

## نقش بیولوژیک نیتریک اوکساید (NO)

دکتر سیدشهاب‌الدین صدر

دکتر حمیدرضا یازوی طرودی

گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی

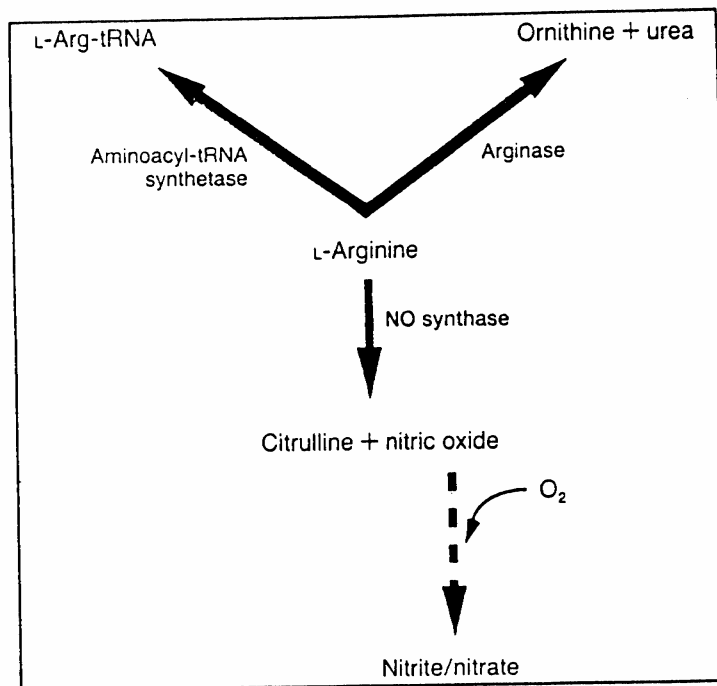
دانشگاه علوم پزشکی تهران

ثابت شده است که این ماده فرار و ساده شیمیایی اهمیت فیزیولوژیک حیاتی دارد. نیتریک اکساید ممکن است اولین نمونه رده جدیدی از نوروترانسمیترها باشد. NO در شرایط اتمسفر به شکل گاز می‌باشد. این گاز نباید با  $N_2O$  یا نیتروزاکسید که گاز خنده‌آور و بیهوشی است اشتباه شود. نیتریک اکساید بشدت سمی است و این به علت داشتن ماهیت رادیکالهای آزاد در ساختمانش می‌باشد. مدت‌هاست شناخته شده که بعضی باکتریها نیتریک اکساید دارند و تصور می‌کردند که این ماده فعال می‌تواند برای پستانداران خطرناک باشد. اما حدود ۵ سال پیش این عقیده باطل شد تحقیقات مختلف نشان داد که این ماده شیمیایی ممکن است یکی از مهمترین مولکولهای پیام‌رسان باشد. این ماده گلبولهای سفید را قادر به از بین بردن سلولهای سرطانی و باکتری‌ها می‌کند و به واسطه‌های عصبی اجازه می‌دهد که عروق خونی را گشاد کنند. نیتریک اکساید بعنوان یک پیامبر برای سلولهای عصبی مثل نوروترانسمیترها در مغز و سایر نواحی بدن عمل می‌کنند. در حقیقت نیتریک اکساید جزء اولین سری نوروترانسمیترهایی است که با سایر این مواد که قبلاً کشف شده‌اند متفاوت است. دانستن مکانیسم مولکولی این ماده موثر انتشار و ارتباط آن با سایر مواد حیاتی مهم می‌تواند کلیدی در روشن کردن مسایل مربوط به تحقیقات حافظه و درمان بیماریهای مهم نورونراتیو باشد. مطالعات اولیه روی نیتریک اکساید نشان داد که این ترکیب سفید رنگ بشدت ناپایدار است. مدت عمر کوتاهی داشته حدود ۱۰-۶ ثانیه باقی می‌ماند و سپس توسط اکسیژن و آب به نیترات و نیتريت تبدیل می‌شود. علی‌رغم اینکه انسان هم

## ■ تغییرات نیتریک اوکساید می تواند باعث تغییرات غیر طبیعی فشار خون گردد.

نیترات دفع می کند ولی دانشمندان اصرار داشتند که این ترکیبات تنها از منابع غذایی ایجاد می شوند. در سال 1956 J M Barnes و p N Magee از مرکز تحقیقات پزشکی در Surrey انگلستان نشان دادند که بدن، نیترات موجود در مواد غذایی مصرف شده را به ماده سرطانزای نیتروز آمین تبدیل می کند، به این دلیل مردم باید عادات غذایی خود را تغییر دهند و اعلام کردند که گوشت نمک زده پهلوی و پست خوک و سایر مواد غذایی مصرف شده غنی از نیترات را کنار بگذارند.

در سال 1981 Steven R Tannenbaum و همکارانش در انستیتو تکنولوژی ماساچوست (MIT) دریافتند که حتی انسانها و موشهایی که مواد غذایی با نیترات کم مصرف می کنند هنوز مقادیر قابل توجهی نیترات دفع می کنند. ظاهراً غذا تنها منبع نیترات نبود بنابراین، منشاء آن از کجا بود؟ Tannenbaum



شکل (۱)

مشاهده کرد که افراد مبتلا به اسهال عفونی به مقدار زیادی نیترات از راه ادرار دفع می‌کنند و همان روند التهابی که باعث ایجاد اسهال می‌شد موجب تولید نیترات نیز می‌شود. Tannenbaun دریافت که تزریق اندوتوکسین باکتریها که سبب ایجاد واکنش التهابی می‌شوند در موش صحرائی موجب دفع نیترات می‌گردد. منبع مشخص تولید نیترات و ارتباط آن با پاسخ‌های التهابی توسط Michael A. Marletta از دانشگاه میشیگان مشخص شد و او دریافت موشی که بصورت ژنتیکی کمبود ماکروفاژ داشته باشد نیترات کمی دفع و ترشح می‌کند. او همچنین ارتباطی بین وجود ماکروفاژ و وجود نیترات را اثبات کرد.

marletta بعدها در تحقیقات خود کشت‌هایی از ماکروفاژهای نامشخص را جدا کرد سپس در کشت اندوتوکسین گاما انترفرون (یک پروتئین تنظیم‌کننده ایمنی که سایر سلول‌های سیستم ایمنی را فعال می‌کند و توسط لنفوسیت‌های T ساخته می‌شود) اضافه کرد. بعد از اتصال، ماکروفاژها قادر به تولید نیترات بودند. Marletta با تست‌های انتخاب شده در محیط کشت‌های مختلف ماکروفاژهایی را کشف کرد که بدون وجود آرژنین در محیط کشت قادر به تولید نیترات نبودند. این کشف او را قادر ساخت که ثابت کند یک آنزیم اختصاصی در ماکروفاژ آرژنین را به یک واسطه شیمیایی تبدیل می‌کند. ماده شیمیایی تولید شده همان نیتریک اکساید (NO) است که به سرعت به نیتريت و نیترات تبدیل می‌شود. (شکل ۱)

در این زمان Hibbs از دانشگاه utah در مطالعات جداگانه‌ای نشان داد که ماکروفاژها توانایی از بین بردن سلولهای سرطانی و باکتریها را دارند. او ماکروفاژها را با سلولهای سرطانی کشت داد و دریافت که توانایی از

بین بردن سلولهای سرطانی توسط ماکروفاژها وقتی آرژنین از محیط کشت خارج شود از بین می‌رود. Hibbs همچنین نشان داد که آرژنین نه تنها به نیترات بلکه به آمینواسیدسیتروالین (Citrulline) نیز تبدیل می‌شود. لذا او نتیجه‌گیری کرد که یک آنزیم اختصاصی از آرژنین نیتریک اکساید (NO) تولید می‌کند. (شکل ۲)

Hibbs تحقیقات خود را ادامه داد تا نشان دهد که گاز نیتریک اکساید به شدت برای سلولهای سرطانی کشنده است و از طرفی می‌تواند ماکروفاژها را نیز فعال کند. او همچنین اولین مهارکننده آنزیم سازنده نیتریک اکساید را پیدا کرد. او این عمل را با مشتقی از آرژنین (بخصوص مشتق متیل) که هم تولید نیترات و هم قدرت ضدسرطانی (NOS) ماکروفاژ را مهار می‌کرد نشان داد. وقتی ماکروفاژها توسط اندوتوکسین و یا سلولهای T فعال شوند پاسخ خود را از طریق تبدیل آرژنین به نیتریک اکساید ظاهر می‌کنند. رادیکال آزاد و سمی (NO) به ماکروفاژ توانایی از بین بردن باکتریها قارچها و سلولهای سرطانی را می‌دهند. در یک سری تحقیقات محققین دریافتند که نیتریک اکساید یک مولکول پیام‌رسان است. دو دلیل برای این نقش نیتریک اکساید وجود دارد. اولین دلیل مکانیسمی است که توسط آن نوروترانسمیترها عروق خونی را گشاد می‌کنند و دومین دلیل داروهای است که علائم angina (دردهای جلوی قلبی) را از بین می‌برد. هر دو خط تحقیق منجر به نتایجی شده که راجع به عمل نیتریک اکساید بیشتر بدانیم.

عروق خونی توسط تعدادی از نوروترانسمیترها مانند استیل کولین گشاد می‌شود که این گشادی ناشی از شل شدن لایه عضلانی عروقی می‌باشد و سپس عمل

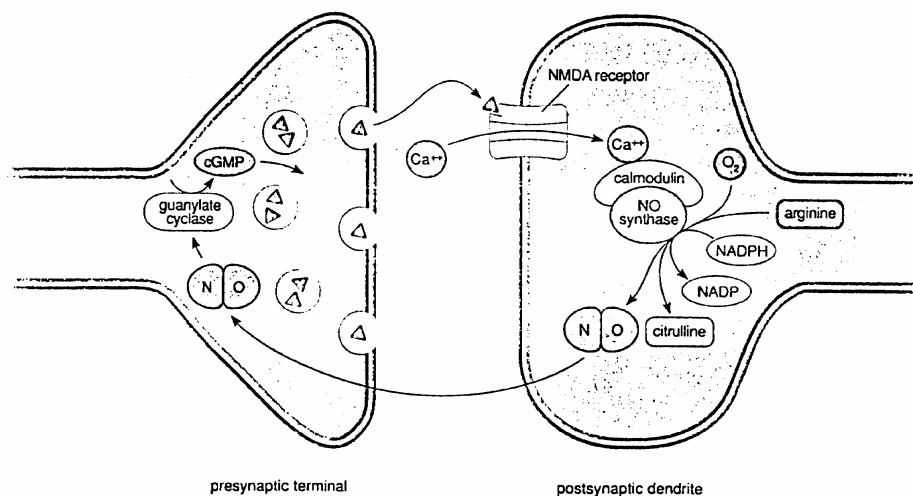
## □ اثر ضدپرولیفراتیو نیتریک اوکساید می‌تواند از هیپرتروفی عضله صاف که در طی روند آترواسکلروز پیش می‌آید جلوگیری کند.

که خود پیام‌رسان دوم برای بعضی از نوروترانسمیترها و هورمون‌ها به‌شمار می‌آید. از طرفی آقای murad از دانشگاه Stanford دریافت که نیتروگلیسرین و نیترات‌های آلی بخودی خود غیرفعالند ولی توسط تغییرات متابولیکی به NO تبدیل و باعث گشادی عروق خونی می‌شوند. بهرحال نیتریک اکساید باعث انبساط عضلات از طریق تحریک ساخته شدن cGMP می‌شود و دقیقاً همان‌کار EDRF را انجام می‌دهند. بنظر می‌رسد دو موضوع تحقیقی EDRF و نیتروگلیسرین هدف مشخص را دنبال می‌کردند. سرانجام در سال 1987 مدرکی که اثبات می‌کرد EDRF عیناً همان نیتریک اکساید است تهیه شد. آزمایشگاه تحقیقاتی در Beckenham انگلیس آزاد شدن EDRF را از سلولهای اندوتلیال تحریک کرده و اثرات گشادکنندگی آنرا روی عضلات صاف بررسی کردند. و همزمان با این کار آنها میزان نیتریک اکساید آزاد شده از سلولهای اندوتلیوم را به طریق شیمیایی اندازه‌گیری کردند. سلولهای اندوتلیال به اندازه‌ای نیتریک اکساید آزاد کردند که برای اتساع سلولهای عضلانی مجاورشان کافی به حساب می‌آمد. بنابراین نتیجه‌گیری کردند نیتریک اکساید همان EDRF است. نیتریک اکساید علاوه بر اتساع عروق خونی از طریق ممانعت از تجمع پلاکتها باعث جلوگیری از

عکس این روند توسط تعداد دیگری از نوروترانسمیترها مانند نوراپی‌نفرین صورت می‌پذیرد که عضلات را منقبض و عروق را تنگ می‌کند و چون گیرنده‌های نوراپی‌نفرین مستقیماً روی سلولهای عضلانی وجود دارد دانشمندان فرض می‌کردند که این سلولهای گیرنده استیل‌کولین نیز دارند.

در سال 1980 این نتیجه‌گیری باطل شمرده شد. در آن سال Robert Furchgott از مرکز پزشکی Downstate دریافت که گشادی عروق خونی که بدنبال اثر استیل‌کولین ایجاد می‌شود در هنگامی که لایه اندوتلیوم از عروق جدا می‌باشد اتفاق نمی‌افتد. اندوتلیوم یک لایه نازک سلولی است که در سطح داخلی عروق خونی و درست نزد یک لایه عضلانی قرار دارد شکل (۳).

در یک سری مطالعات Furchgott نشان داد که استیل‌کولین روی رسپتورهای سلولهای اندوتلیال اثر می‌کند. این اثر سبب آزاد شدن مولکولهای کوچکی می‌شود که در لایه عضلانی نزدیک خود منتشر می‌شوند و آنرا شل می‌کنند. ماهیت این مولکولهای ناشناخته و یا به عبارت دیگر فاکتور شل‌کننده ناشی شده از اندوتلیوم (EDRF) روشن نبود. علی‌رغم عدم توانایی آنها در شناسایی ماهیت EDRF، پژوهشگران یک کشف عمده انجام دادند و ثابت کردند که EDRF تشکیل cgmp را تحریک می‌کند



شکل (۲): بیوسنتز NO و مکانیسم عمل آن

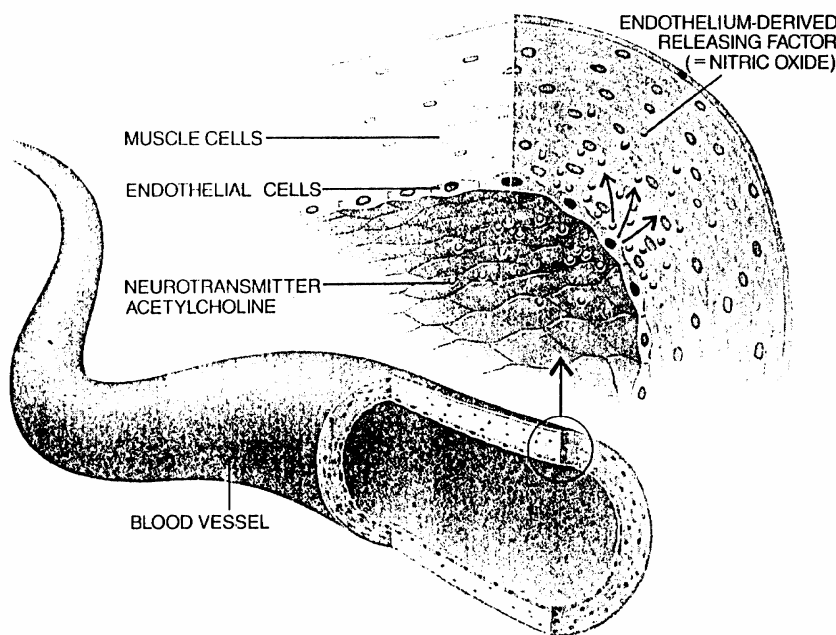
اپی نفرین و آنژیوتانسین خیلی بیشتر بود. تغییرات نیتریک اکساید می تواند باعث تغییرات غیرطبیعی فشار خون گردد. سرعت کشف نیتریک اکساید بسیار سرسام آور و گیج کننده بوده است اطلاعاتی که در مورد اهمیت این ماده در سیستم عروق و سیستم ایمنی وجود دارد نسبتاً جدید است ولی هنوز هم اطلاعات تازه تری در مورد عملکرد نیتریک اکساید در مغز وجود دارد. اولین اشاره به اینکه نیتریک اکساید در سیستم عصبی درگیر است در سال 1982 آورده شد آقای Take Deguchi از انستیتو Tokyo Metropolitan که مربوط به علوم اعصاب است متوجه شد که ساخته شدن cGMP نیازمند آرژنین است. البته در آن زمان کسی نمی دانست که نیتریک اکساید یک ملکول پیام رسان است و یا این که نیتریک اکساید از آرژنین

لخته شدن خون نیز می شود. همچنین نقش نیتریک اکساید بعنوان عامل تنظیم کننده Penile erection اثبات گردیده است. امروزه نقش نیتریک اکساید در کنترل و تنظیم سیستم عروقی بطور خیلی وسیعی نشان داده شده است، اگر چه بنظر می رسد مواد دیگری مانند آنژیوتانسین و نوراپی نفرین عامل اصلی تنظیم فشار خون باشند اما در حال حاضر نیتریک اکساید بعنوان تنظیم کننده اصلی فشار خون مطرح می باشد. خیلی از محققین از مهارکننده های آنزیم nitric oxide synthase که مانع ساخته شده نیتریک اکساید می شود در حیوانات و انسانها بطور خوراکی استفاده کردند و مشاهده کردند که باعث افزایش سریع فشار خون گردید بحدی که از افزایش سریع فشار خون گردید بحدی که از افزایش فشار خون توسط تاثیر داروهای

□ مرگ نرونها در اکثر سگته‌های مغزی ممکن است ناشی از عمل گلوتامات روی سلولهای باشد که قبلاً از اکسیژن محروم مانده‌اند.

Liverpool مشاهده کرد که هنگامی که بافت مغز را توسط ماده‌ای بنام آمینواسید گلوتامات تحریک می‌کند موادی با نیمه عمر کوتاه ساخته می‌شوند که خواص نیتریک اکساید را دارند. گلوتامات که یک نوروترانسمیتر تحریکی است بعنوان یک واسطه عصبی در بسیاری از جاهای مغز بحساب می‌آید و همچنین نقش‌های نوروترانسمیتری دیگری هم دارد. اثرات آن توسط چندین ساب تایپ از رسپتورها اعمال می‌شود. یکی از مشخصترین این رسپتورها

است. البته در آن زمان کسی نمی‌دانست که نیتریک اکساید یک ملکول پیام‌رسان و یا این که نیتریک اکساید از آرژنین ساخته می‌شود در سال 1980 مونکادا دلایلی را بیان کرد مبنی بر اینکه نقش آرژنین در ساخته شدن cGMP در مغز باید با ساخته شدن نیتریک اکساید ارتباط داشته باشد. در حقیقت او فعالیت نیتریک اکسایدسازی را در ساختن بافتهای مغزی کشف کرد. بطور همزمان فرد دیگری همین نتایج را بدست آورد John Gartwaite از دانشگاه



شکل (۳)

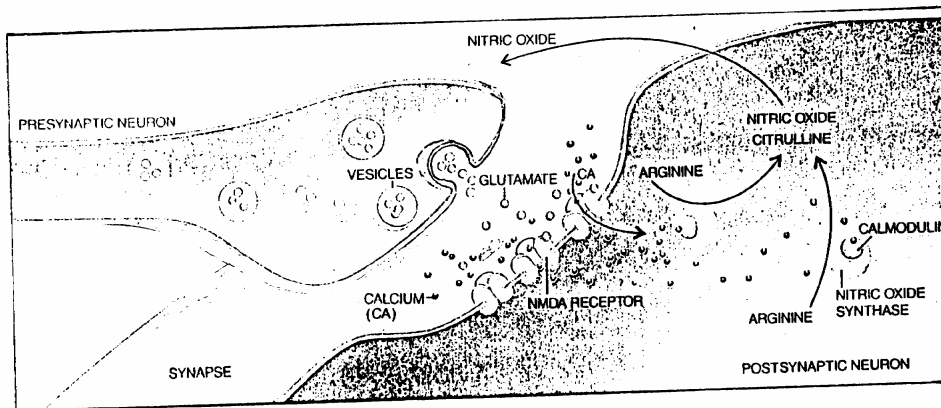
## ■ نیتریک اوکساید علاوه بر اتساع عروق خونی از طریق ممانعت از تجمع پلاکتها باعث جلوگیری از لخته شدن خون نیز می‌شود.

خونی اثر می‌گذارد آنها نیز بدنبال قسمتی از مغز بودند که در آن گلوتامات برای تاثیر cGMP نشان داده شود خوشبختانه در 1970 Games Ferresdelt از دانشگاه واشنگتن گلوتامات را به برشهایی از مخچه اضافه کرده و یک افزایش سریع در cGMP را مشاهده کرده بود.

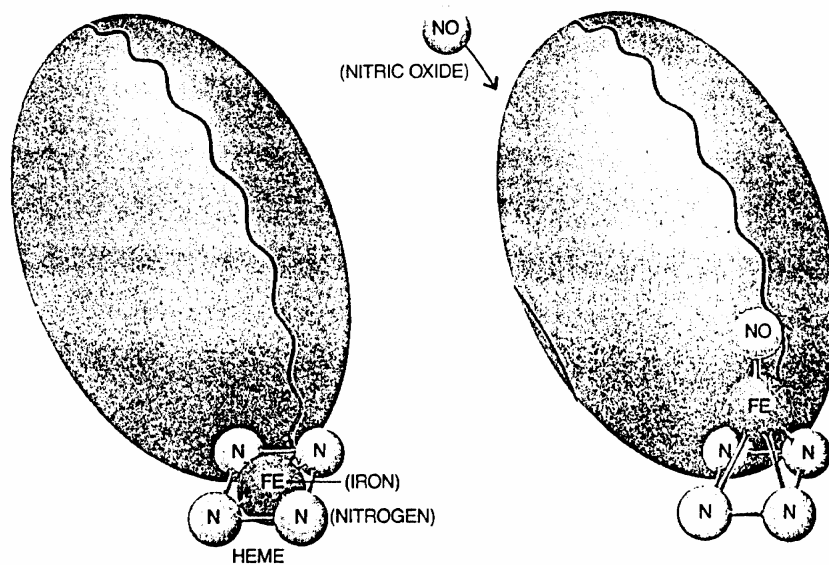
با استفاده از مخچه مشابه تکنیکی برای اندازه گیری فعالیت آنزیمی NOS گسترش داده شد. بدلیل آنکه آرژنین، NO و سیترولین را به یک اندازه تولید می‌کند تبدیل آرژنین رادیواکتیو به سیترولین بررسی شد. بنابراین اندازه گیری میزان سیترولین دلالت بر همین مقدار نیتریک اکساید تولید شده می‌کند. بوسیله این متد کشف شد که فعالیت آنزیم NOS وقتی که NMDA یا گلوتامات به برشهای مغز اضافه شد سه برابر می‌شود و این افزایش بقدری سریع بود که باعث تعجب دانشمندان شده بود چون در عرض چندثانیه اتفاق می‌افتد و از طرفی افزایش فعالیت آنزیم اکثر اوقات نیازمند زمان طولانی است. در همان برش مغز تایید شد که NMDA باعث افزایش شدید سطح cGMP می‌شود بدین ترتیب طرح قضیه‌ای بوجود آمد که تحقیق شود که آیا ارتباطی بین ساخته شدن NO و cGMP وجود دارد یا نه؟ و از طرفی دیگر Moncada کشف کرد بود که برای سنتز NO وجود کلسیم لازم است. کلسیم اغلب با اتصال به یک کوفاکتور که معمولاً در همه جا یافت می‌شود بنام

NMDA RC می‌باشد. NMDA مخفف N-Methyl-D-aspartate است که یک مشتق صناعی بوده و در زیرگروهی از رسپتورهای گلوتامات بطور انتخاب عمل می‌کند این رسپتورها کانالهای کلسیمی را باز می‌کنند و در نتیجه یک ایمپالس تحریکی قوی می‌فرستند و وقتی که گلوتامات به میزان زیادی آزاد شد می‌تواند در اثر باز کردن این کانالها باعث ایجاد تحریک شود. بعنوان مثال مرگ نرونها در اکثر سکته‌ها مغزی ممکن است ناشی از عمل گلوتامات روی سلولهایی باشد که قبلاً از اکسیژن محروم مانده‌اند.

مشاهده گردیده که در حیواناتی که روی آنها سکته مغزی ایجاد شده بود داروهای مهارکننده رسپتورهای NMDA از صدمه نوروئی قسمتهای زیادی از مغز جلوگیری می‌کنند. بر مبنای این تحقیق آنتاگونیستهای NMDA توسط شرکتهای دارویی زیادی بعنوان درمان بالقوه سکته مغزی و یا درمان پیشگیرانه آن گسترش پیدا کرد. مشاهدات و تحقیقات Garthwaite مبنی بر این که تحریک رسپتورهای NMDA منجر به آزاد شدن نیتریک اکساید می‌شود بر نقش این عامل به عنوان مدیاتور گلوتامات دلالت می‌کند. بنابراین در اوایل 1989 تصمیم گرفته شد که نقش عمومی نیتریک اکساید در دو عمل سیناپتیک بررسی و تحقیق شود. به این دلیل که NO بعنوان ماده‌ای شناخته شده بود که بواسطه cGMP روی عروق



شکل (۴)



Hemoglobin

شکل (۵)



کالمودولین (Calmodulin) عمل می‌نماید هنگامی که مقدار کمی کالمودولین به فراورده‌های آنزیمی افزوده می‌شود بلافاصله فعالیت آنزیمی مشاهده می‌گردد. و بدین ترتیب ثابت گردید کالمودولین کوفاکتوری ضروری برای فعالیت NOS (نیتریک اکساید سنتتاز) می‌باشد.

با تشخیص ارتباط بین NO و کلسیم و کالمودولین مشخص شد که چرا گیرنده‌های NMDA تحت تاثیر گلوتامات سنتز NO را تسریع نمودند. همانطور مشخص شد که گلوتامات در گیرنده‌های NMDA بوسیله باز نمودن کانالهای یونی حرکت کلسیم را از خارج به داخل نورونها سرعت می‌بخشد و باعث انتقال سیناپسی می‌شود. بنابراین گلوتامات باعث ورود کلسیم به سلولها شده و سپس یونهای کلسیم به کالمودولین اتصال یافته و آنزیم NOS را فعال می‌نمایند. تمام این پروسه در چند هزارم ثانیه صورت می‌گیرد. شکل (۴)

### نقش NO در بیماریها:

شواهد امر حاکی از این است که غیرفعال شدن NO توسط هموگلوبین این فرضیه را تقویت می‌کند که شاید انقباض عروقی در Subarachnoid hemorrhage ناشی از وقفه آزاد شدن NO توسط هموگلوبین باشد (شکل ۵). و همچنین فقدان NO در پاتوژنز تعدادی از بیماریها از جمله هیپرتانسیون آترواسکلروز و دیابت دخالت دارد.

کاهش تشکیل NO یک فاکتور دخیل در آترواسکلروز است اگر چه ضخیم شدن دیواره عروق نیز می‌تواند یک سد محدود کننده در برابر نفوذ NO به عضلات صاف باشد. اثر ضد پرولیفراتیو NO

می‌تواند از هیپرتروفی عضله صاف که در طی روند آترواسکلروز پیش می‌آید جلوگیری کند.

تعدادی از تحقیقات نشان می‌دهد که آزاد شدن NO در دیابت تجربی متوقف می‌شود. همچنین کاهش تولید NO ممکن است مسئول impotence در برخی از مردان مبتلا به دیابت باشد. از آنجائیکه impotence می‌تواند با تزریق نیترووازدیلاتورها داخل Governosal برطرف شود تصور می‌شود که NO از آندوتلیوم Governosal و اعصاب مهاری که برای Penile erection ضروری هستند آزاد می‌شود. این مسئله می‌تواند اساس علمی شهرت آمیل‌نیتریت بعنوان یک aphrodisiac باشد.

### مأخذ:

- 1- Snyder, S.; Bredt, D., *Biological roles of nitric oxide. Scientific American. 68-77, May 1992.*
- 2- Mezey, E.; Palkovits, M. *Localization of targets for antiulcer Drugs in cells of immune system. Science: 2584, 1662-1664, 1992.*
- 3- Bredt, D.S.; Hwang, P.M.; et.al. *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. Nature. 351: 714-718, 1991*
- 4- Inigo Saenz De Tejada. *Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum. N.Engl.J.Med: 326, 1638, 1992*
- 5- Kolb, H.; Kolb-Bachofen, V. *Nitric oxide; A pathogenetic factor in autoimmunity. Immunology Today. 13;157-159, 1992*
- 6- Moncada, S.; Palmer, R.M.J.; Hibbs, A. *Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. Biochem. Pharmacol. 38:1709-1715, 1989*
- 7- Vallance, P.; Collier, J.; Moncada, S. *Effects of endothelium - derived nitric oxide on peripheral arteriolar ton in man. Lancet. 2: 997-1000, 1989*