

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

افسانه رنجبر<sup>۱</sup>، دکتر مهدی نعمت بخش<sup>۲</sup>

### چکیده

سابقه و هدف: پپتید ناتریورتیک دهلیزی (ANP) نوعی هورمون پپتیدی با ۲۸ اسید آمینه می باشد که در زمان کشش دهلیزها به داخل خون آزاد می شود. تحقیقات گذشته نشان می دهد که گلوکوکورتیکوئیدها باعث بیان ژن ANP می شوند و سطح آن را افزایش می دهند. کتوکونازول نوعی داروی آنتی آدرنال است که میزان گلوکوکورتیکوئیدها را کاهش داده و در نتیجه میزان ANP سرم کم می شود. لذا به منظور تعیین اثرات فیزیولوژیک عصاره ANP، این تحقیق روی موش هایی کتوکونازول که دریافت نموده اند، انجام گرفت. مواد و روش ها: در تحقیق حاضر از دهلیز قلب انسان برای تهیه عصاره ANP استفاده شد. برای تهیه عصاره یافت، آن را در حلال خاصی جوشانیده تا پروتئین های آن غیر فعال شود و بعد بافت مورد نظر در ۴ درجه سانتی گراد هموزنه و سانتریفوژ شد. جهت تنظیم PH عصاره، عمل دیالیز بر روی آن انجام گرفت. یافته ها: فشار نبض و فشار سیستولی و دیاستولی در موش هایی که کتوکونازول دریافت نموده بودند بالاتر از گروه های کنترل بود. به نظر می رسد که این پدیده به دلیل کاهش کامپلیانس عروق رخ می دهد. تزریق عصاره دهلیز قلب انسان به موش باعث کاهش فشار خون شریانی می شود و این کاهش با شیب ملایمی انجام می شود. نتیجه گیری و توصیه ها: به نظر می رسد که از ANP بتوان در بهبود بیماران مبتلا به آرترئواسکلروز استفاده کرد.

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

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی جهرم

۲- گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

## مقدمه

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 (۹ و ۸) 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 ۴۰ گرم از بافت دهلیز انسانی که بیش از ۱۰ ساعت از مرگ وی نگذشته بود را برداشته و برای غیرفعال نمودن پروتئازهای این بافت به مدت ۵ دقیقه در محلولی ۷ برابر حجم بافت جوشانیده شد. این محلول حاوی ۱ مولار اسیداستیک به همراه ۲۰ میلی‌مولار اسیدکلریدریک بود. محلول خنک‌شده در ۴ درجه سانتی‌گراد هم‌وزن شده و پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه 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 ۱۵ دقیقه در

پپتید ناتریوریتیک دهلیزی (ANP)<sup>۱</sup> هورمونی پپتیدی با ۲۸ اسید آمینه است که از میوسیت‌های دهلیز در زمانی که جدار آنها تحت کشش 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 P<sub>450</sub> در غشاء درونی میتوکندری (۲ و ۳)، کاهش ترشح رنین و در نهایت کاهش تولید آنژیوتانسین II خون (۴). ژن سنتزکننده و کنترل‌کننده این هورمون بر روی بازوی کوتاه کروموزم شماره یک قرار دارد. این ژن شامل ۱۳ اکسون (**peptide coding region**) است که به وسیله دو اینترون (**Intevenig saquance**) جدا می‌شود. اکسون ۱ قسمت **leader saquance** را کد می‌کند که برای هر پپتید ترشعی لازم است. اکسون ۲ قسمت فعال مولکول را کد می‌کند و اکسون ۳ فقط تیروزین موجود در انتهای کروبوکسیل را کد 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 مینرالوکورتیکوئیدها درمان شوند (۶ و ۷).

کتوکونازول ساخت استروئیدهای غده 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

<sup>1</sup>- Atrial Natriuretic Peptide

دستگاه تنفس مصنوعی وصل و ورید ژوگولار و شریان رانی ایزوله و هر دو کاتول 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) ۲ گروه در قبل از تجویز ANP و به فاصله ۵ دقیقه به ۵ دقیقه بررسی شد.

#### یافته‌ها

تحقیق روی ۱۰ موش و در ۲ گروه ۵ نفری انجام گرفت. در جدول ۱ 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 مهار شده، ANP سرم کاهش یافته و میزان فشارخون افزایش یافته است، اما افزایش فشار سیستولی بیش از فشار دیاستولی است.

جدول ۱- میانگین ( $\pm$  میانگین انحراف معیار) فشارخون موش‌های دریافت کننده کتوکونازول در قبل و بعد از تزریق عصاره ANP (گروه مورد) با سرم فیزیولوژی (گروه شاهد)

گروه‌ها	شاهد		مورد	
	فشار سیستولی mmHg	فشار دیاستولی mmHg	فشار سیستولی mmHg	فشار دیاستولی mmHg
قبل از تزریق	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰
۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰
۱۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰
۱۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰
۲۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰
۲۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰
۳۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰
۳۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰
۴۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰
۴۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰
۵۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰	۱۰۰±۱۰	۶۰±۱۰

محلولی که حاوی ۱۰ گرم در لیتر کربنات سدیم همراه با یک میلی‌مول EDTA بود قرار گرفت. سپس کیسه به مدت ۱۰ دقیقه 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 ۱۰۰ برابر حجم عصاره موجود در کیسه بود. محلول مورد استفاده در دیالیز شامل ۰/۲ مولار بی‌کربنات سدیم و ۰/۱۵ مولار کلرید سدیم بود. کیسه حاوی عصاره در دو نوبت ابتدا به مدت ۸ ساعت و سپس به مدت ۲۴ ساعت در محلول قرار گرفت. دیالیز در دمای ۴ درجه 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 حرارت  $20 \pm 21$  و چرخه نوری کنترل شده نگهداری می‌شدند و به آب و غذا دسترسی کامل داشتند. به مدت ۴ روز کتوکونازول با دوز  $100 \text{ mg/kg/day}$  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 باریتال با دوز  $60 \text{ mg/kg}$ ، از طریق تراشه 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 ANP خالص استفاده شده است. عصاره دهلیز قلب انسان بر روی موش مؤثر است. تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که ANP 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 و ۱۰).

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 (۷ و ۶). ANP باعث شل شدن عضله صاف جدار رگ و افزایش کمپلینانس سیستم عروقی می‌گردد. اتصال ANP به گیرنده‌های سطحی باعث فعال شدن آنزیم گوانیلات سیکلاز می‌شود که فعالیت این آنزیم، غلظت گوانوزین مونوفسفات حلقوی (cGMP) افزایش می‌دهد. 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 آنزیموتانسین II (AgII) جلوگیری می‌کند. AgII با فعال کردن فسفولیپاز C و افزایش کلسیم

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 ( $\pm$  انحراف معیار) فشار خون موش‌های دریافت‌کننده متیل کربوکسی سلولز در قبل و بعد از تزریق عصاره ANP (گروه مورد) یا سرم فیزیولوژی (گروه شاهد).

گروه	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	۱۴۹٫۳۳±۱٫۴۶	۱۱۰٫۶۶±۱٫۸۸
۱۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۶±۴	۱۱۶±۴	۱۵۰٫۶۶±۲٫۷۷	۱۱۲±۰٫۶۲
۱۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۶۰±۸	۱۱۸±۲	۱۵۰٫۶۶±۲٫۷۷	۱۱۳٫۳۳±۲٫۹۷
۲۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۸±۲	۱۱۸±۲	۱۲۰٫۳۳±۱٫۰۵۷	۹۳٫۳۳±۱٫۰۵۷
۲۵ دقیقه بعد از تزریق	±۱۶ ۱۵۸	۱۱۶±۴	۱۳۲±۰٫۱۱۳	۹۷٫۳۳±۱٫۰۸۳
۳۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۸±۲	۱۱۸±۶	۱۱۶±۰٫۷۰	۱۰۹٫۳۳±۲٫۷۰۹
۳۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۸±۲	±۲۴ ۱۱۶	۱۴۰±۲٫۹۰۲	۱۰۸±۲٫۰۹۳
۴۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۶±۴	۱۱۶±۴	۱۴۴±۳٫۱۴	۱۱۰٫۶۶±۲٫۸۰۳
۴۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۸±۶	۱۱۶±۴	۱۴۱٫۳۰±۲٫۹۰	۱۱۴٫۶۶±۰٫۳۰
۵۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۵۸±۶	۱۱۶±۴	۱۴۴±۲٫۲۰	۱۰۹٫۳۳±۲٫۷۰

### بحث

ANP) پپتید ناتریوریتیک دهلیزی (ANP) هورمونی پپتیدی با ۲۸ اسید آمینه است که از میوسیت‌های جدا دهلیز در زمانی که تحت کشش قرار می‌گیرند به داخل خون آزاد می‌شود. ANP پس از ورود به

افزایش می‌یابد 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 می‌یابد. در موش‌هایی که کتوکونازول دریافت نموده‌اند در اثر تزریق عصاره دهلیز قلب، کاهش فشار به آرامی و با شیب ملایمی صورت می‌گیرد، و می‌توان بیانگر این موضوع باشد که ANP احتمالاً در کاهش فشار بیماران مبتلا به آرتریواسکلروز مؤثر است (۱۱ و ۱۲).

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 کامپلیانس عروق می‌شود (۱۱ و ۱۲).

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

## REFERENCES

1. Brenner BM, Ballermann BJ, Cunnning 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 steroidogenesis. *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. *Biochee 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 polypeptides. *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 guanylyl cyclase coplex 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.