

# بررسی اثر نیتریک اکساید روی عضله صاف حلقوی پیلور جنین موش صحرایی

## چکیده

نیتریک اکساید (NO) مولکول کوچک تقریباً ناپایدار و رادیکال آزاد چربی دوستی است که توسط سلولهای متفاوت پستانداران ساخته می‌شود و در بدن آنها دارای اعمال متفاوتی از جمله واسطه عصبی و اثر سیتوتوکسیک می‌باشد. این مولکول در مجرای معدی روده‌ای به عنوان واسطه شیمیایی اعصاب غیر آدرنژیکی غیر کولینرژیک (NANC) عمل می‌کند و این اعصاب مهاری مسئول شل شدن عضله صاف در این سیستم هستند. علاوه بر آن NO روی سلولهای عضله صاف از طریق اثر در فاز G1 سیکل سلولی اثر مستقیم دارد. این احتمال وجود دارد که در تنگی هیپرتروفیک پیلور در کودکان (IHPS) که یکی از اختلالات شایع دوران نوزادی می‌باشد، کمبود ساخته شدن NO یکی از علل ایجاد کننده آن باشد. در این مطالعه جهت بررسی اثر نیتریک اکساید روی لایه عضلانی حلقوی پیلور جنین موش صحرایی از ماده مهار کننده تولید NO (N-nitro-L-arginine methyl ester=L-NAME) استفاده شد. به این ترتیب که L-NAME بطور روزانه در نرمال سالیین حل شده و به موشهای صحرایی باردار نژاد Sprague-Dawley در هفته آخر بارداری به میزان ۸۰ و ۲۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم به صورت داخل صفاقی تزریق می‌گردید. سپس جنینها در روز ۲۱ حاملگی از رحم خارج و معده و دوازده آنها از بدن در آورده می‌شد. پس از انجام مراحل ثابت کردن و پاساژ بافتی و تهیه مقاطع سریال ۵ میکرونی، رنگ آمیزی تری کروم ماسون و پاپ نیکولا صورت گرفت و لامها در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند. تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از مطالعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی نشان داد که مقدار ۸۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم L-NAME در گروه تجربی یک، باعث بروز تغییرات معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) شامل کاهش رشد داخل رحمی، تخریب اندام تحتانی، هیپرتروفی و هیپرپلازی پیلور می‌شود.

I معصومه ثقه‌الاسلام

II دکتر تابنده شریعتی

III دکتر محمد شعبانی

IV \*دکتر بهنام‌الدین جامعی

کلیدواژه‌ها: ۱- نیتریک اکساید (NO) ۲- تنگی هیپرتروفیک پیلور کودکان (IHPS)

۳- ماده مهار کننده سنتز NO (L-NAME)

## مقدمه

سپس در ترکیب با اکسیژن و آب به نیتريت و نیترات تبدیل می‌شود (۳، ۴ و ۵).

NO در داخل بدن از اسید آمینه L-arginine توسط NOS ساخته می‌شود (۱) و در تعدادی از فرآیندهای فیزیولوژیک، یک تنظیم کننده مهم است.

نیتریک اکساید یکی از ۱۰ مولکول کوچک موجود در طبیعت است که وزنی در حدود ۳۰ دالتون دارد (۱ و ۲). این مولکول در محیط آبی در حضور اکسیژن دارای نیمه عمری در حدود ۴ دقیقه است اما در سیستمهای بیولوژیک ثبات آن کاهش یافته و به حدود ۲ تا ۳۰ ثانیه می‌رسد.

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان نامه خانم معصومه ثقه‌الاسلام جهت دریافت مدرک کارشناسی ارشد آناتومی به راهنمایی دکتر تابنده شریعتی و مشاوره دکتر محمد شعبانی و دکتر بهنام‌الدین جامعی، سال ۱۳۸۱.

I) کارشناس ارشد آناتومی، مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر، کاشمر، ایران.

II) استادیار گروه آناتومی، مرکز علوم پایه دانشکده پزشکی، بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

III) استادیار گروه فارماکولوژی، مرکز علوم پایه دانشکده پزشکی، بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

IV) استادیار گروه آناتومی، مرکز تحقیقات سلولی - مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران (\*مؤلف مسئول).

## روش بررسی

در این تحقیق از موشهای صحرایی ماده نژاد Sprague-Dawley استفاده شد. موشهای بالغ، ۲ تا ۳ ماهه و دارای وزن تقریبی ۱۸۰-۲۲۰ گرم بودند و در Animal Room در دمای ۲۳-۲۷ درجه سانتیگراد و دوره ۱۲ ساعته روشنایی - تاریکی نگهداری می‌شدند. رژیم غذایی آنها مانند سایر موشها بوده و محدودیتی در این زمینه وجود نداشت. موشهای ماده با چنین شرایطی جهت انجام جفت‌گیری به نسبت ۲:۱ با موشهای نر جفت شدند و در صبح روز بعد با مشاهده پلاک واژینال، آن روز به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. علت انتخاب موشهای صحرایی در این تحقیق شباهت زیاد تغییرات همودینامیکی دوران بارداری آنها به دوران بارداری انسان بوده است (۸). در این تحقیق تمام مواد شامل L-NAME و کیت Griess از شرکت سیگما (Sigma) تهیه شده بود. ماده L-NAME روزانه پس از وزن شدن به مقدار لازم با یک میلی‌لیتر نرمال سالین استریل حل می‌شد و به روش داخل صفاقی به موشها تزریق می‌گردید. روش نمونه‌گیری به صورت تصادفی و بدین ترتیب بود که برای هر گروه، از ۵ سر موش صحرایی ماده استفاده شد. گروهها شامل گروه کنترل و گروه تجربی ۱ و ۲ بودند. از روز ۱۴ تا روز ۲۰ بارداری در گروه کنترل به موشها یک میلی‌لیتر نرمال سالین، در گروه تجربی ۱، ۸۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم ماده L-NAME و به موشهای گروه تجربی ۲ مقدار ۲۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم ماده L-NAME تزریق شد. در تمام گروهها در روز ۲۱ (پایان دوره بارداری) موشهای باردار با دوز کشنده اتر قربانی شده و جنینهای آنها به روش سزارین از رحم خارج گردید. جنینها پس از خارج شدن از کیسه آمیون و جدا کردن جفت از آنها در محلول نرمال سالین شستشو داده شده و به مدت ۲ ساعت در محلول ثابت کننده بوئن قرار گرفتند. پس از دادن یک برش عرضی روی شکم جنینها معده و دوازده آنها از بدن خارج شده و به مدت ۲۴ ساعت داخل محلول ثابت کننده بوئن قرار داده شد. پس از مرحله ثابت کردن، مراحل آماده‌سازی شامل مورفومتری آب‌گیری،

NOS انواع مختلفی دارد و از مغز (نوع I)، ماکروفاژها (نوع II) و اندوتلیوم عروق (نوع III) جدا شده است. انواع موجود در مغز و اندوتلیال عروق هر دو آنزیمهای وابسته به کلسیم - کالمودولین هستند که در شرایط فیزیولوژیک بیان می‌شوند (ساختمانی)، در حالی که نوع القایی (نوع II) غیروابسته به کلسیم - کالمودولین بوده و در عضله صاف عروق فقط در پاسخ به انواع سایتوکینها و اندوتوکسینها بیان می‌شود (۲ و ۷-۱۰). انواع ساختمانی، تونیسیت عروق، واسطه‌های عصبی و تجمع پلاکتی را تنظیم می‌کنند در حالی که نوع القایی روی التهاب و دفاع سلولی موثر می‌باشد (۱۱). تعدادی از مهار کننده‌های NOS که از نظر ساختمانی مشابه (آنالوگ) L-arginine هستند، مانند L-NAME هر دو نوع NOS ساختمانی و القایی را مهار می‌کنند (۵). NO در دوران بارداری به میزان بالایی در بدن تولید شده و در مجموعه رحمی - جفتی از طریق هر دو مسیر ساختمانی و القایی ساخته می‌شود (۴). در سالهای اخیر محققان گزارش کرده‌اند که در هفته سوم بارداری موشهای صحرایی (روزهای ۱۳ تا ۱۹)، مهار NOS توسط L-NAME منجر به کاهش رشد داخل رحمی جنین و تخریب اندام تحتانی جنینها می‌گردد (۵ و ۱۲). یکی از اختلالات دوران جنینی، تنگی هیپرتروفیک پیلور کودکان می‌باشد که از ۲ قرن گذشته مورد توجه بوده است (۱۳). در این بیماری لایه عضلانی حلقوی پیلور ضخیم بوده و به دنبال بلع شیر به علت عدم خروج آن از معده، محتویات معده برگشت پیدا می‌کند که علامت مشخصه بالینی آن استفراغ جهنده پس از تغذیه با شیر می‌باشد. به دنبال کشف علت بروز این اختلال و انجام یک سری مطالعات، محققان احتمال دادند که یکی از علل آن می‌تواند ساخته نشدن نیتریک اکساید در دستگاه گوارش جنین باشد (۱۳). در این تحقیق اثرات کمبود تولید NO با استفاده از ماده مهار کننده تولید نیتریک اکساید (L-NAME) در هفته پایانی دوران بارداری موشهای صحرایی (روزهای ۱۴ تا ۲۰) روی لایه عضلانی حلقوی پیلور جنین موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج**

**- بررسیهای ماکروسکوپی:** شکل ظاهری جنینها با چشم غیرمسلح بررسی شد و با توجه به اینکه در روز ۲۱ حاملگی از رحم خارج شده بودند انتظار می‌رفت که مشخصات ظاهری یک نوزاد کامل موش صحرایی را داشته باشند. در گروه کنترل جنینهای به دست آمده همگی سالم بوده و هیچ گونه ناهنجاری را نشان ندادند اما در گروه تجربی ۱ که موشهای باردار به میزان ۸۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم ماده L-NAME دریافت کرده بودند، ۲ نوع جنین به دست آمد. تعدادی از جنینها ظاهری سالم، تعدادی از آنها ناهنجاری یک طرفه در اندام تحتانی و تعدادی دیگر ناهنجاری دو طرفه در اندام تحتانی داشتند. در گروه تجربی ۲ که میزان ماده L-NAME تزریقی ۲۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم بود تمام جنینها از نظر ظاهری سالم بودند که این یافته‌ها با نتایج حاصل از مطالعات C.A Voelker R.L. و Pierce A.L. Diket همخوانی داشت (۸، ۱۱ و ۱۲). آنها به این نتیجه رسیده بودند که با تجویز خوراکی ۱۸۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم ماده L-NAME به مدت ۷ یا ۱۴ روز آخر دوران بارداری به موشهای صحرایی باردار، جنینهای آنها دچار تخریب اندام تحتانی به صورت یک طرفه یا دو طرفه و عقب‌ماندگی رشد داخل رحمی می‌شوند و این نتایج از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد.

در تمام گروههای مورد مطالعه تعدادی از جنینها جذب شدند که نتایج حاصل از بررسی میزان جذب جنینها و ناهنجاریهای ظاهری آنها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

شفاف‌سازی و قالب‌گیری روی نمونه‌ها انجام شد سپس با استفاده از میکروترم روتاری برشهای ۵ میکرونی سریال تهیه گردید و پس از انتقال روی لامهای ژلاتینه شده، رنگ‌آمیزی به ۲ روش تری کروم‌ماسون و پاپ‌نیکولا صورت گرفت. در رنگ‌آمیزی اول بافتهای همبند و عضلانی و مخاطی رنگهای مختلفی به خود گرفته و از هم قابل افتراق می‌گردند و در رنگ‌آمیزی دوم هسته سلولها قابل مشاهده و شمارش می‌شوند. پس از رنگ‌آمیزی ارزیابی‌های مورفومتری به کمک ۲ نوع عدسی مشبک و خطی صورت گرفت بدین ترتیب که به کمک عدسی مشبک تعداد سلولهای لایه عضلانی صاف حلقوی پیلور و به کمک عدسی خطی ضخامت لایه عضلانی صاف حلقوی پیلور مشخص شد.

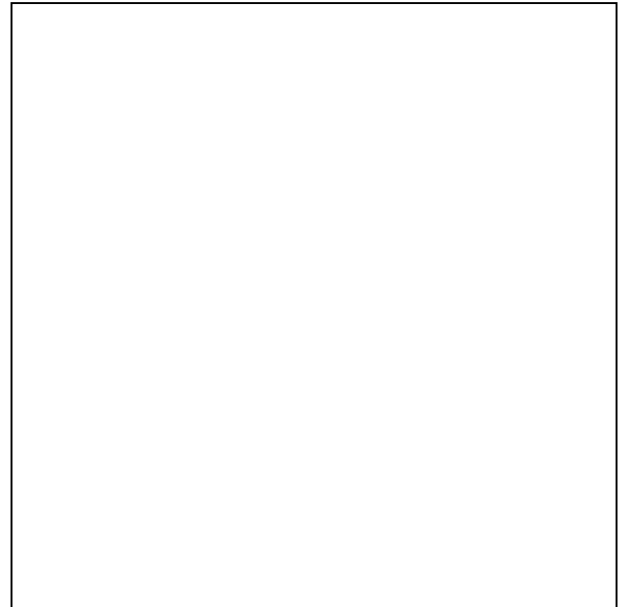
**- اندازه‌گیری نیترات و نیتريت سرم خون جنین:** با توجه به آنکه NO در بدن بلافاصله با اکسیژن ترکیب شده و ترکیبات NO<sub>2</sub> (نیتريت) و NO<sub>3</sub> (نیترات) را به وجود می‌آورد برای ردیابی NO در بدن جنین میزان نیتريت و نیترات سرم خون به کمک کیت Griess اندازه‌گیری گردید. برای به دست آوردن سرم خون جنین، جفتهای به دست آمده از آنها هموژنیزه و سانتریفوژ شد سپس آزمایش روی شیره استخراج شده از جفت صورت گرفت.

**- روش آماری و تجزیه و تحلیل اطلاعات:** تمام داده‌های اندازه‌گیری شده ابتدا توسط نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل واریانس قرار گرفتند، سپس میانگینها با آزمون چند دامنه Duncan در سطح احتمال ۱٪ ( $P < 0.01$ ) مقایسه شدند.

**جدول شماره ۱- درصد جذب جنینها و ناهنجاریهای ظاهری آنها در گروههای مورد مطالعه**

گروه‌ها	تعداد موش	نوع ماده مصرفی	دوز مصرفی	روزهای تزریق	روز بررسی	تعداد جنین		تخریب اندام تحتانی	
						تعداد	درصد	یک طرفه	دو طرفه
تجربی ۱	۵	L-NAME	۸۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم	۱۴ الی ۲۰	۲۱	۶	۱۹/۳	۸	۲۵/۸
تجربی ۲	۵	L-NAME	۲۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم	۱۴ الی ۲۰	۲۱	۱	۶/۷	=	=
کنترل	۵	NACL	۱ میلی‌لیتر	۱۴ الی ۲۰	۲۱	۱	۳/۲	=	=

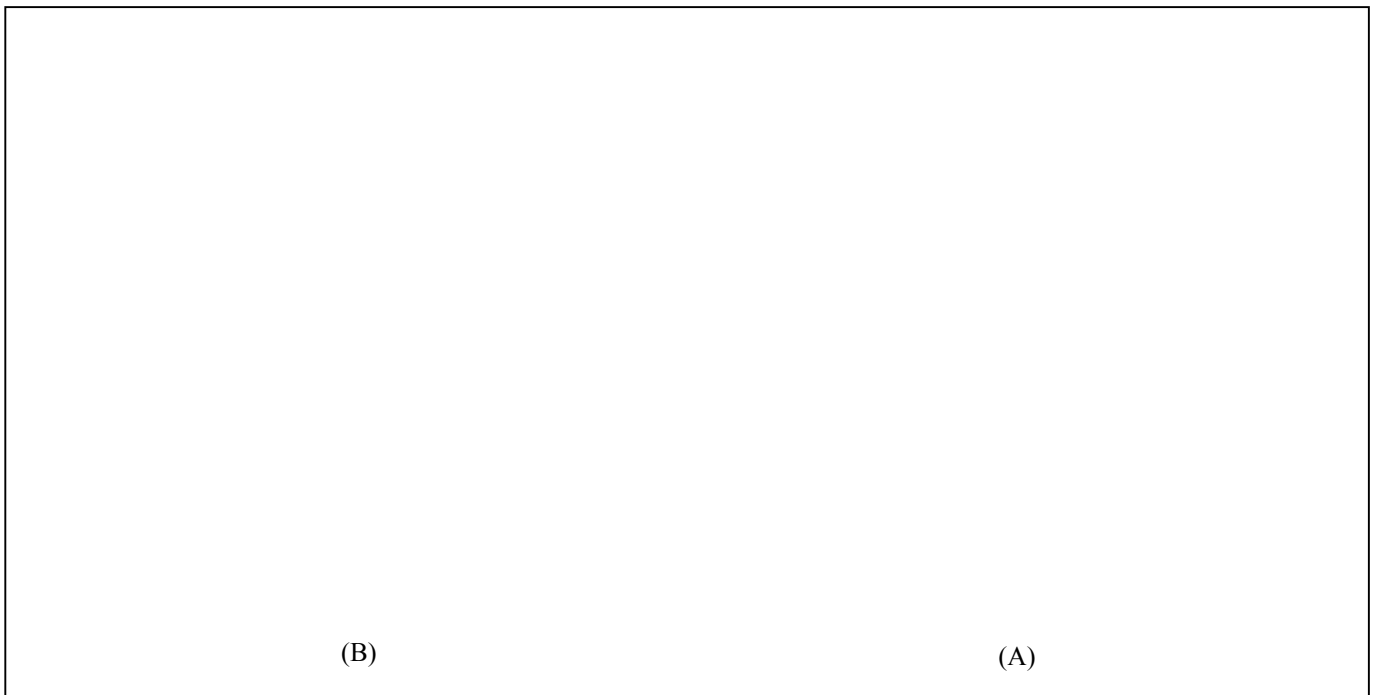
- بررسی میکروسکوپی: نتایج ارزیابی‌های کیفی مقاطع تهیه شده از پیلور جنینها در گروه کنترل، آرایش سلولی عضله صاف حلقوی پیلور را طبیعی نشان داد و هسته سلولها همان‌طور که انتظار می‌رفت دوکی شکل بودند(تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱- مقطعی از پیلور گروه کنترل

در گروههای تجربی ۱ و ۲ مقاطع به دست آمده از پیلور جنینهایی که به ظاهر سالم بودند و اختلالی را نشان نمی‌دادند مانند گروه کنترل دارای آرایش سلولی طبیعی لایه عضلانی حلقوی پیلور بوده و هسته سلولها دوکی شکل بود اما این مقاطع در جنینهای دچار ناهنجاری گروه تجربی ۱ (تخریب اندام تحتانی)، ظاهر طبیعی نداشت، آرایش و نظم سلولی لایه عضلانی حلقوی به هم خورده بود و سلولها متورم و دارای هسته‌های گرد بودند به عبارت دیگر دچار هیپرتروفی شده بودند(تصویر شماره ۲-A).

علاوه بر آن همان‌طور که انتظار می‌رفت و در مقالات گذشته نیز ذکر شده است(۱۶ و ۱۷) در این مقاطع در لابلای لایه عضلانی حلقوی پیلور بافت همبند تجمع یافته و به آن ظاهری توده مانند داده بود(تصویر شماره ۲-B).

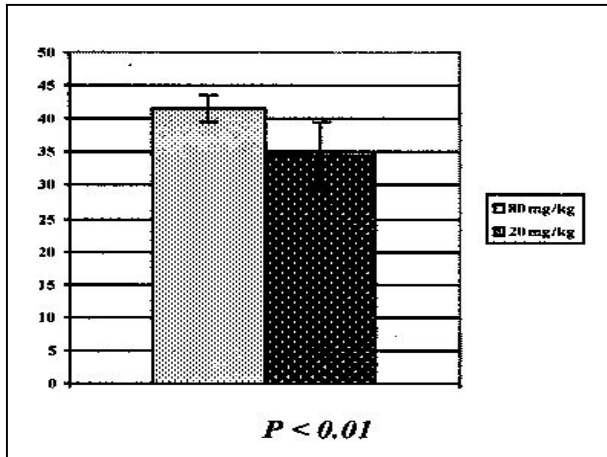


تصویرهای شماره ۲- A و B- مقطعی از پیلور جنین مبتلا به ناهنجاری اندام تحتانی در گروه تجربی ۱

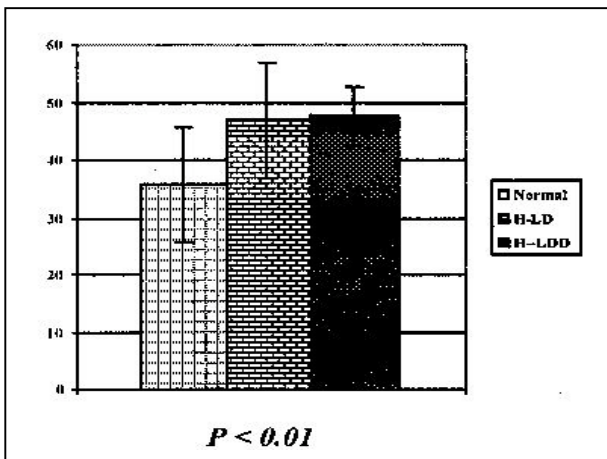
- ارزیابی‌های مورفومتری: نتایج این تحقیق نشان داد که در گروه‌های مورد مطالعه ضخامت عضله صاف حلقوی پیلور جنین در گروه دریافت کننده ماده L-NAME با میانگین ۸۳/۲۳ میکرون بطور معنی‌داری بیش از گروه کنترل با میانگین ۷۱/۱۵ میکرون می‌باشد (نمودار شماره ۱) و در یک مقایسه داخل گروهی در گروه دریافت کننده ماده L-NAME که شامل ۲ گروه تجربی ۱ و ۲ بود، ضخامت عضله صاف حلقوی پیلور جنین در گروه تجربی ۱ با میانگین ۸۰/۷۷ میکرون بطور معنی‌داری بیش از گروه تجربی ۲ بوده است (نمودار شماره ۲).

در این تحقیق جنینهای گروه تجربی ۱ در ۳ گروه تقسیم‌بندی شدند که عبارت بودند از: جنینهای طبیعی، جنینهای مبتلا به ناهنجاری یک طرفه اندام تحتانی و جنینهای مبتلا به ناهنجاری دو طرفه اندام تحتانی.

بنابراین یک تجزیه واریانس بین میانگین ضخامت عضله صاف حلقوی پیلور در این ۳ گروه انجام شد که براساس نتیجه به دست آمده ضخامت عضله صاف حلقوی پیلور جنین در گروه مبتلا به ناهنجاری دو طرفه اندام تحتانی با میانگین ۱۰۴/۹۴ میکرون بطور معنی‌داری در مقایسه با سایر گروهها دارای کمترین مقدار بوده است (نمودار شماره ۳).

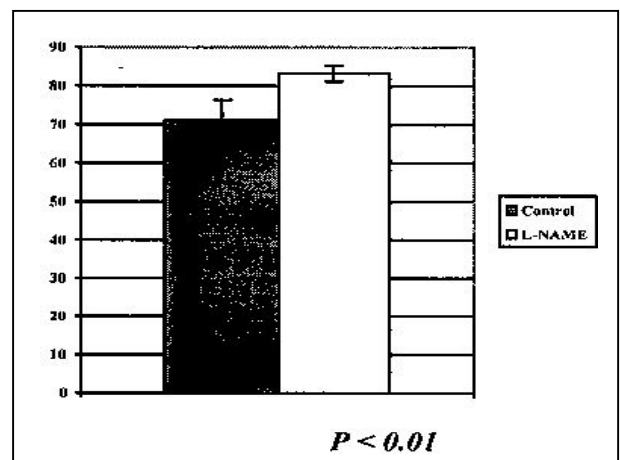


نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین تعداد سلولهای عضله صاف حلقوی پیلور در گروههای تجربی ۱ و ۲ ( $P < 0.01$ )



نمودار شماره ۳- مقایسه میانگین تعداد سلولهای عضله صاف حلقوی پیلور در گروههای دریافت کننده ۸۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم ماده L-NAME ( $P < 0.01$ )

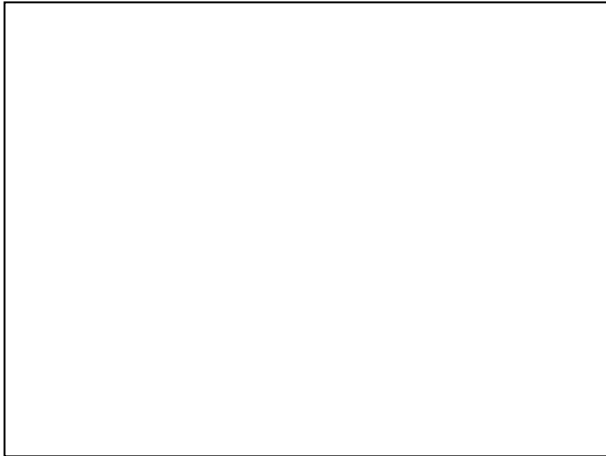
در رابطه با اندازه‌گیری تعداد سلولهای عضله صاف حلقوی پیلور جنین نتایج نشان دادند که در گروههای مورد مطالعه تعداد سلولهای عضله صاف حلقوی پیلور جنین در گروه دریافت کننده ماده L-NAME با میانگین ۴۱/۸ سلول بطور معنی‌داری بیش از گروه کنترل با میانگین ۳۵/۹ سلول می‌باشد (نمودار شماره ۴) و در یک مقایسه داخل گروهی در گروههای دریافت کننده ماده L-NAME یعنی دو گروه تجربی ۱ و ۲ تعداد سلولهای عضله صاف حلقوی پیلور جنین در گروه تجربی ۱ با میانگین ۴۱/۵



نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین تعداد سلولهای عضله صاف حلقوی پیلور در گروههای مورد مطالعه ( $P < 0.01$ )

سلول بطور معنی‌داری بیش از گروه تجربی ۲ بود(نمودار شماره ۵).

در رابطه با تعداد سلولهای عضله صاف حلقوی پیلور در داخل گروه تجربی ۱، مقایسه داخلی گروهی انجام شد و مشاهده گردید که تعداد سلولهای عضله صاف حلقوی پیلور جنین در گروه مبتلا به ناهنجاری دو طرفه اندام تحتانی با میانگین ۴۷/۶ سلول بیشترین مقدار را داشته و تفاوت معنی‌داری با گروه مبتلا به ناهنجاری یک طرفه اندام تحتانی ندارد. تعداد سلولهای عضله صاف حلقوی پیلور جنین در گروه طبیعی، با میانگین ۳۵/۷ سلول بطور معنی‌داری نسبت به سایر گروهها کمتر بوده است(نمودار شماره ۶).



**نمودار شماره ۶-** مقایسه میانگین تعداد سلولهای عضله صاف حلقوی پیلور در گروههای دریافت کننده ۸۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم ماده L-NAME ( $P < 0.01$ )



**نمودار شماره ۴-** مقایسه میانگین تعداد سلولهای عضله صاف حلقوی پیلور در گروههای مورد مطالعه ( $P < 0.01$ )



**نمودار شماره ۵-** مقایسه میانگین تعداد سلولهای عضله صاف حلقوی پیلور در گروههای تجربی ۱ و ۲ ( $P < 0.01$ )

نتایج حاصل از به کارگیری Griess Reagent نشان داد که بیشترین میزان غلظت نیتريت در سرم خون جنینهای گروه کنترل و کمترین میزان آن در گروه تجربی ۱ وجود دارد.

با توجه به این یافته‌ها می‌توان گفت که NO از جفت عبور کرده و به بدن جنین می‌رسد و در صورت استفاده از ماده مهار کننده NO، (L-NAME) مقدار کمتری NO در بدن ساخته می‌شود.

این نتایج سایر یافته‌های ما را در این تحقیق تایید می‌کند.

#### بحث

در این تحقیق مشاهده شد که تجویز ماده مهار کننده تولید نیتریک اکساید (L-NAME) در <sup>۱</sup> پایانی دوران بارداری موشهای صحرایی سبب ایجاد ناهنجاری اندام تحتانی و اختلالات بافتی نظیر افزایش در تعداد و ضخامت سلولهای لایه عضلانی حلقوی پیلور در جنین آنها می‌شود.

این نتایج در ارتباط با توانایی L-NAME در مهار تولید نیتریک اکساید در بدن و همچنین وابسته به دوز مصرفی آن می‌باشد زیرا همان‌طور که مشاهده گردید در صورتی

برای توجیه این مسئله باید گفت که در مجرای معده - روده ای عضلات اسفنکتری و غیر اسفنکتری انقباضات تونیک خود را تحت کنترل شبکه عصبی میانتریک انجام می‌دهند و در این شبکه عصبی وجود NOS نوع نورونال (نوع I) ثابت شده است (۱۸). همچنین مشخص شده که در سرتاسر روده موش صحرایی از معده تا انتهای کولون، NOS در داخل شبکه میانتریک وجود دارد (۱۹).

بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که در صورت مهار تولید NO در بدن جنین، دستگاه گوارش نیز تحت تاثیر قرار گرفته و علائمی نظیر افزایش در تعداد سلولها و ضخامت لایه عضلانی حلقوی پیلور را نشان دهد.

از سوی دیگر تنگی هیپرتروفیک پیلور در کودکان (IHPS) که یک اختلال شایع مجرای معده - روده‌ای در نوزادان انسان است و علامت اصلی آن تنگ شدن دریچه خروجی معده به علت هیپرتروفی و هیپرپلازی عضله صاف حلقوی پیلور و در نتیجه اختلال در شل شدن آن می‌باشد و با وجود آنکه بیش از ۲ قرن است که به عنوان بیماری مطرح شده (۱۲)، مکانیسم فیزیولوژیک آن هنوز خوبی شناخته نشده است و محققان به دنبال پیدا کردن علل بوجود آورنده آن می‌باشند.

در سالهای اخیر مشخص شده است که در پاتوفیزیولوژی اختلالاتی نظیر آشالازی مری به علت ضعف اسفنکتر تحتانی مری، بیماری هیرشپرونک به علت شل شدن اسفنکتر داخلی مقعد و IHPS به علت ضعف عضله پیلور، ناهنجاریهای نورونهای سازنده NO نقش دارند (۱۸) همچنین Kusafuka, Puri نشان دادند که در عضله پیلور بیماران IHPS، بیان ژن کد کننده NOS کاهش می‌یابد (۱۵).

بر اساس مطالعات موجود می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کمبود تولید NO در اعصاب داخلی لایه عضلانی حلقوی اسفنکتر پیلور می‌تواند علت عدم شل شدن اسفنکتر پیلور در کودکان دچار IHPS باشد.

که از L-NAME به میزان ۲۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم جهت تزریق به موشهای باردار استفاده شود، این علائم در جنین روز نمی‌کنند اما با دوز ۸۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم در تعدادی از جنینها علائم ماکروسکوپی و میکروسکوپی همراه با هم دیده می‌شود.

از سوی دیگر بر اساس مطالعات گذشته، بروز این علائم به مدت زمان مصرف ماده L-NAME در دوران بارداری نیز بستگی دارد (۸، ۱۱ و ۱۲).

همان طور که گفته شد L-NAME فعالیت انواع NOS ساختمانی را بطور واضحی مهار می‌کند که یکی از انواع این آنزیمها (نوع III) eNOS می‌باشد این آنزیم در اندوتلیوم عروق خونی وجود دارد (۷).

بنابراین در صورت مهار فعالیت این آنزیم سازنده NO، نیتریک اکساید به میزان کافی در بافت تولید نشده و در نتیجه عمل آن که شل کردن عضله صاف عروق خونی و جلوگیری از تجمع پلاکتی است به درستی انجام نمی‌شود. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که در صورت استفاده از L-NAME در دوران بارداری به علت به هم خوردن تنظیم جریان خون جفتی - جنینی و شاید انعقاد خون در مسیر گردش خون جنینی - مادری، جنینها جذب شده یا دچار کاهش رشد داخل رحمی می‌شوند.

در رابطه با ایجاد بد شکلی‌هایی نظیر ناهنجاری اندام تحتانی در جنین، علت آن می‌تواند کمبود تولید NO در بدن جنین و در نتیجه اسپاسم عروقی و به دنبال آن نکروز اندام تحتانی باشد که در سال ۱۹۹۴ و ۱۹۹۵ محققان به آن اشاره کرده‌اند (۸، ۱۱ و ۱۲).

مهمترین نتیجه به دست آمده از این تحقیق در رابطه با تغییرات بافتی عضله صاف حلقوی پیلور در جنینهای قرار گرفته در معرض L-NAME با دوز ۸۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل و تجربی ۲ بوده است. همان طور که در بخش نتایج گفته شد پیلور جنینهایی از این گروه (گروه تجربی ۱) این تغییرات بافتی را نشان دادند که مبتلا به ناهنجاری اندام تحتانی شده بودند.

Cardiothoracic and vascular anesthesia, 1995, December 9(6): 748-763.

8- Pierce RL., Pierce MR., Liu H., Kadowitz PJ., Miller MJS. "Limb reduction defects after prenatal inhibition of nitric oxide synthase in rats, *Pediatr Res*, 1995, 38(6): 905-911.

9- Snyder SH., Bredt DS. "Biological roles of nitric oxide, *Scientific American*, 1992, 266: 28-35.

10- Wang MX., Murrell DF., Szaba C., Warren RF., Sarris M., Murrell GAC. "Nitric oxide in skeletal muscle: Inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats, *Nitric oxide biology and chemistry*, 2001, 5(3): 219-232.

11- Voelker CA., Miller MJS., Zhang XJ., Zhang X-J., Eloby-Childress S., Clark DA., et al. "Perinatal nitric oxide synthase inhibition retards neonatal growth by inducing hypertrophic pyloric stenosis in rats, *Pediatr Res*, 1995, 38: 768-774.

12- Diket AL., Pierce MR., Munshi UK., Voelker CA., Eloby-childress S., Greenberg SS., et al. "Nitric oxide inhibition causes intrauterine growth retardation and hind-limb disruptions in rats, *Am J Obstet Gynecol*, 1994, 171: 1243-50.

13- Hayes MA., Goldenberg IS. "The problems of infantile pyloric stenosis, *Int Abst Surg*, 1975, 104: 105-138.

14- Ishiguchi T., Takahashi T., Itoh H., Owyang C. "Nitrgic and purinergic regulation of the rat pylorus, *Am J Physiol Gastrointest liver Phisiol*, 2000(oct); 279(4): G740-7.

15- Kusafuka T., Puri P. "Altered messenger RAN expression of the neuronal nitric oxide synthase gene in infantile hypertrophic pyloric stenosis, *Pediatr Surg Int*, 1997, 12: 576-579.

16- Spicer RD. "Infantile hypertrophic pyloric stenosis: a review, *Br J Surg*, 1982, 69: 128-135.

17- Tam PKH., Chan J. "Increasing incidence of hypertrophic pyloric stenosis, *Arch Dis Child*, 1991, 66: 530-1.

18- Brandt CT., Graham A and Tam PKH. "Densities of nitric oxide synthesizing nerves in smooth muscles of human gut during fetal development, *J Pediatr Surge*, 1997, 32: 1314-1317.

به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که عوارض جنینی نظیر بدشکلی (ناهنجاری اندام تحتانی) و تنگی هیپرتروفیک پیلور پیامدهای مهار فعالیت آنزیم تولید کننده NO از نوع اندوتلیالی و نورونال بوده و تولید نیتریک اکساید از L-arginine توسط آنزیم سازنده ساختمانی نیتریک اکساید (eNOS) برای رشد و تکامل جنینی ضروری می‌باشد و کمبود یا عدم وجود NO در دوران بارداری مادران می‌تواند یکی از علل ایجاد تنگی هیپرتروفیک پیلور در نوزادان آنها باشد.

#### قدردانی و تشکر

این طرح با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است بدین وسیله نویسندگان مراتب قدردانی و تشکر خود را نسبت به آن معاونت اعلام می‌دارند.

#### منابع

1- Bulgrin JP., Shabani M., Smith DJ. "Arginine-Free diet suppresses nitric oxide production in wounds, *J Nutr Biochem*, 1993, 4: 588-593.

2- Zhang H., Snead C., Catravas JD. Nitric Oxide differentially regulates induction of type II nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells versus macrophages, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21: 529-535.

3- Lancaster Jr., Jack R. "Nitric oxide in cells, *American Scientist*, 1994(May-June), 80: 248-259.

4- Norman JE., Cameron IT. "Nitric oxide in the human uterus, *Res Repro*, 1996, 1: 61-68.

5- Porsti I., Poakkari I. "Nitric oxide-based possibilities for pharmacotherapy, *Annals of Medicine*, 1995, 27: 407-420.

6- Palmer RMJ., Ferrige AG., Moncada S. "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing Factor, *Nature*, 1987, 327: 524-526.

7- Body SC., Hartigan RM., Shernan SK., Formanek V., Hurford WE. "Nitric oxide delivery, measurement and clinical application, *J*

19- Belai A., Schmidt HW., Hoyle CHV., Hassall CJS., Saffrey MJ., Moss J., et al. "Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in the myenteric plexus of the rat gut, *Neurosci Lett*, 1990, 143: 60-64.

## THE EFFECT OF NITRIC OXIDE (NO) ON CIRCULAR SMOOTH MUSCLE OF PYLOR IN RAT EMBRYO

<sup>I</sup> M. Seghatoleslam, MSc    <sup>II</sup> T. Shariati, PhD    <sup>III</sup> M. Shabani, PhD    <sup>IV</sup> \*S.B. Jameie, PhD

### ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is an unstable small molecule which acts as lipophilic free radicals. It is synthesized in different mammalian cells and thought to be involved in many physiological and pathological conditions. There are many evidences that show NO acts as a neurotransmitter in Non-Adrenergic, Non-Cholinergic (NANC) nerves, innervating smooth muscles of digestive system and also has direct influence on smooth muscle cells. Infantile hypertrophic pyloric stenosis (IHPS) is one of the most common pathological conditions among the neonates. It is thought that any failure in NO synthesis could be one of the reasons of IHPS. Pregnant Sprague-Dawley rats were used in this study. Different doses of the L-NAME (20-80mg/kg) as an NO inhibitor in normal saline was injected intraperitoneal (IP) during the last week of pregnancy period per day. The embryos were removed on the day of expected delivery. The stomach and duodenum were dissected, fixed by Bouin solution and tissue processing was done. By using rotatory microtome, 5 $\mu$  serial cross sections were obtained and stained with Trichrom-Mason and Pop-Nicola. Statistical analysis of macroscopic and light microscopic findings showed that 80mg/kg of L-NAME causes significant changes in embryos of trial group including: IUGR, hind-limb disruption, embryo absorption, pyloric hypertrophy and hyperplasia. On the basis of these results it is believed that 80mg/kg of L-NAME can be one of the reasons of pyloric stenosis in infants.

**Key Words:** 1) Nitric Oxide(NO)    2) IHPS    3) N-Aitro-L-Arginine Methyl Ester(L-NAME)

*This article is a summary of the thesis by M.Seghatoleslam MSc for degree of MSc in Anatomy under supervision of T.Shariati,Ph.D and consultation with M.Shabani,Ph.D and S.B. Jameie,Ph.D(2002).*

**I)** Instructor of Anatomy, Islamic Azad University, Kashmar Branch, Kashmar, Iran.

**II)** Assistant Professor of Anatomy, Basic Sciences Center, Faculty of Medicine, Hemmat Highway, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

**III)** Assistant Professor of Pharmacology, Basic Sciences Center, Faculty of Medicine, Hemmat Highway, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

**IV)** Assistant Professor of Anatomy, Cellular & Molecular Research Center(CMRC), Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran(\*Corresponding author)