سمپاتیک (۱۵) در کلیه‌ها است.

بیشترین اهمیت NO در تنظیم عروقی بوده و جای تعجبی ندارد که بگوئیم NO در تنظیم همودینامیک کلیه نقش مهمی دارد (۱۶). مشخص شده است که NO دارای نقش‌های فیزیولوژیک متعددی از جمله تنظیم همودینامیک گلوامرول‌ها و توبول‌ها (۱۶)، وساطت ناتریورز فشاری (۱۷)، برقراری پرفیوژن مدولا (۱۸)، نقش فیدبک گلوامرولی-توبولی (۱۹)، مهار بازجذب توبولی سدیم (۲۰) و تعدیل فعالیت اعصاب سمپاتیک (۲۱) در کلیه‌ها است.

علیرغم اثرات مفید NO در کشش عروقی، تعدیل دفاع ایمنی و هدایت عصبی، تولید بیش از حد NO به خاطر تولید گونه‌های نیتروژن فعال (RNS) و نیتروزیلاسیون پروتئین‌ها، دارای اثرات سمی است (۱۵) و زمینه التهاب را فراهم می‌آورند (۲۲). به دلیل قدرت واکنشگری و نفوذ بسیار بالای NO، سنتز آن باید به شدت تنظیم گردد (۲۳). همان‌گونه که امروزه استفاده از دهنده‌های NO در درمان برخی اختلالات رایج بوده (۲۲ و ۲۴ و ۲۵)؛ بازدارنده‌های NOS نیز ممکن است بتوانند منجر به تهیه داروهایی جدید، موثر، ایمن و ارزان برای درمان بیماری‌های مختلف گردند (۲۶).

تحقیقات نشان داده است که آنالوگ‌های متیله آرژینین از قبیل دی‌متیل آرژینین نامتقارن (ADMA) و ان-جی-مونو متیل آرژینین (L-NMMA) اثر بازدارندگی بر NOS دارند (۳ و ۲۷).

تاکنون ایزوفرم‌های مختلف NOS از بافت‌ها و سلول‌های موجودات گوناگون، جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی گردیده‌اند (۱). تاکنون NOS از پلاکت‌های انسانی (۲۸)، مغز و

NOS، ابتدا نمودار استاندارد نیترات رسم گردید و سپس با استفاده از آن، فعالیت آنزیم NOS اندازه گیری شد. مقدار نیترات در غلظت های ۵ تا ۳۰ میکرو لیتر تهیه و میزان جذب نوری آنها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از خوانشگر الایزا قرائت شد. سپس منحنی استاندارد نیترات رسم گردید و با استفاده از آن غلظت نیترات تولید شده و در نتیجه میزان فعالیت آنزیم محاسبه گردید.

اثر دی متیل آرژینین نامتقارن و ان جی - مونو متیل آرژینین بر فعالیت NOS کلیه گوسفند

اثر غلظت های مختلف هر یک از ترکیبات ADMA و L-NMMA (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مولار) بر فعالیت ۱۰ میکرو لیتر از ذخیره آنزیم در بافر فسفات پتاسیم (۵۰ mM)، دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و pH برابر ۷ و در حضور غلظت سوبسترا (ال- آرژینین) برای هر آزمایش، ۱۰۰ میکرو مولار انجام گردید. ترکیبات ADMA و L-NMMA، محلول در آب بوده و در آب مقطر دیونیزه حل شدند. درجات مختلف مهار آنزیم NOS توسط غلظت های مختلف ADMA و L-NMMA در طول موج ۵۴۰ نانومتر و با استفاده از واکنش گریس اندازه گیری شد. کینتیک مهار این بازدارنده ها با استفاده از انکو باسیون ۱۰ میکرو لیتر از ذخیره آنزیم با غلظت ۲۵ میکرو مولار دی متیل آرژینین نامتقارن و ان جی - مونو متیل آرژینین در حضور غلظت های صفر تا ۲۰۰ میکرو مولار ال- آرژینین (به عنوان سوبسترا) بررسی شد.

تحلیل آماری

هر آزمایش به طور مستقل، سه بار تکرار شده و همه داده ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد (SD) بیان شدند. فعالیت NOS در غیاب (به عنوان کنترل) و در حضور دی متیل آرژینین نامتقارن و ان جی - مونو متیل آرژینین بررسی شد و با استفاده از آزمون آماری ANOVA با همدیگر مقایسه شدند. مقادیر کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

در هر یک از مراحل استخراج، فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز و مقدار پروتئین مورد سنجش قرار گرفت. سپس فعالیت ویژه، درجه خلوص نسبی و بازده محاسبه گردید. نتایج خالص سازی NOS از کلیه گوسفند در جدول یک آمده است.

در این مرحله اول کروماتوگرافی با DEAE-32 Cellulose، فراکشن های شماره ۳۰ تا ۹۷ دارای جذب نوری بوده و چهار قله (Peak) را در این محدوده تشکیل دادند که پس از سنجش فعالیت آنزیم در این فراکشن ها، دو پیک دارای فعالیت آنزیمی مشاهده شد که به ترتیب در فراکشن های ۳۷ تا ۵۹ و ۶۰ تا ۷۰ مشاهده شدند. پیک اول دارای فعالیت آنزیمی در قسمت های ابتدایی فراکشن اول

ادامه پیدا نمود. در مرحله بعد نمونه دیالیز شده حاصل از رسوب با آمونیوم سولفات توسط پیپت پاستور به آرامی از جدار ستون روی ژل ریخته شد. پس از نفوذ نمونه به داخل ژل، با استفاده از پمپ پرستالتیک، جریان بافر A (با pH=۷/۴) روی ستون حاوی ژل برقرار گردید. میزان سرعت جریان بافر (Flow rate) از ستون در هر دقیقه یک میلی لیتر تنظیم شد. پس از عبور ۱۰۰ میلی لیتر از بافر A (با pH=۷/۴)، ۲۰۰ میلی لیتر از محلول کلرید سدیم (NaCl) در بافر A به صورت گرادیانی از صفر تا ۴۰۰ میلی مولار از ستون عبور داده شد و محلول خارج شده از ستون در حجم ۲ میلی لیتر توسط دستگاه فراکشن کالکتور جمع آوری گردید. در مرحله بعد جذب نوری فراکسیون های جمع آوری شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. فراکسیون های دارای جذب نوری به طور جداگانه جمع آوری و فعالیت آنزیم نیز در آنها اندازه گیری شد (۳۲).

در مرحله بعد فراکشن های دارای فعالیت آنزیمی به طور جداگانه جمع آوری و پس از دیالیز، هر پیک به صورت جداگانه از ستون 2',5'-ADP-agarose با گرادیان صفر تا ۴۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، عبور داده شدند و مقدار پروتئین و فعالیت آنزیمی در فراکشن های جمع آوری شده مشخص گردید. در ادامه کار، فراکشن های دارای فعالیت آنزیمی حاصل از هر دو مرحله کروماتوگرافی با ستون 2',5'-ADP-agarose، از طریق لیوفیلیزه کردن، تغلیظ شده و برای ادامه کار مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه گیری فعالیت NOS

فعالیت آنزیم NOS در طی مراحل مختلف جداسازی و خالص سازی، با استفاده از واکنش گریس (Griess) و کیت اندازه گیری فعالیت آنزیم NOS شرکت کال بیو کم (Nitric Oxide Synthase Assay Kit, Colorimetric, Cat. No. 482702, Calbiochem) اندازه گیری شد. در این روش آنزیم نیتریک اکسید سنتاز، سوبسترای ال- آرژینین را در حضور اکسیژن و NADPH به سیترو لین و NO تبدیل می کند. NO به علت عدم پایداری به متابولیت های پایدار خود یعنی نیترات (NO₃-) و نیتريت (NO₂-) تبدیل می شود. سپس نیترات های تولید شده، توسط نیترات ردوکتاز (NaR) به نیتريت تبدیل شده (تصویر ب- ۲) که این نیتريت ها نیز به نوبه خود با معرف شماره ۱ گریس (Sulfanilamide) واکنش داده و ترکیبی را به وجود می آورند که با معرف شماره ۲ گریس [N-(1-Naphthyl) ethylenediamine] موجب تشکیل یک کمپلکس رنگی می شوند. واکنش مذکور به واکنش گریس (Griess) معروف بوده و در طول موج ۵۴۰ نانومتر دارای بیشترین میزان جذب نوری است. در این روش میزان یک میکرومول نیترات تولید شده در ساعت به عنوان یک واحد فعالیت آنزیمی در نظر گرفته شد (۳۳). برای اندازه گیری فعالیت آنزیم

جدول ۱: مراحل تخلیص آنزیم نیتریک اکسید سنتاز از کلیه گوسفند

| نمونه | حجم (میلی لیتر) | پروتئین (میلی گرم درصد) | پروتئین توتال (میلی گرم) | فعالیت توتال (U) | فعالیت ویژه (U/mg Protein) | درصد باز یافت | خلوص نسبی |
|--|-----------------|-------------------------|--------------------------|------------------|----------------------------|---------------|-----------|
| عصاره خام | ۹۲۵ | ۵۵۷ | ۵۱۵۲ | ۱۰۳ | ۰/۰۲ | ۱۰۰ | ۱ |
| محلول رویی اشباع ۳۰ درصد | ۸۸۴ | ۲۷۰ | ۲۳۸۷ | ۷۱/۶ | ۰/۰۳ | ۶۹/۵ | ۱/۵ |
| رسوب اشباع ۷۰ درصد | ۶۲ | ۱۸۳۹ | ۱۱۴۰ | ۴۵/۶ | ۰/۰۴ | ۴۴/۳ | ۲ |
| نمونه حاصل از دیالیز و تغلیظ با سوکروز | ۱۲ | ۱۲۰۸ | ۱۴۵ | ۱۱/۶ | ۰/۰۸ | ۱۱/۳ | ۴ |
| فراکشن اول ستون DEAE | ۴۶ | ۴۹/۶ | ۲۲/۸ | ۲/۱۲ | ۰/۰۹ | ۲/۱ | ۴/۵ |
| فراکشن دوم ستون DEAE | ۲۲ | ۶۷/۷ | ۱۴/۹ | ۱/۹ | ۰/۱۳ | ۱/۸ | ۶/۵ |
| فراکشن اول ستون 2,5'-ADP-agarose | ۴۶ | ۳/۳ | ۱/۵ | ۰/۹ | ۰/۶ | ۰/۹ | ۲۰ |
| فراکشن دوم ستون 2,5'-ADP-agarose | ۴۲ | ۱/۲ | ۰/۵ | ۰/۱۸ | ۰/۳۶ | ۰/۱۷ | ۱۸ |

غلظت ۲۵ میکرومولار ADMA و L-NMMA توانسته است که به ترتیب ۷۶ و ۶۱/۲ درصد فعالیت آنزیم NOS را مهار نماید. میزان مهار آنزیم در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرومولار این ترکیبات تقریباً ثابت است.

با استفاده از رسم نمودار فعالیت آنزیم در مقابل غلظت سوبسترا (مدل میکائلیس-منتون) و همچنین با استفاده از نتایج آن و رسم نمودار لینور-برک، میزان Km آنزیم NOS در غیاب و در حضور ADMA و L-NMMA به ترتیب ۵/۳۲ میکرومول، ۳۱/۲۵ میکرومول ($P < 0/00001$) و ۱۴/۲۹ میکرومول ($P < 0/00001$) به دست آمد. در Vmax آنزیم NOS در غیاب و یا در حضور این ترکیبات تغییری ایجاد نشد.

بحث

در این مطالعه فعالیت ویژه آنزیم NOS ۰/۶ واحد بین‌المللی بر میلی گرم و بازده عمل آنزیم NOS ۰/۹ درصد به دست آمد.

بر اساس گزارشات ارایه شده در مورد استخراج آنزیم NOS از بافت‌های مختلف، میزان بازده عمل برای آنزیم NOS استخراج شده از استافیلوکوکوس آرنوس (۱)، کبد موش صحرائی (۳۲)، مغز گوسفند (۵) و پانکراس گاو (۲۹) به ترتیب ۲/۸، ۳/۷، ۴ و ۷/۶ درصد بود و علت این گونه تفاوت‌ها ناشی از روش استخراج و ستون‌های به کار گرفته شده، روش اندازه‌گیری آنزیم و نوع ایزوآنزیم استخراج شده در مطالعات مختلف است.

رنگ‌آمیزی ژل‌های به دست آمده با کوماسی بلو، نشان داد که آنزیم به طور خالص جدا شده است. در این مطالعه، وزن ملکولی آنزیم NOS استخراج شده از کلیه گوسفند با الکتروفورز روی SDS-PAGE ۵۴ کیلو دالتون به دست آمد.

طی مطالعات مختلف، وزن ملکولی آنزیم NOS استخراج شده از گونه‌های نوکاردیا (۳۱)، کبد موش صحرائی (۳۲)، ماکروفازهای موش صحرائی (۳۴)، ماکروفازهای موش خانگی (۳۳)، پلاکت‌های انسان (۲۸)، پانکراس گاو (۲۹) و مغز گاو (۳۰) با الکتروفورز روی SDS-PAGE به ترتیب برابر با ۵۱/۹، ۱۳۵، ۱۵۰، ۱۳۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۱۵۰ کیلو دالتون به دست آمده است. همچنین طی یک مطالعه،

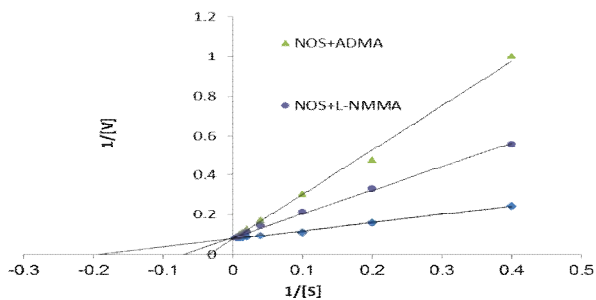
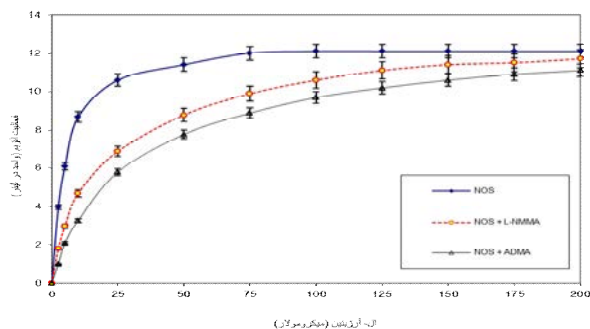
دارای جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر و پیک دوم دارای فعالیت آنزیمی، تقریباً منطبق بر پیک دوم دارای جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر مشاهده شد (نمودار یک).

در مرحله بعد، فراکشن‌های شماره ۳۷ تا ۵۹ حاصل از پیک اول و فراکشن‌های شماره ۶۰ تا ۷۰ حاصل از پیک دوم که دارای فعالیت آنزیمی بودند؛ به‌طور جداگانه جمع‌آوری و پس از دیالیز، هر پیک به صورت جداگانه از ستون 2,5'-ADP-agarose با گرادیان صفر تا ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم عبور داده شدند و مقدار پروتئین و فعالیت آنزیمی در فراکشن‌های جدا شده مشخص گردید. عبور پیک اول دارای فعالیت آنزیمی (فراکشن‌های شماره ۳۷ تا ۵۹) از مرحله DEAE-32 Cellulose، حضور ۴ پیک دارای جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر را نشان داد که از میان آنها فراکشن‌های ۶ تا ۲۷، که تقریباً منطبق بر پیک دوم و سوم دارای جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر بودند؛ فعالیت آنزیمی را از خود نشان دادند (نمودار ۲).

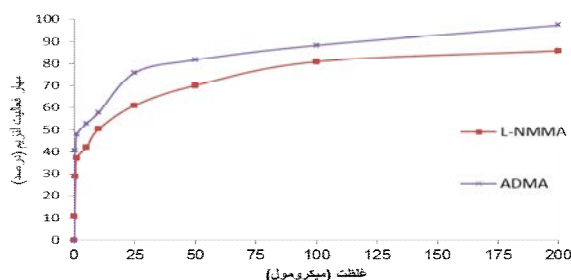
عبور مخلوط فراکشن‌های حاوی فعالیت آنزیم پیک دوم (فراکشن‌های شماره ۶۰ تا ۷۰) حاصل از کروماتوگرافی با ژل DEAE-32 Cellulose، از ستون 2,5'-ADP-agarose، نشان داد که فراکشن‌های شماره ۱ تا ۳۰ دارای جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر بوده و یک قله (Peak) را در این محدوده تشکیل دادند. فراکشن‌های ۶ تا ۲۶ نیز دارای فعالیت آنزیمی بوده که پیک حاصل از فعالیت آنها تقریباً منطبق بر نیمه ابتدایی پیک دارای جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر بودند (نمودار ۳).

نتایج حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE نشان‌دهنده یک باند پروتئینی مجزا با وزن ملکولی ۵۴ کیلو دالتون بود (عکس یک) که نشان‌دهنده خلص سازی مناسب آنزیم است.

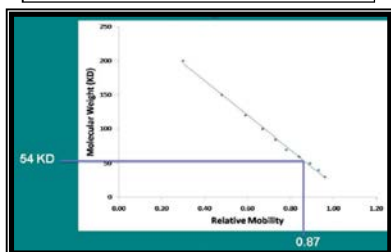
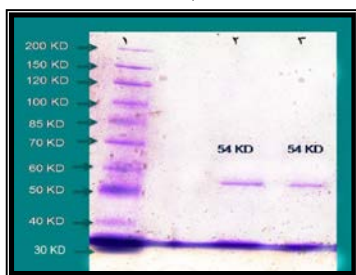
نتایج حاصل از بررسی اثر ADMA و L-NMMA بر فعالیت NOS نیز در نمودار ۴ آمده است. درصد مهار آنزیم NOS توسط ترکیبات فوق در نمودار ۵ آورده شده است. درصد مهار آنزیم توسط این ترکیبات، نشان‌دهنده کاهش فعالیت آنزیم NOS در مقابل این ترکیبات و از طریق وابسته به دوز است. در این مطالعه،



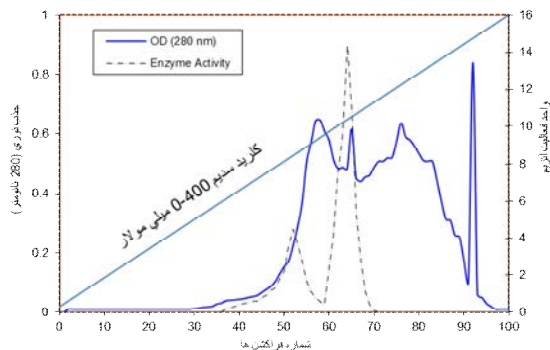
نمودار ۴: اثر غلظت‌های ۲۵ میکرومولار *ADMA* و *L-NMMA* در حضور غلظت‌های مختلف ال-آرژینین بر فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز (A). نمودار B از داده‌های نمودار A به دست آمده است.



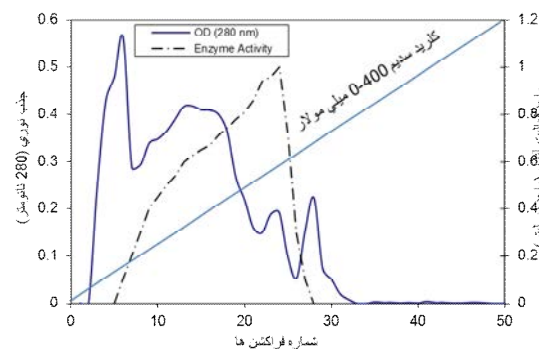
نمودار ۵: مقایسه درصد مهارکنندگی *ADMA* و *L-NMMA* بر فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز



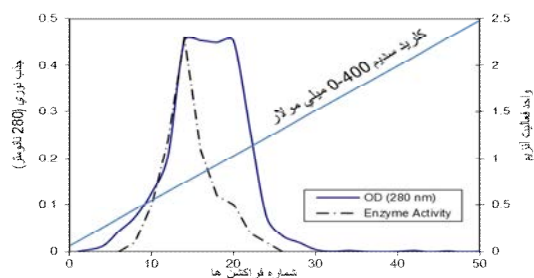
عکس ۱: حرکت الکتروفورزی آنزیم *NOS* استخراج شده از ستون *2',5'-ADP-agarose* بر روی ژل *SDS-PAGE*، ۷/۵ درصد و رنگ آمیزی ژل توسط کوماسی بلو *R-250*. پروتئین مارکر کمپلکس با وزن ملکولی در محدوده ۴۰ کیلو دالتون تا ۲۰۰ کیلو دالتون. وزن ملکولی آنزیم *NOS*، ۵۴ کیلو دالتون نشان داده شد.



نمودار ۱: میزان جذب نوری (۲۸۰ نانومتر) و فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز در فراکشن‌های جدا شده از ستون *DEAE-32 Cellulose*. نمونه توسط محلول کلراید سدیم با گرادیان صفر تا ۴۰۰ میلی مولار از ستون عبور داده شد. سرعت عبور این محلول، یک میلی لیتر در دقیقه تنظیم گردید.



نمودار ۲: میزان جذب نوری (۲۸۰ نانومتر) و فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز پیک اول دارای فعالیت آنزیم *NOS* از مرحله *DEAE-32 Cellulose* در فراکشن‌های جدا شده از ستون *2',5'-ADP-agarose* محلول کلراید سدیم با گرادیان صفر تا ۴۰۰ میلی مولار از ستون عبور داده شد. سرعت عبور محلول کلراید سدیم، یک میلی لیتر در دقیقه تنظیم گردید.



نمودار ۳: میزان جذب (۲۸۰ نانومتر) و فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز پیک دوم دارای فعالیت آنزیم *NOS* حاصل از کروماتوگرافی با ژل *DEAE-32 Cellulose*، در فراکشن‌های جدا شده از ستون *2',5'-ADP-agarose* نمونه توسط محلول کلراید سدیم با گرادیان صفر تا ۴۰۰ میلی مولار از ستون عبور داده شد. سرعت عبور این محلول، یک میلی لیتر در دقیقه تنظیم گردید.

از مغز گوسفند را به ترتیب ۲/۸ میکرومول و ۲۲۵ نانومول در دقیقه در میلی گرم پروتئین به دست آوردند. آنها همچنین Ki را در مورد L-NNA به میزان ۲/۲ میکرومول گزارش نمودند (۵). Km ایزوفرم nNOS موش صحرایی نیز ۲ میکرومول به دست آمده است (۳۷).

در مطالعه Hong و همکاران نیز میزان Km و Vmax آنزیم NOS استخراج شده از استافیلوکوکوس آرنوس به ترتیب ۱۳/۴ میکرومول و ۳۵/۳ نانومول در دقیقه در میلی گرم پروتئین به دست آمده است (۱). این مقادیر برای گونه‌های نوکاردیا به ترتیب ۵/۷ میکرومول و ۲۷۴ نانومول در دقیقه در میلی گرم پروتئین بوده است (۳۱) که با یکدیگر کاملاً متفاوت است. Km آنزیم NOS استخراج شده از پانکراس گاو نیز ۱۵/۷۲ میکرومول به دست آمده است (۲۹).

در مطالعه Nam و همکاران، L-NNA توانست به طور بارزی آنزیم NOS استخراج شده از پانکراس گاو را مهار نماید. در حالی که دی متیل آرژینین متقارن (SDMA) هیچگونه اثر بازدارندگی بر آن نداشت (۲۹).

L-NMMA در غلظت ۰/۴ میلی مول توانست ۹۶ درصد فعالیت آنزیم NOS استخراج شده از کبد موش صحرایی را مهار نماید (۳۲). در طی یک مطالعه که به بررسی اثر مهارتی ترکیبات L-NMMA، نیترو آرژینین متیل استر (L-NAME)، L-NNA و ان جی-سیکلو پروپیل ال-آرژینین (L-NCPA) پرداخته شده است؛ ترتیب قدرت مهارکنندگی این بازدارنده‌ها به صورت $L-NMMA > L-NNA = L-NCPA > L-NMME$ به دست آمد و این بازدارنده‌ها، ایزوزیم iNOS را به صورت رقابتی مهار نمودند (۳۸).

در یک مطالعه دیگر، L-NMMA، L-NMME، آمینو گوانیدین (AG) و متیل ایزو تیوره (MIU) توانستند آنزیم NOS استخراج شده از استافیلوکوکوس را از طریق وابسته به دوز مهار نمایند. بیشترین قدرت بازدارندگی این بازدارنده‌ها در غلظت ۱۰۰ میکرومول بر آنزیم مربوط به AG و پس از آن به ترتیب مربوط به L-NMME، L-NMMA و MIU بوده است (۱).

برخی از این بازدارنده‌ها از جمله ADMA و L-NMMA، خون و ادرار انسان یافت می‌شوند که ADMA با غلظتی حدود ۱۰ برابر بیشتر وجود داشته (۳۹) و غلظت داخل سلولی آن حدود ۵ برابر بیشتر از غلظت خارج سلولی آن است (۴۰). این بازدارنده‌ها موجب مهار NOS و در نتیجه موجب مهار تولید NO می‌گردند (۳). ADMA نیز همانند NO توسط سلول‌های اندوتلیال ساخته و آزاد می‌شود. مطالعاتی حاکی از توانایی ADMA به عنوان یک مارکر و یک مداخله قوی در سندرم عملکرد نامطلوب اندوتلیال و ایجاد بیماری‌های قلبی-عروقی، کلیوی و پره‌کلامپسی است (۳ و ۴).

آنزیم NOS استخراج شده از استافیلوکوکوس آرنوس با الکتروفورز روی SDS-PAGE دو باند با وزن ملکولی ۶۴ و ۶۷ کیلو دالتون تشکیل داد (۱). با توجه به اکثر مطالعات به نظر می‌رسد که در اغلب موارد، آنزیم NOS به صورت همودایمر بوده (۲۸ و ۳۰ و ۳۲ و ۳۳) و تنها در برخی موارد معدود، به صورت هتروداایمر گزارش شده است (۱). در مطالعه ما نیز با توجه به تشکیل تنها یک باند در الکتروفورز روی SDS-PAGE، به نظر می‌رسد که در صورت داشتن زیر واحد، ساختمان این آنزیم به صورت همودایمر است که با اغلب مطالعات صورت گرفته، همخوانی دارد. در مطالعه حاضر برای بررسی اثر ADMA و L-NMMA بر فعالیت آنزیم NOS، اثر غلظت‌های متفاوت این ترکیبات (۲۰۰-۰/۱ Mμ) بر آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش تدریجی غلظت‌های این ترکیبات، فعالیت آنزیم NOS از لحاظ آماری به طور معنی‌داری کاهش یافت ($n=3, p<0/05$). غلظت ۲۵ میکرو مولار ADMA و L-NMMA قادر بود تا فعالیت این آنزیم را به ترتیب در حدود ۷۶ و ۶۱/۲ درصد کاهش دهد.

در مطالعه حاضر برای تعیین نوع مهارکنندگی، اثر غلظتی از ADMA و L-NMMA که تحت تاثیر آن، بیشترین میزان مهار فعالیت آنزیم حاصل گردید (۲۵ Mμ) در غلظت‌های مختلف ال-آرژینین (۲۰۰-۲/۵ Mμ) مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج حاصل و سپس رسم نمودارهای میکائیلیس-منتون و لینیور-برک، Km آنزیم NOS استخراج شده از کلیه گوسفند در غیاب بازدارنده‌ها، تقریباً ۵/۳۲ میکرومول و در حضور بازدارنده‌های ADMA و L-NMMA به ترتیب در حدود ۳۱/۲۵ و ۱۴/۲۹ میکرومول به دست آمد. همچنین Vmax آنزیم NOS استخراج شده از کلیه گوسفند در غیاب و یا در حضور بازدارنده‌های فوق، در حدود ۱۲/۵ به دست آمد و مشخص گردید که هر چهار بازدارنده فوق به طور رقابتی باعث مهار آنزیم NOS می‌گردند و قدرت مهارکنندگی این بازدارنده‌ها بر فعالیت آنزیم NOS استخراج شده از کلیه گوسفند به صورت $ADMA > L-NMMA$ حاصل شد.

در مطالعه Chen و Rosazza، Km و Vmax آنزیم NOS استخراج شده از گونه‌های نوکاردیا به ترتیب ۵/۷ میکرومول و ۲۷۴ نانومول در دقیقه در میلی گرم پروتئین گزارش شد. همچنین میزان Ki برای L-NMMA و ان جی-نیترو ال-آرژینین (L-NNA) که به صورت رقابتی موجب مهار آنزیم شد؛ به ترتیب ۶/۲ و ۹/۸ میکرومول به دست آمد. Ki بازدارنده L-NNA، بالاتر از Ki بازدارنده L-NMMA به دست آمد (۳۱). در حالی که طی مطالعات دیگر و در پستانداران مقادیر Ki بازدارنده‌های L-NMMA و L-NNA یکسان و یا در مورد L-NNA پایین تر بوده است (۳۵ و ۳۶). Crack و همکاران نیز Km و Vmax آنزیم NOS استخراج شده

نمود که همانند استفاده از دهنده‌های NO در هنگام کاهش تولید آن در بدن، لازم است که در موارد افزایش تولید آن نیز با استفاده از تجویز بازدارنده‌های NOS، به تنظیم سطح NO در بدن پرداخته و با این کار باعث کاهش اثرات سمی آن در بدن شده و به درمان آسیب ایجاد شده پرداخت. همچنین با توجه به تفاوت اثر بازدارندگی ترکیبات فوق می‌توان از آنها در درمان بیماری‌ها با شدت‌های متفاوت استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که ADMA و L-NMMA اثر بازدارندگی رقابتی بر فعالیت آنزیم NOS داشته و ADMA مقایسه با L-NMMA دارای قدرت بازدارندگی بیشتری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی (شماره ۸۸۰۹۲-U) و پایان‌نامه مراد رستمی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی بالینی از دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز بود. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز به خاطر تامین مالی طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- Hong IS, Kim YK, Choi WS, Seo DW, Yoon JW, Han JW, et al. Purification and characterization of nitric oxide synthase from *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 2003 May; 222(2):177-82.
- Baek KJ, Thiel BA, Lucas S, Stuehr DJ. Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. J Biol Chem. 1993 Oct;268(28):21120-9.
- Dash Ph. Apoptosis. Available at www.sgu.ac.uk/dept/immunology/~dash
- Alonso D, Radomski MW. Nitric oxide, platelet function, myocardial infarction and reperfusion therapies. Heart Fail Rev. 2003 Jan;8(1):47-54.
- Crack PJ, Tetaz T, Smith AI. Purification, characterisation and distribution of ovine neuronal nitric oxide synthase. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 1998 Aug;120(4):727-33.
- Berges A, Van Nassauw L, Bosmans J, Timmermans JP, Vrints C. Role of nitric oxide and oxidative stress in ischaemic myocardial injury and preconditioning. Acta Cardiol. 2003 Apr; 58(2):119-32.
- Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD. The role of nitric oxide in oral diseases. Arch Oral Biol. 2003 Feb;48(2):93-100.
- Cowley AW Jr, Mori T, Mattson D, Zou AP. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003 Jun;284(6):R1355-69.
- Kharitonov SA, Barnes PJ. Nitric oxide, nitrotyrosine, and nitric oxide modulators in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Curr Allergy Asthma Rep. 2003 Mar;3(2):121-9.
- Maul H, Longo M, Saade GR, Garfield RE. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. Curr Pharm Des. 2003;9(5):359-80.
- Steiner AA, Branco LGS. Nitric oxide in the regulation of body temperature and fever. J Therm Biol. 2001 Sep; 26(4-5): 325-30.

در مطالعه Ashina و Bendtsen و ADMA به طور بارزی سردرد را کاهش داد (۴۱).

L-NMMA نخستین بازدارنده شناخته شده NOS است که بازدارنده فارماکولوژیکی استاندارد در محیط *in vivo* و *in vitro* معرفی شده است (۴۰). Levesque و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر ۲۲ بازدارنده NOS از جمله L-NMMA را بر سلول‌های CLL بررسی نمودند. نتایج بررسی آنها حاکی از القای اثر آپوپتوزی بازدارنده‌های NOS بر سلول‌های CLL بود (۲۶).

در مطالعاتی که با استفاده از برخی بازدارنده‌های NOS انجام شده؛ نشان داده شده است که NO نقش مهمی در حفظ کشش عروقی در کلیه‌ها دارد. به صورتی که در کلیه‌ها، مقاومت عروقی کمتری نسبت به سایر ارگان‌ها وجود دارد (۱۶). مهار سنتز NO کلیوی به وسیله تزریق داخل شریانی L-NNA، در سگ‌های بیهوش شده، منجر به یک افزایش ۵۰ درصدی در مقاومت عروقی کلیوی و کاهش ۲۵ درصدی در جریان خون کلیه و کاهش مشابه در پرفیوژن هر دو قسمت کورتکس و مدولا شد (۴۲). با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌توان پیشنهاد

- Herrero MB, Gagnon C. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. J Androl. 2001 May-Jun;22(3):349-56.
- Gomes MZ, Raisman-Vozari R, Del Bel EA. A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. Brain Res. 2008 Apr;1203:160-9.
- Gibbs SM. Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. Mol Neurobiol. 2003 Apr; 27(2):107-20.
- Sharma SP. Nitric oxide and the kidney. Indian J Nephrol. 2004; 14:77-84.
- Majid DS, Navar LG. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. Am J Hypertens. 2001 Jun; 14(6 Pt 2):74S-82S.
- Majid DS, Williams A, Navar LG. Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates pressure-induced natriuretic responses in anesthetized dogs. 1993 Jan; 264(1 Pt 2):F79-87.
- Mattson DL, Roman RJ, Cowley AW Jr. Role of nitric oxide in renal papillary blood flow and sodium excretion. Hypertension. 1992 Jun;19(6 Pt 2):766-9.
- Wilcox CS. Role of macula densa NOS in tubuloglomerular feedback. Curr Opin Nephrol Hypertens. 1998 Jul;7(4):443-9.
- Ortiz PA, Garvin JL. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. Am J Physiol Renal Physiol. 2002 May; 282(5):F777-84.
- Eppel GA, Denton KM, Malpas SC, Evans RG. Nitric oxide in responses of regional kidney perfusion to renal nerve stimulation and renal ischaemia. Pflugers Arch. 2003 Nov;447(2):205-13.
- Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. J Physiol Pharmacol. 2003 Dec;54(4):469-87.
- Bredt DS. Nitric oxide signaling specificity--the heart of the

problem. *J Cell Sci.* 2003 Jan;116(Pt 1):9-15.

24. Rossmannith WG, Hoffmeister U, Wolfahrt S, Kleine B, McLean M, Jacobs RA, et al. Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta. *Mol Hum Reprod.* 1999 May;5(5):487-94.

25. Cragan JD. Teratogen update: Methylene blue. *Teratology* 1999; 60:42-48.

26. Levesque MC, Ghosh DK, Beasley BE, Chen Y, Volkheimer AD, O'Loughlin CW, et al. CLL cell apoptosis induced by nitric oxide synthase inhibitors: correlation with lipid solubility and NOS1 dissociation constant. *Leuk Res.* 2008 Jul;32(7):1061-70.

27. Barber DA, Rubin JW, Zumbro GL, Tackett RL. The use of methylene blue as an extravascular surgical marker impairs vascular responses of human saphenous veins. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995 Jan;109(1):21-9.

28. Muruganandam A, Mutus B. Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. *Biochim Biophys Acta.* 1994 May; 1200(1):1-6.

29. Nam SW, Seo DW, Sung DS, Han JW, Hong SY, Lee HW. Nitric oxide synthase from bovine pancreas: purification and characterization. *Arch Pharm Res.* 1998 Apr;21(2):128-34.

30. Ohshima H, Oguchi S, Adachi H, Iida S, Suzuki H, Sugimura T, Esumi H. Purification of nitric oxide synthase from bovine brain: immunological characterization and tissue distribution. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Feb;183(1):238-44.

31. Chen Y, Rosazza JP. Purification and characterization of nitric oxide synthase (NOS_{Noc}) from a *Nocardia* species. *J Bacteriol.* 1995 Sep; 177(17): 5122-8.

32. Evans T, Carpenter A, Cohen J. Purification of a distinctive form of endotoxin-induced nitric oxide synthase from rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jun; 89(12):5361-5.

33. Hevel JM, White KA, Marletta MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem.* 1991 Dec; 266(34):22789-91.

34. Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Kawai C. Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem.* 1991 Jul;266(19):12544-7.

35. Klatt P, Schmidt K, Brunner F, Mayer B. Inhibitors of brain nitric oxide synthase. Binding kinetics, metabolism, and enzyme inactivation. *J Biol Chem.* 1994 Jan;269(3):1674-80.

36. Mayer B, Schmid M, Klatt P, Schmidt K. Reversible inactivation of endothelial nitric oxide synthase by NG-nitro-L-arginine. *FEBS Lett.* 1993 Oct;333(1-2):203-6.

37. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jan; 87(2):682-5.

38. Liu ZQ, Wildhirt SM, Zhou HH. Specificity of inducible nitric-oxide synthase inhibitors: prospects for their clinical therapy. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1999 Nov;20(11):1052-6.

39. Tsukahara H, Ohta N, Tokuriki S, Nishijima K, Kotsuji F, Kawakami H, et al. Determination of asymmetric dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in umbilical blood. *Metabolism.* 2008 Feb;57(2):215-20.

40. Vallance P. Comment: the asymmetrical dimethylarginine/dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway in the regulation of nitric oxide generation. *Clin Sci (Lond).* 2001 Feb;100(2):159-60.

41. Ashina M, Bendtsen L. Chronic headache and nitric oxide inhibitors. *J Headache Pain.* 2001 June; 2(1): 21-4.

42. Majid DS, Navar LG. Suppression of blood flow autoregulation plateau during nitric oxide blockade in canine kidney. *Am J Physiol.* 1992 Jan; 262(1 Pt 2):F40-6.

Original Paper

Inhibitory effect of asymmetric dimethylarginine and NG-Monomethyl-L-arginine methyl ester on nitric oxide synthase activity

Kadkhodaei Elyaderani M (PhD)¹, Malek Askar AM (PhD)²
Rostami M (MSc)*³, Aberomand M (PhD)⁴, Kheirollah AR (PhD)⁴

¹Associate Professor, Department of Biochemistry, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

²Assistant Professor, Department of Genetics, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran. ³MSc in Biochemistry, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran. ⁴Assistant Professor, Department of Biochemistry, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Abstract

Background and Objective: Nitric oxide synthase (NOS) play a role in nitric oxide (NO) generation. Despite the beneficial effects of NO on different body systems its overproduction of produce reactive nitrogen species (RNS) and nitrosilation of proteins. This study was done to evaluate the effect of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and NG-Monomethyl-L-arginine methyl ester (L-NMMA) on inhibition of nitric oxide synthase activity.

Materials and Methods: In this laboratory study, Nitric oxide synthase was extracted from 500 grams of sheep kidney by homogenization, ammonium sulphate precipitation and column chromatography on DEAE-32 Cellulose and 2', 5'-ADP-agarose. During purification, protein content was measured according to the Bradford and enzyme activity was assayed using the Griess reactions the inhibitory effects of 25 μ M concentrations of ADMA and L-NMMA on purified enzyme were determined.

Results: Specific activity and yield of NOS were 0.6 units/mg protein and 0.9%, respectively. Molecular weight of purified enzyme was 54 KD with SDS-PAGE. ADMA and L-NMMA in 25 μ M concentrations reduced enzyme activity by 76 and 61.2%, respectively. Km values for NOS in absence and in presence of ADMA and L-NMMA were 5.32 μ M, 31.25 μ M ($P < 0.05$) and 14.29 μ M ($P < 0.05$), respectively. Vmax for NOS in absence and presence of inhibitors was not changed.

Conclusion: ADMA and L-NMMA have competitive inhibitory effect on NOS activity and ADMA have higher inhibitory effect than L-NMMA.

Keywords: Nitric oxide synthase, Asymmetric dimethyl Arginine, NG-monomethyl-L-arginine methyl ester, Kidney

* Corresponding Author: Rostami M (MSc), E-mail: morad_r56@yahoo.com

Received 19 February 2012 Revised 10 December 2012 Accepted 9 June 2013