

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 شناسه ۲۸ اسید آمینه می باشد که در زمان کش دهلیزها به داخل خون آزاد می شود. تحقیقات گذشته نشان می دهد که گلوكوكورتيکوئیدها باعث بیان زن ANP می شوند و سطح آن را افزایش می دهند. کتوکونازول نوعی داروی انتقائی است که میزان گلوكوكورتيکوئیدها را کاهش داده و در تیجه میزان ANP سرم کم می شود. لذا به منظور تعیین اثرات فیزیولوژیک عصاره ANP، این تحقیق روی موسشایی 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 بافت، آن را در حلال خاصی جوشانیده تا پروتئنهای آن غیر فعال شود و بعد بافت مورد نظر در ظرف سانتی گراد هموزن و سانتریپور شد. جهت تنظیم PH عصاره، عمل دیالیز بر روی آن انجام گرفت. بافت ها: فشار بیض و فشار سیستولی و دیاستولی در موسشایی که کتوکونازول دریافت نموده بودند بالاتر از گروههای کنترل بود. به نظر می رسد که این پذیره به دلیل کاهش کامپلیانس عروق رخ می دهد. تزریق عصاره دهلیز قلب انسان به موس باعث کاهش فشار خون شربانی می شود و این کاهش با شب ملایمی انجام می شود. نتیجه گیری و توصیه ها: به نظر می رسد که از ANP بتوان در بهبود بیماران مبتلا به آرتربرواسکلروز استفاده کرد.

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

۱ - گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی جهرم

۲ - گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

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) به منظور تعیین تأثیر فیزیولوژیک عصاره ANP بر تغیرات فشارخون شریانی پرسشنایی که کتوکونازول دریافت نموده‌اند، این تحقیق انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در دو مرحله انجام گرفت:

Exploratory در مرحله اول تحقیق به روش 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 پیش از ۱۰ ساعت از مرگ وی نگذشته بود را برداشته و برای غیرفعال نمودن پروتازهای این بافت به مدت ۵ دقیقه در محلولی لاپراپر حجم بافت جوشانیده شد. این محلول حاوی ۱ مولار اسیداستیک به همراه ۲۰ میلی مولار اسید کلریدریک بود. محلول خنک شده در ۴ درجه سانتی گراد هموزنده شده و پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید (۱۰). بعد از سانتریفیوژ 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

مقدمه

پیتید ناتریورتیک دهلیزی (ANP¹) هورمونی پیتیدی با آسید 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 کلسترون به سیتوکروم P450 در غشاء درونی میتوکندری (۲ و ۳)، کاهش ترشح رنین و در نهایت کاهش تولید آنزیوتانسین II خون(۴). ژن سنتزکننده و کنترل کننده این هورمون بر روی بازوی کوتاه کروموزم شماره یک قرار دارد. این ژن شامل اکسون (peptide coding region) است که به وسیله دو ایترنون (Intevening saquence) leader squance جدا می‌شود. اکسون ۱ قسمت leader squance را کد می‌کند که برای هر پیتید ترشحی لازم است. اکسون ۲ قسمت فعال مولکول را کد می‌کند و اکسون ۳ فقط تیروزین موجود در انتهای کروپوکسیل را کند می‌کند(۵).

گلوکوکورتیکوئیدها بر روی بیان ژن ANP دارند و دارای گیرنده‌ای در ایسترون ۲ هستند که از این طریق میزان نسخه برداری DNA را کنترل می‌کنند. اهمیت گلوکوکورتیکوئیدها بر روی بیان ژن ANP توسط یک سری تحقیقات بر روی موشهای قادر غده آدرنال تأیید شده است. این موشهای قادر نیستند در جواب افزایش فشار دهلیز میزان ترشح ANP خود را بالا ببرند، مگر آنکه با گلوکورتیکوئیدها 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

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) 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 گلوكوریکوئیدها مهار شده، ANP سرم کاهش یافته و میزان فشارخون افزایش یافته است، اما افزایش فشارسیستولیک بیش از فشار دیاستولی است.

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

مورد	شاهد					گروهها کتوکونازول
	فشار دیاستولیک mmHg	فشار سیستولیک mmHg	فشار دیاستولیک mmHg	فشار سیستولیک mmHg	فشار دیاستولیک mmHg	
۱-۱	۷۶±۱۲	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	فریبان تزریق
۱-۲	۷۶±۱۲	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۵ دقیقه بعد از تزریق
۱-۳	۷۶±۱۲	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۱۰ دقیقه بعد از تزریق
۱-۴	۷۶±۱۲	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۱۵ دقیقه بعد از تزریق
۱-۵	۷۶±۱۲	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۲۰ دقیقه بعد از تزریق
۱-۶	۷۶±۱۲	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۲۵ دقیقه بعد از تزریق
۱-۷	۷۶±۱۲	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۳۰ دقیقه بعد از تزریق
۱-۸	۷۶±۱۲	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۳۵ دقیقه بعد از تزریق
۱-۹	۷۶±۱۲	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۴۰ دقیقه بعد از تزریق
۱-۱۰	۷۶±۱۲	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۱۱۰±۲۶	۷۶±۲۶	۴۵ دقیقه بعد از تزریق

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 اولن حاوی محلول دیالیز قرار داده شد. حجم محلول دیالیز ۱۰۰ میلی‌لتر 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 ۶ 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 ۱۲۰۰ دور در دقیقه ساتریفوژ شد. مایع رویی همان عصاره دهیز 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 $۲۱\pm ۲^{\circ}\text{C}$ و چرخه نوری کنترل شده نگهداری می‌شدند و به آب و غذا دسترسی کامل داشتند. به مدت ۴ روز کتوکونازول با دوز 100mg/kg/day از طریق صفاق به حیوان تزریق شد. به علت اینکه کتوکونازول در سرم فیزیولوژی حل نمی‌شود در برای تزریق $0/5\text{CC}$ میلی‌لتر کربوکسی سلولز حل شد. موش‌هایی که کتوکونازول دریافت نمودند به دو گروه تقسیم شدند. به گروه شاهد 1CC سرم فیزیولوژی و به گروه مورد 1CC عصاره دهیز قلب انسان تزریق شد. پس از بیهوشی با سدیم فنل باریتال با دوز 60mg/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 و لی در موش ایزولوسین است و بقیه ساختمان شبیه یکدیگر است. این تفاوت اندک در فعالیت بیولوژیکی تأثیر چندانی ندارد (۹ و ۱۰).

کتونازول 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 (۶ و ۷). ANP باعث شل شدن عضله صاف جدار رگ و افزایش کمپلیانس 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. cGMP پروتئین کیناز را فعال می‌کند، که این آنزیم به نوبه خود باعث افزایش فعالیت پمپ کلسیم در قشرهای سلولی 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 تنگ‌کننده آنزیوتانسین II (AgII) جلوگیری می‌کند. AgII با فعال کردن فسفولیپاز C و افزایش کلسیم

جدول شماره ۲ همین تغییرات را برای موش‌های دریافت کننده 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 دریافت کننده متیل کربوکسی سلولز در قبل و بعد از تزریق عصاره ANP (گروه مورد) یا سرم فیزیولوژی (گروه شاهد)

زمان	شاهد (N=5)	متیل از تزریق (N=5)	بعد از تزریق (N=5)
قبل از تزریق	۱۷.۷۳ \pm ۱.۸۸	۱۵.۰۷ \pm ۱.۸۸	۱۱۲ \pm ۰
۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۱.۰۷ \pm ۱.۸۸	۱۴.۰۷ \pm ۱.۶۶	۱۱۴ \pm ۲
۱۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۱۲ \pm ۵.۶۲	۱۵.۰۷ \pm ۳.۷۷	۱۶۷ \pm ۴
۱۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۱۲.۷۳ \pm ۴.۹۷	۱۵.۰۷ \pm ۳.۷۷	۱۱۸ \pm ۲
۲۰ دقیقه بعد از تزریق	۹۳.۷۳ \pm ۱.۰۷	۱۲۰.۷۳ \pm ۱.۰۷	۱۱۸ \pm ۲
۲۵ دقیقه بعد از تزریق	۹۷.۷۳ \pm ۱.۰۸	۱۲۲ \pm ۱.۱۲	۱۱۶ \pm ۴
۳۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۰۹.۷۳ \pm ۱۷.۱۹	۱۱۷ \pm ۷.۰	۱۱۸ \pm ۶
۳۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۰۸ \pm ۵.۹۳	۱۱۰.۷۳ \pm ۷.۰۲	۱۱۶ \pm ۶
۴۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۱۰.۷۳ \pm ۲۸.۰۳	۱۱۴.۷۳ \pm ۱۴	۱۱۷ \pm ۶
۴۵ دقیقه بعد از تزریق	۱۱۴.۷۳ \pm ۰.۳۰	۱۱۱.۳ \pm ۱۹.۷۰	۱۱۷ \pm ۶
۵۰ دقیقه بعد از تزریق	۱۰۹.۷۳ \pm ۱۷.۲۰	۱۱۱ \pm ۲۰	۱۱۷ \pm ۶

بحث

(ANP) پیتید ناتریوریک دهلیزی (ANP) هورمونی پیتیدی با 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 می‌یابند اما افزایش فشار سیستولی بیش از افزایش فشار دیاستولی است، در نتیجه فشار نبض افزایش می‌یابد و حالتی شبیه به آرتربیواسکلروز ایجاد می‌گردد.

در آرتربیواسکلروز فشار نبض به علت کاهش کامپلیانس سیستم عروقی بالا است و هر دو فشار سیستولی و دیاستولی افزایش می‌یابند. در موسه‌ایی 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 آرتربیواسکلروز مؤثر است (۱۰ و ۱۱).

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

ANP با کاهش ترشح رنین تولد AgII را کاهش می‌دهد که این مسئله به گشاد شدن پیشتر 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 گلوکورتیکوئیدها مهار شده و ANP سرم کاهش یافته است این امر منجر به کاهش کامپلیانس عروق می‌شود و فشار سیستولی و دیاستولی هردو

REFERENCES

- Brenner BM, Ballermann BJ, Cunningham ME, Zeidel ML. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiological Review* 1990; 70: 665-87.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sedan CE, Bloch KD, Zisfein J, et al. Molecular studies of the atrial natriuretic factor gene. *Hypertension Dallas* 1985; 7(suppl 1): 131-34.
- Gardner DG, Hane S, Trachewsky D, et al. Atrial natriuretic peptide mRNA is regulated by glucocorticoids in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 139: 1047-54.
- 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.
- Oikawa S, Imai M, Ueno AT, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor of human atrial natriuretic polypeptide. *Nature* 1984; 309: 724-26.
- Kangawa K, Fukuda A, Matsuo H. Structural identification of human atrial natriuretic polypeptides. *Nature* 1985; 397: 313-97.
- Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of Human atrial natriuretic polypeptide (hANP). *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 118: 131-39.
- 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.
- 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.