

ارزیابی فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتتاز در سلول‌های آندوتلیال آئورت موش‌های صحرائی سالم و دیابتی به روش هیستوشیمیایی NADPH دیافورزیز

چکیده

اختلالات عروقی یکی از عوارض شایع بیماری دیابت است. مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که اتساع وابسته به آندوتلیوم عروق در این بیماری دچار اختلال می‌شود. اگر چه عقاید مختلفی در مورد علل وقوع این اختلال عمل‌کرد وجود دارد اما علت (یا علل) ایجاد این عارضه هنوز مشخص نیست. در این مطالعه علاوه بر ارزیابی اتساع وابسته به آندوتلیوم در حیوان دیابتی از راه فارماکولوژیک (با به دست آوردن منحنی غلظت - پاسخ استیل کولین روی آئورت مجزای سینه‌ای موش صحرائی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین) و مقایسه آن با حیوان سالم، فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتتاز (NOS) در سلول‌های آندوتلیال آئورت سینه‌ای موش‌های دیابتی و سالم با استفاده از روش رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی NADPH دیافورزیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش‌ها از یک سو نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در اتساع وابسته به آندوتلیوم در پاسخ به استیل‌کولین (نه اتساع غیر وابسته به آندوتلیوم در پاسخ به یک متسع‌کننده عروقی نیترو) بود و از سوی دیگر در مطالعه هیستوشیمیایی، شدت رنگ در رنگ‌آمیزی NADPH دیافورزیز در سلول‌های آندوتلیال آئورت موش‌های دیابتی به طور قابل توجهی کمتر از سلول‌های آندوتلیال آئورت موش‌های سالم بود. با توجه به این که رنگ‌آمیزی NADPH دیافورزیز به عنوان شاخصی از فعالیت NOS مورد استفاده قرار می‌گیرد، می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت NOS در موش‌های صحرائی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین کاهش می‌یابد و بخشی از اختلال عمل‌کرد در اتساع وابسته به آندوتلیوم، ناشی از این امر می‌باشد. علاوه بر کاهش فعالیت آنزیم NOS در مقاطع به دست آمده از آئورت موش‌های دیابتی، غشای سلول‌های آندوتلیال به طور شایعی دچار پارگی شده بود که این عدم سلامت آندوتلیوم در دیابت، خود می‌تواند یکی از علل اختلال در اتساع وابسته به آندوتلیوم باشد.

*دکتر معصومه شفیعی I

دکتر ملیحه نوبخت II

مریم فتاحی III

دکتر لیلا کهنه‌شهری IV

دکتر مسعود محمودیان V

کلیدواژه‌ها: ۱- دیابت ۲- نیتریک اکسید سنتتاز ۳- آئورت موش صحرائی
۴- آندوتلیوم ۵- روش هیستوشیمیایی NADPH دیافورزیز

مقدمه

اتساع وابسته به آندوتلیوم عروق، یافته شایعی در مدل‌های تجربی دیابت در حیوانات آزمایشگاهی و نیز در

این مطالعه تحت حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران انجام شده است (شماره ثبت: ۳۲۵) و در شانزدهمین کنگره فیزیولوژی و فارماکولوژی در دانشگاه تربیت مدرس تهران در سال ۱۳۸۲ ارائه شده است.

(I) استادیار گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران.

(II) استادیار گروه آناتومی و بافت‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران.

(III) کارشناس ارشد آناتومی و بافت‌شناسی.

(IV) دکترای داروسازی

(V) استاد فارماکولوژی و رئیس مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران.

نیتریک اکسید سنتتاز در داخل سلول‌های آندوتلیال همان حلقه‌های عروقی با یک ابراز هیستوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت.

روش رنگ‌آمیزی NADPH دیافورزیز در مطالعات گوناگون به عنوان شاخصی برای نشان دادن فعالیت آنزیم NOS مورد استفاده قرار گرفته است (۱۴ و ۱۵).

روش بررسی

در این مطالعه که به روش تجربی (Experimental) صورت گرفت، موش‌های سفید صحرایی نر از نژاد Sprague-Dawley (سن ۳ ماه) به ۲ گروه شاهد و آزمایش تقسیم شدند.

گروه آزمایش با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین به میزان ۶۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم دیابتی شدند و ۱ هفته پس از تزریق، بالا رفتن قند خون ارزیابی گردید. دو گروه دیابتی و شاهد برای ۸ هفته در حیوان‌خانه نگه‌داری شدند و پس از گذشت این مدت، آزمایش‌ها صورت گرفت.

در روز آزمایش موش‌های صحرایی با کلروفرم بیهوش شدند و پس از قطع سرخرگ کاروتید، قفسه سینه آن‌ها باز و آئورت سینه‌ای بیرون آورده شد سپس در محلول کربس در دمای آزمایشگاه که با اکسیژن ۹۵٪ و گاز کربنیک ۵٪ حباب‌گیری می‌شد، قرار گرفت سپس قطعات آئورت به دقت تمیز شدند و به حلقه‌های ۳ میلی‌متری تقسیم گردیدند. تعدادی از این قطعات برای آزمایش آئورت مجزا و تعدادی دیگر برای رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی کنار گذاشته شدند.

۱- آزمایش‌های مربوط به حلقه‌های عروقی مجزا: برای انجام آزمایش‌های فارماکولوژیک روی حلقه‌های آئورت، حلقه‌ها در بین قلاب شیشه‌ای و ترانس دیوسر به کمک ۲ قلاب فلزی موازی در داخل حمام بافت بسته شدند.

حمام بافت حاوی محلول کربس ۳۷ درجه بود که با اکسیژن ۹۵٪ و گاز کربنیک ۵٪ حباب‌دهی می‌شد. به حلقه‌های آئورت یک کشش استراحت معادل ۱ گرم وارد می‌شد و تغییرات کشش ایزومتریک بافت از طریق ترانس

مبتلایان به دیابت تیپ یک و دو است (۱-۵). از آن‌جا که آنژیوپاتی در اعضای مختلف عوارض گوناگونی را به بیمار مبتلا به دیابت تحمیل می‌کند، اطلاع از سازوکارهای دخیل در بروز این عارضه می‌تواند امکان بیشتری را برای پیش‌گیری و درمان آن عوارض فراهم نماید.

مطالعات انجام شده روی مدل‌های تجربی دیابت در حیوانات آزمایشگاهی عوامل مختلفی را به عنوان زمینه‌ساز اختلال در اتساع وابسته به آندوتلیوم پیشنهاد کرده‌اند که عبارتند از:

الف) افزایش تخریب سلول‌های آندوتلیال توسط رادیکال‌های آزاد (۶-۸) ب) آزاد شدن یک عامل منقبض کننده از آندوتلیوم (۹ و ۱۰) ج) کاهش آزاد شدن یا تولید عامل متسع کننده از آندوتلیوم (EDRF) (۴).

مکانیسم واحدی برای اختلال عمل‌کرد آندوتلیوم در دیابت هنوز مشخص نشده است که این امر شاید به دلیل وجود تفاوت‌های منطقه‌ای یا گونه‌ای باشد. علاوه بر آن، ممکن است تفاوت‌های موجود بین نظریه‌های محققان مختلف ناشی از مراحل پیش‌رونده دیابت باشد. به این معنا که عوامل ایجاد کننده اختلال ذکر شده در یک مرحله خاص، ممکن است در مرحله بعد تاثیر چندانی نداشته باشند (۴). هم چنین نشان داده شده است که عامل متسع کننده‌ای که از آندوتلیوم (EDRF) سیاهرگ‌ها و سرخرگ‌ها آزاد می‌شود دارای همان خواص شیمیایی و بیولوژیک نیتریک اکساید (NO) می‌باشد بنابراین نیتریک اکساید در ایجاد اتساع عروقی، دارای نقش کلیدی است (۱۱ و ۱۲).

نیتریک اکسید در بافت‌های مختلف (بافت عصبی، عروقی و...) توسط آنزیمی از خانواده نیتریک اکسید سنتتاز تولید می‌گردد (۱۳).

در این مطالعه اتساع وابسته به آندوتلیوم حلقه‌های آئورت مجزای موش‌های صحرایی سالم و موش‌هایی که توسط استرپتوزوتوسین دیابتی شده بودند، با استفاده از استیل‌کولین ارزیابی شد و در کنار آن شدت فعالیت آنزیم

دیوسر ایزومتریک به یک فیزیوگراف Beckman منتقل و ثبت می‌گردید.

در بعضی از حلقه‌ها، آندوتلیوم به طور مکانیکی تخریب شد که این کار با استفاده از میله فلزی و عبور آهسته آن به مدت حدود ۵۰-۳۰ ثانیه در داخل لومن رگ صورت گرفت و عدم وجود آندوتلیوم با استفاده از استیل کولین (۱ میکرومولار) ارزیابی شد.

- پروتوکل آزمایش‌ها روی آنورت مجزا: ابتدا یک پیش انقباض با فنیل افرین روی بافت ایجاد می‌شد (غلظتی از فنیل افرین که برای این کار انتخاب شد 10^{-6} مولار بود که پاسخی کم‌تر از میزان پاسخ حداکثر را در بافت ایجاد می‌کرد) سپس با استفاده از غلظت‌های تجمعی استیل‌کولین، چگونگی اتساع وابسته به آندوتلیوم و با استفاده از یک متسع کننده عروقی نیترو (ایزوسورباید دی نترات)، نحوه اتساع غیر وابسته به آندوتلیوم مورد ارزیابی قرار گرفت.

اثر استیل‌کولین در قطعات آنورت حاوی آندوتلیوم و ایزوسورباید دی نترات در حلقه‌های دارای آندوتلیوم و نیز در حلقه‌های بدون آندوتلیوم آنورت مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار ارائه شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش آماری (Student's t test) صورت گرفت.

زمانی که p value کوچک‌تر از ۵٪ بود تفاوت‌ها معنی‌دار در نظر گرفته می‌شد. رسم نمودارها توسط نرم‌افزار رایانه‌ای Sigma Plot انجام گردید.

۲- آزمایش‌های مربوط به رنگ‌آمیزی NADPH

دیافورزین: این روش با تکیه به روش پیشنهادی Downing در سال ۱۹۹۴ (۱۰) انجام شد. حلقه‌های آنورت دارای آندوتلیوم سالم در ۳ گروه قرار گرفتند که شامل دیابتی، غیر دیابتی و شاهد بود.

این حلقه‌ها ابتدا در محلول ۰/۱ مولار بافر فسفات (pH = 7/4) سپس برای ثابت شدن در محلول تازه حاوی پارافرمالدهید (۴٪) و ۰/۱ PBS مولار در

Triton X-۱۰۰، در طول شب و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

در مرحله بعد در محلول حاوی سوکروز در PBS ۰/۱ مولار قرار گرفتند و با استفاده از دستگاه Cryostat (Lica, CM۲۰۰۰) برش‌های انجمادی به ضخامت ۱۰ میکرومتر تهیه گردید و این مقاطع روی اسلایدهای شیشه‌ای پوشیده شده با ژلاتین قرار داده شد.

پس از آن اسلایدها برای روش هیستوشیمی NADPH دیافورزین و به منظور نشان دادن فعالیت نیتریک اکسید سنتتاز رنگ‌آمیزی شدند.

مقاطع به مدت ۱۰ دقیقه در PBS قرار گرفتند سپس جهت انکوباسیون در محلول حاوی اسیدمالیک، منگنز کلراید، نیتروبلوتترازولیموم، β NADP و تریتون X-۱۰۰ در بافر تریس هیدروکلراید در شرایط تاریکی و دمای ۳۷ °C قرار داده شدند.

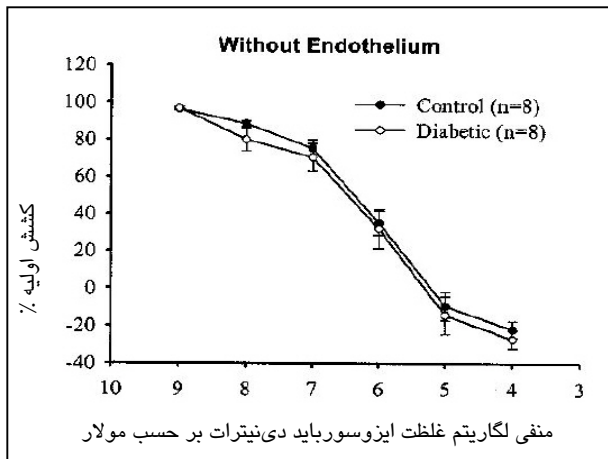
بعد از ۹۰ دقیقه، واکنش توسط شست و شوی متعدد در PBS و تریتون X-۱۰۰ متوقف شد و مقاطع به سرعت با Entellan پوشیده شده و با میکروسکوپ نوری مشاهده گردیدند.

در برش‌های گروه شاهد، β NADP از محلول انکوباسیون حذف شد.

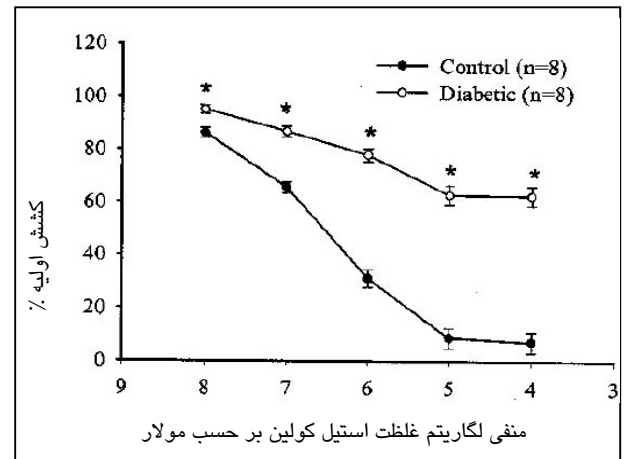
نتایج

در بررسی اتساع وابسته به آندوتلیوم در آنورت مجزای موش صحرایی سالم و دیابتی مشاهده شد که استیل کولین در حلقه‌های آنورت موش‌های صحرایی سالم و دیابتی اتساع وابسته به غلظت به وجود می‌آورد (نمودار شماره ۱).

بین درصد پاسخ متسع کننده ناشی از غلظت‌های مشخصی از استیل‌کولین تفاوت معنی‌داری در ۲ گروه موش‌های سالم و دیابتی مشاهده گردید ($p < 0/01$).



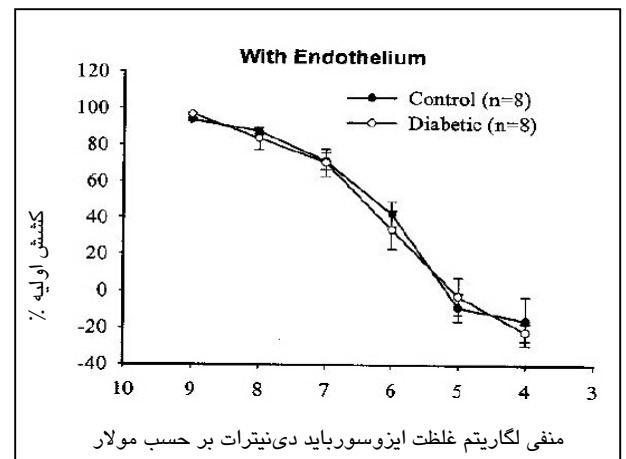
نمودار شماره ۳- منحنی غلظت - پاسخ برای ایزوسورباید دی نیترات در حلقه‌های فاقد آندوتلیوم آئورت شاهد و دیابتی که با فنیل افرین (10^{-6} مولار) منقبض شده بودند. هر نقطه نشان دهنده میانگین \pm خطای معیار حاصل از ۸ آزمایش است.



نمودار شماره ۱- منحنی غلظت - پاسخ برای استیل کولین در حلقه‌های آئورت شاهد و دیابتی که با فنیل افرین (10^{-6} مولار) منقبض شده بودند. هر نقطه نشان دهنده میانگین \pm خطای معیار حاصل از ۸ آزمایش است ($P < 0.05$).

منحنی غلظت - پاسخ ایزوسورباید دی نیترات در آئورت دارای آندوتلیوم موش‌های سالم و دیابتی در نمودار شماره ۲ آورده شده است.

در نمودار شماره ۳ نیز منحنی‌های غلظت - پاسخ ایزوسورباید دی نیترات در آئورت سینه‌ای فاقد آندوتلیوم در ۲ گروه سالم و دیابتی نشان داده شده است. همان گونه که مشاهده می‌گردد تفاوت معنی‌داری در پاسخ متسع کننده ایزوسورباید دی نیترات در هر دو نمودار ذکر شده (نمودار شماره ۲ و ۳) بین موش‌های سالم و دیابتی وجود ندارد.



نمودار شماره ۲- منحنی غلظت - پاسخ برای ایزوسورباید دی نیترات در حلقه‌های دارای آندوتلیوم آئورت شاهد و دیابتی که با فنیل افرین (10^{-6} مولار) منقبض شده بودند. هر نقطه نشان دهنده میانگین \pm خطای معیار حاصل از ۸ آزمایش است.

ارزیابی فعالیت NOS با استفاده از روش رنگ آمیزی NADPH دیافوریز صورت گرفت.

در تصویر شماره ۱ رسوب آبی رنگ ناشی از شکل احیا شده NBT (نیتروبلو تترازولیوم) در سلول‌های آندوتلیال آئورت سینه‌ای موش‌های سالم دیده می‌شود.

در مقاطع به دست آمده از آئورت موش‌های سالم نواحی کناری سیتوپلاسم در سلول‌های آندوتلیال شدت رنگ بیشتری را نشان داد.

تصویر شماره ۲ مقطع شاهد از آئورت موش‌های سالم دیده می‌شود.

همان‌گونه که قبلاً اشاره شد، در مقاطع گروه شاهد، β NADP از محلول انکوباسیون حذف شده بود.

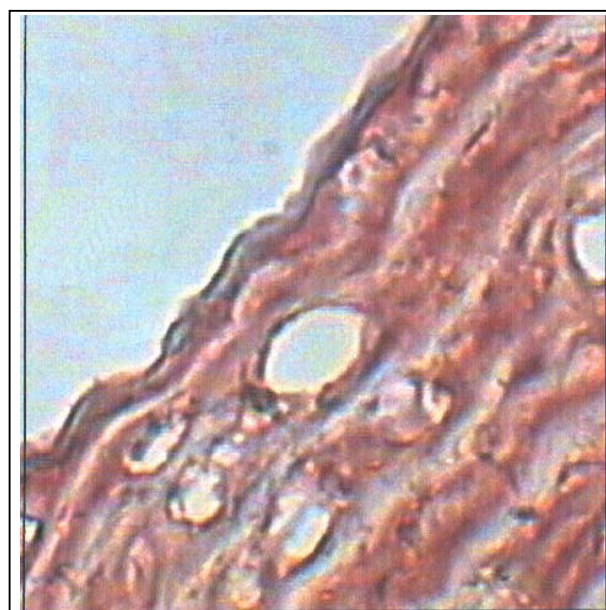
در این مقاطع رسوب آبی رنگ آن‌گونه که در مقاطع گروه قبل دیده می‌شد، وجود نداشت اما تصویر شماره ۳ مقطع به دست آمده از آئورت موش‌های دیابتی را نشان می‌دهد که به روش NADPH دیافوریز رنگ آمیزی شده بود.

در این مقطع کاهش قابل توجهی در شدت رنگ ایجاد شده در سلول‌های آندوتلیال مشاهده گردید. علاوه بر این

غشا تعداد زیادی از سلول‌های آندوتلیال همان گونه که در تصویر مشخص است، دچار تخریب شده بودند.



تصویر شماره ۳- برش آئورت موش دیابتی که با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۶۰ به دست آمده است. سلول‌های آندوتلیال در روش NADPH دیافوریز رنگ بسیار کم‌تری به خود گرفته‌اند. علاوه بر آن، غشای سلول‌های آندوتلیال به طور شایعی دچار پارگی شده بودند که بردارها به آن اشاره می‌کنند.



تصویر شماره ۱- برش آئورت موش سالم که با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۶۰ به دست آمده است. رنگ‌آمیزی به روش NADPH دیافوریز در سلول‌های آندوتلیال که به طور واضحی رنگ آبی به خود گرفته‌اند فعالیت eNOS را نشان می‌دهد.

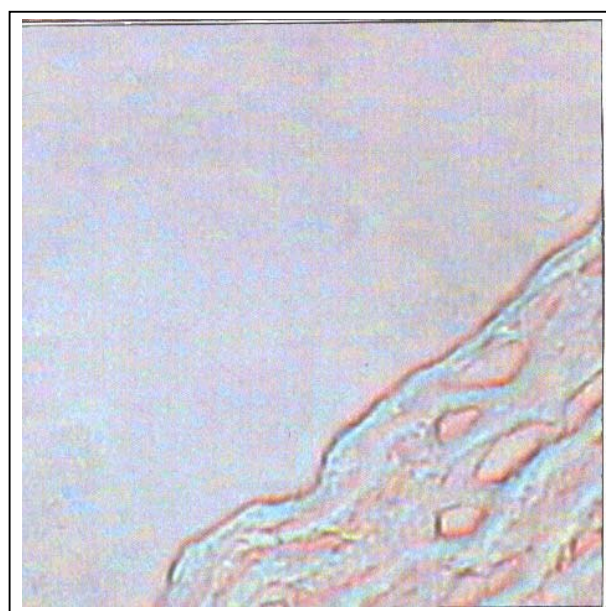
بحث

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که اختلال عمل‌کرد سلول‌های آندوتلیال موجب آسیب عروقی می‌شود اما مکانیسم‌های زمینه ساز آن هنوز مشخص نیستند.

تحقیقات قبلی به تعدادی از مکانیسم‌های درگیر در اختلال عمل آندوتلیوم ناشی از بیماری دیابت اشاره کرده‌اند که در بین آن‌ها کاهش دست‌رسی به نیتریک اکساید از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (۱۶ و ۱۷).

کاهش دست‌رسی به نیتریک اکسید به افزایش غیر فعال شدن نیتریک اکساید (۱۸) یا اختلال در تشکیل آن (۱۹ و ۲۰) نسبت داده شده است.

افزایش استرس اکسیداتیو (۲۱ و ۲۲)، جفت نشدن مناسب آنزیم NOS (۱۶)، وجود نقص در سوپسترا (عرضه برای ساخته شدن نیتریک اکسید) (۲۳ و ۲۴) از جمله نقص در مصرف آرژینین توسط NOS (۲۵)، اختلال در مسیر ورود Ca^{2+} در آندوتلیوم (۲۰)، کمبود تتراهیدروبیوپترین، یک کوفاکتور لازم برای فعالیت NOS (۱۷ و ۱۹)، کمبود



تصویر شماره ۲- برش آئورت موش سالم که با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۶۰ به دست آمده است. در مقاطع شاهد که به روش NADPH دیافوریز رنگ‌آمیزی شدند به علت حذف سوپسترا (β NADP) رسوب رنگی مشاهده نمی‌شود.

3- Pieper G.M., Gross G.J. Oxygen free radicals abolish endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta, *Am. J. Physiol.*; 1988; 255:H825-33.

4- Pieper G.M., Peltier B.A. Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in diabetic endothelium, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*; 1995; 25:397-403.

5- Pieper G.M., Jordan M., Adams M.B., Roza A.M. Syngeneic pancreatic islet transplantation reverses endothelial dysfunction in experimental diabetes, *Diabetes*; 1995; 44:1106-13.

6- Langenstroer P., Pieper G.M. Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals, *Am. J. Physiol.*; 1992; 263:H257-65.

7- Pieper G.M., Mei D.A., Langenstroer P., O'Rourke S.T. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor in diabetic rat aorta, *Am. J. Physiol.*; 1992; 263:H676-80.

8- Tesfamariam B., Cohen R.A. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose, *Am. J. Physiol.*; 1992; 263:H321-6.

9- Tesfamariam B., Jakubowski J.A., Cohen R.A. Contraction of diabetic rabbit aorta cause by PGH_2-TxA_2 , *Am. J. Physiol.*; 1989; 257:H1327-33.

10- Downing J.E.G. Multiple nitric oxide synthase systems in adult rat thymus revealed using NADPH diaphorase histochemistry, *Immunology*; 1994; 82:659-64.

11- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1987; 84:9265

12- Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release account for the biological

L- آرژینین (۲۶) و یک مکانیسم غیر مربوط به دسترسی به L- آرژینین برای NOS (۲۷) به عنوان حداقل بخشی از مکانیسم‌های احتمالی زمینه‌ساز اختلالات مشاهده شده در اتساع وابسته به آندوتلیوم در دیابت پیشنهاد شده‌اند.

اگر چه ادعا شده است که مختل شدن اتساع عروقی در قلب موش صحرایی به دنبال کاهش فعالیت و کاهش بیان NOS رخ نمی‌دهد (۱۸)، همان طور که در مطالعه حاضر نشان داده شد، کاهش در فعالیت eNOS در برش‌های به دست آمده از آنورت موش‌های صحرایی دیابتی ایجاد می‌شود. چنین کاهش‌ی در NOS نوروئی (nNOS) در کورتکس مخ (cerebrocortex) موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین نیز نشان داده شده است (۲۸).

به نظر می‌رسد فعالیت پایین‌تر eNOS در سلول‌های آندوتلیال و نیز پاره شدن غشای سلول‌های آندوتلیال، آن گونه که در این مطالعه نشان داده شد، نقش مهمی در کاهش پاسخ‌دهی به استیل‌کولین در آنورت موش‌های صحرایی دیابتی دارد.

همچنین نشان داده شد که هیچ‌گونه نقصی در مسیرهای منجر به اتساع رگ در عضله صاف آنورت وجود ندارد زیرا پاسخ نسبت به ایزوسورباید دی نیترات در موش‌های صحرایی سالم و موش‌های صحرایی دیابتی بدون تغییر باقی ماند.

منابع

1- Johnstone M.T., Creager S.J., Scales K.M., Cusco J.A., Lee B.K., Creager M.A. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus, *Circulation*; 1993; 88:2510-6.

2- McVeigh G.E., Brennan G.M., Johnston G.D., McDermott B.J., McGrath L.T., Henry W.R., et al. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, *Diabetologia*; 1992; 35: 771-6.

Zhongguo. Yao. Li. Xue. Bao.; 1999; 20(9):844-50.

21- Lee I.K., Kim H.S., Bae J.H. Endothelial dysfunction: its relationship with acute hyperglycaemia and hyperlipidemia, *Int. J. Clin. Pract. Suppl.*; 2002; (129):59-64.

22- Pieper G.M., Jordan M., Dondlinger L.A., Adams M.B., Roza A.M. Peroxidative stress in diabetic blood vessels: reversal by pancreatic islet transplantation, *Diabetes*; 1995; 44:884-9.

23- Pieper G.M., Siebeneich W., Moore-Hilton G., Roza A.M. Reversal by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in the endothelium of the genetic diabetic BB rat, *Diabetologia*; 1997; 40(8):910-5.

24- Pieper G.M., Jordan M., Adams M.B., Roza A.M. Restoration of vascular endothelial function in diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.*; 1996; 31 Suppl:S157-62.

25- Pieper G.M., Peltier B.A. Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine-nitric oxide pathway in diabetic endothelium, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*; 1995; 25(3):397-403.

26- Ozcelikay A.T., Tay A., Dincer D., Meral S., Yildizoglu-Ari N., Altan V.M. The effects of chronic L-arginine treatment on vascular responsiveness of streptozotocin-diabetic rats, *Gen. Pharmacol.*; 1999; 33(4):299-306.

27- Mayhan W.G., Didion S.P., Patel KP. L-Arginine does not restore dilatation of the basilar artery during diabetes mellitus, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*; 1996; 16(3):500-6.

28- Yu W.J., Juang S.W., Chin W.T., Chi T.C., Wu T.J., Cheng J.T. Decrease of nitric oxide synthase in the cerebrocortex of streptozotocin-induced diabetic rats, *Neurosci Lett.*; 1999; 272 (2):99-102.

activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature*; 1987; 327:524.

13- Ignarro L.J. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication, *Hypertension*; 1990; 16: 477-83.

14- Kobzic L., Bredt D.S., Lowenstein C.J., Drazen J., Gaston B., Sugarbaker D., et al. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*; 1993; 9:371-7.

15- Murphy S. Histochemical localization of nitric oxide synthase in the CNS-reply, *Trends Neurosci.*; 1994; 17:106.

16- Van Etten R.W., De Koning E.J., Verhaar M.C., Gaillard C.A., Rabelink T.J. Impaired NO-dependent vasodilation in patients with Type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus is restored by acute administration of folate, *Diabetologia*; 2002; 45(7):1004-10.

17- Pieper G.M. Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*; 1997; 29:8-15.

18- Stockklauser-Farber K., Ballhausen T., Laufer A., Rosen P. Influence of diabetes on cardiac nitric oxide synthase expression and activity, *Biochem. Biophys. Acta*; 2000; 1535(1):10-20.

19- Meininger C.J., Marinos R.S., Hatakeyama K., Martinez-Zaguilan R., Rojas J.D., Kelly K.A., et al. Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency, *Biochem. J.*; 2000; 349(Pt 1):353-6.

20- Shen J.Z., Zheng X.F. Characteristics of impaired endothelium-dependent relaxation of rat aorta after streptozotocin-induced diabetes,

Assessment of NO Synthase Activity in Endothelial Cells of Healthy and Diabetic Rat Aorta Using NADPH Diaphorase Staining

^I *M. Shafiei, Ph.D. ^{II} M. Nobakht, Ph.D. ^{III} M. Fattahi, MSc
^{IV} L. Kohneh-Shahri, Ph.D. ^V M. Mahmoudian, Ph.D.

Abstract

Impaired endothelium-dependent relaxation of blood vessels is a common feature in diabetes but the exact underlying mechanisms have not yet been clarified. In the present study, endothelium-dependent vasorelaxation of aortic rings were evaluated in vitro in streptozocin-induced diabetic and age-matched control rats. Moreover, NO synthase activity of aortic endothelial cells was assessed in both diabetic and healthy rats using histochemical staining for NADPH diaphorase activity. The results showed a significant decrease of endothelium dependent relaxation in response to ACh in diabetic rings compared with control. A remarkable attenuation of eNOS activity was also observed in sections of diabetic rat aorta using NADPH diaphorase staining. Furthermore, many endothelial cell membranes were disrupted in diabetic cessations. It can be concluded that a decrease in NOS activity together with a disruption of endothelial cell membranes play a major role in endothelial dysfunction observed in diabetes.

Key Words: 1) Diabetes mellitus 2) Nitric oxide synthase 3) Rat aorta
 4) Endothelium 5) NADPH diaphorase histochemistry

This article has been conducted under financial support of undersecretary of research of Iran University of Medical Sciences and Health Services(No.325). It has also been presented in the 16th Congress of Physiology and Pharmacology at Tarbiat Modarress University in 2003.

I) Assistant Professor of Pharmacology. Razi Institute of Drug Research. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran(*Corresponding Author).

II) Assistant Professor of Anatomy and Histology. School of Medicine. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

III) MSc in Anatomy and Histology.

IV) Pharmacist.

V) Professor of Pharmacology. Head of Razi Institute of Drug Research. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.