

## بررسی سطح پلاسمائی هوموسیستئین در موشهای کلستاتیک و تأثیر آن بر ترشح نیتریک اکساید در کبد

دکتر ناصر میرازی\*، دکتر احمد رضا دهپور\*\*

دریافت: ۸۳/۳/۲۵، پذیرش: ۸۳/۱۱/۵

### چکیده:

هوموسیستئین (Hcy) یکی از اسیدهای آمینه دارای گروه تیول می باشد که به عنوان فاکتور مخاطره آمیز بعضی از بیماریهای قلب و عروق و از جمله عوامل تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن ( $O_2^-$ ) شناخته شده است. در بیماری کلستاز وجود آثار استرس اکسیداتیو Hcy و ایجاد و پیشرفت تولید رادیکالهای آزاد  $O_2^-$  گزارش شده است. هدف از این بررسی تعیین و شناخت بیشتر عوامل مؤثر در اختلالات پاتولوژیک ناشی از تغییرات غلظت هوموسیستئین پلاسما و NO کبدی در شرایط کلستاز می باشد.

در این مطالعه تعداد ۱۵۰ عدد موش صحرایی از نژاد Sprague - Dawley و با میانگین تقریبی وزن  $20 \pm 200$  گرم مورد آزمایش قرار گرفت. حیوانات در سه گروه کنترل، SHAM و گروه تحت عمل جراحی بستن مجرای صفراوی (BDL) و به تعداد ۱۲-۱۰ عدد در هر گروه تقسیم شدند. پس از شروع آزمایشات و مشاهده بیماری کلستاز در گروه BDL در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ و پس از انجام بیهوشی در حیوانات، اقدام به گرفتن خون از قلب آنان شد. همچنین دو ساعت قبل از خونگیری مقدار  $100$  و  $40$  mg/kg متیونین به موشهای هر گروه و به روش داخل صفاقی تزریق گردید. اندازه گیری مقادیر سیستئین و متیونین پلاسما توسط HPLC و HPLC-UV صورت گرفت. تعیین مقدار نیتريت و نیترات جهت بررسی مقدار NO نیز به عمل آمد. داده های حاصله با استفاده از آزمون های آماری ANOVA دو طرفه و Post Hoc Test مورد ارزیابی قرار گرفت و اختلافات حاصله با  $P < 0.05$  معنی دار تلقی گردید.

نتایج این بررسی نشان داد که بیلروبین و آنزیم های کبدی در گروه BDL نسبت به گروه های کنترل و SHAM افزایش معنی داری داشت ( $P < 0.05$ ). مقدار Hcy در گروه BDL در روز ۱۴ بسیار بالا و معنی دار بود ( $P < 0.01$ ). مقدار اسیدهای آمینه سیستئین و متیونین گروه BDL نسبت به دو گروه دیگر افزایش معنی داری داشت ( $P = 0.01$ ). نسبت نیترات / نیتريت در گروه BDL نسبت به گروه های کنترل و SHAM بیشتر و با  $P < 0.01$  تفاوت معنی داری نشان داد. بر اساس این نتایج، به نظر می رسد که عوامل آسیب رسان اکسید کننده سیستمیک در مدل بیماری کلستاز انسدادی احتمالا در ارتباط با مکانیسم های وابسته به NO موجب بروز ناهنجاریهای کبدی می شوند.

کلید واژه ها: کلستاز / نیتریک اکساید / هوموسیستئین

در جریان یا تولید صفرا می باشد و از جمله بیماریهای کبدی است که می تواند در ایجاد گروهی از عوامل آسیب رسان بافتی نقش اساسی بازی کند. از لحاظ عملکرد،

### مقدمه:

اختلالات ایجاد شده در کبد زمینه ساز بسیاری از عفونتها و نارسایی ها در بیماران می باشد. کلستاز اختلال

\* استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه بوعلی سینا همدان (mirazi@basu.ac.ir)

\*\* استاد گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

مثل پاره شدن یا شکافتن رگ اتفاق می افتد و باعث گشاد شدن رگ می شود که برای تنظیم جریان خون و فشار آن ضروری است (۸-۶). NO تولید شده از آندوتلیوم یا پلاکت های به دام افتاده تجمع پلاکتی و چسبندگی لکوسیتها را مهار می کند و پرولیفراسیون سلولهای عضله صاف را تنظیم می کند (۹). اسیدآمینه هوموسیستئین در ایجاد فیبروز کبدی نقش دارد. اضافه بر این غلظت پلاسمایی Hcy رابطه نزدیکی با نواقص مادرزادی، اختلالات بارداری، ناهنجاریهای روانی و زایل شدن هوش در دوران کهولت دارد و اندازه گیری غلظت پلاسمایی آن در یافته های کلینیکی بسیار حائز اهمیت می باشد (۱۰).

S-آدنوزیل - متیونین (SAM) یکی از دهنده های عامل متیل حاضر در همه محیط های بیولوژیک است که به طور گسترده قادر است عامل مزبور را به DNA، RNA، پروتئینها، فسفولیپیدها، هورمون ها و سایر ترکیبات اضافه کند (۱۱). این پدیده توسط آنزیم متیونین آدنوزیل ترانسفراز (MAT) انجام می شود (۱۲).

در جریان روند بیوشیمیایی فوق متیونین توسط آنزیم (MAT)، به S-آدنوزیل هوموسیستئین (SAH)، پس از دادن یک عامل متیل، تبدیل میگردد (۱۳). هوموسیستئین ممکن است دوباره متیله شود و تبدیل به متیونین شود، یا اینکه ترانس سولفورده گردیده و تولید سیستئین را نماید (۱۲). حدود ۸۵٪ ظرفیت فرایند ترانس متیلاسیون متیونین در کبد انجام می شود و نقش مرکزی در متابولیسم هوموسیستئین دارد. بنابراین کاهش فعالیتهای کبدی می تواند تاثیر در متابولیسم هوموسیستئین و تغییر سطح پلاسمایی آن بگذارد (۵،۱۴). در بررسی های به عمل آمده در بیماری سیروز کبدی افزایش سطح پلاسمایی هوموسیستئین نشان داده شده است (۱،۱۵). وستفال و همکاران، سطح پلاسمایی طبیعی Hcy را تنها از ۲۶٪ جمعیت بیماران سیروزی را که مورد مطالعه قرار داده بود یافتند (۱۶). فری و همکاران در مطالعه ای که انجام دادند افزایش Hcy را در بیماران سیروزی غیر الکلی مشاهده کردند (۱۷). در مطالعه ای که در آن به طور طولانی مدت حیوانات آزمایشگاهی تحت تجویز اتانول یا کلروفورم قرار گرفته بودند، افزایش سطح پلاسمایی هوموسیستئین نشان داده شد (۱۷). همچنین کاهش نسبت S-آدنوزیل متیونین به S-آدنوزیل هوموسیستئین در مطالعات دیگری دیده

کلاستاز با کاهش جریان صفرا همراه است. کاهش ترشحات کبدی آب و آنیونهای ارگانیک مانند بیلی روبین و اسیدهای صفراوی وجود دارد. از لحاظ مورفولوژیک کلاستاز تجمع صفرا در سلولهای کبدی و کانالهای صفراوی است. از لحاظ بالینی کلاستاز تجمع خونی تمام موادی است که به طور طبیعی در صفرا دفع می شوند و اسیدهای صفراوی سرم افزایش می یابند. تظاهرات بالینی شامل خارش (هرچند همیشه وجود نخواهد داشت)، زردی، خستگی، استئاتوره، افزایش آلکالین فسفاتاز سرم (ایزو آنزیم های بیلیاردی) و افزایش ۷-گلوتامین - ترانس پپتیداز می باشند (۱،۲).

هوموسیستئین (Hcy) یک اسیدآمینه دارای گروه تیول (سولفور) می باشد. اخیرا این اسیدآمینه به عنوان فاکتور مخاطره آمیز بیماریهای قلب و عروق و از علل تولید رادیکالهای آزاد شناخته شده است (۳). این اسیدآمینه از جمله مواد واسط متابولیسم متیونین در پستانداران محسوب میگردد. هوموسیستئین به واسطه اتواکسیداسیون باعث تولید یون پراکسید  $O_2^-$  در کنار عروق میگردد.  $O_2^-$  تولید شده مانع عملکرد طبیعی نیتریک اکساید (NO) می گردد و باعث عدم کارایی آندوتلیوم (Endothelial dysfunction) می شود (۴،۵). نیتریک اکساید (NO) از اسیدآمینه L-آرژنین ساخته می شود و تقریبا تمام سلولهای پستانداران می توانند آن را بسازند. از جمله این سلولها می توان به سلولهای آندوتلیوم پوششی عروق، نورونهای سیستم اعصاب مرکزی و روده ای و سلولهای سیستم ایمنی بدن اشاره کرد (۶).

فورشگات و زاداووسکی در سال ۱۹۸۰ نشان دادند که عملکرد بیولوژیک فاکتور گشاد کننده رگی مشتق از آندوتلیوم عروق (EDRF) از طریق آزاد شدن NO عملی می گردد. این کشف مهم سر فصل شروع مطالعات گسترده ای بر روی این مولکول کوچک و فرار شد. بعدا معلوم شد که یک مسیر بیوشیمیایی مشابه برای تولید آن در تمام بدن وجود دارد (۷،۸). در حالت عادی نیتریک اکساید به شکل رادیکال آزاد در بدن پستانداران وجود ندارد و باید سنتز شود. آنزیم های متعددی در این تبدیل دخالت دارند که همه در خانواده Nitric Oxide Synthase (NOS) طبقه بندی شده اند. NO در بسیاری از سیستم های فیزیولوژیک دخیل است. تولید NO در آندوتلیوم عروق در پاسخ به محرکهایی

بر روی آنها صورت گرفت.

**گروه BDL:** در این گروه حیوانات مورد آزمایش تحت عمل جراحی قرار گرفته و مجرای صفراوی آنها بسته شد (Bile Duct Ligated). روش انجام این کار بدین صورت بود که ابتدا موش های گروه BDL توسط داروی کتامین هیدروکلراید به میزان 50 mg/kg و گزیلازین هیدروکلراید به میزان 10 mg/kg از طریق تزریق داخل صفاقی بیهوش گردیدند. بعد از بیهوشی موشها، موهای ناحیه میانی شکم توسط ماشین تراش مو مخصوص حیوان کوچک کاملاً تراشیده شد. سپس از الکل ۷۰ درجه برای ضدعفونی پوست شکم استفاده شد. بعد توسط چاقوی جراحی یک شکاف طولی به اندازه ۳ سانتی متر در خط میانی شکم ایجاد شد و در دو مرحله پوست و عضلات جدار شکم باز شد. پس از یافتن مجرا، پنسی زیر آن قرار داده شد و با استفاده از نخ سیلک چهار صفر در دو نقطه جداگانه با فاصله از هم گره زده شد و بعد در داخل شکم آزاد گردید. سپس جدار شکم در دو لایه عضله و پوست با نخ سیلک دوخته شد (به شکل بخیه متوالی) بعد از اتمام عمل جراحی، میزان ۲ میلی لیتر سرم سالین نرمال داخل صفاق تزریق گردید. بعد از پایان کار عمل محل جراحی با بتادین کاملاً ضدعفونی گردید.

سپس حیوانات در قفسهای جداگانه قرار داده شدند و آب و غذا به طور آزاد در اختیارشان قرار داده شد. میزان مرگ و میر بر اثر جراحی حدود ۲٪ بود.

دو روز بعد از انجام عمل جراحی با بررسی رنگ زرد ادرار حیوان و همچنین تغییر رنگ گوش های آنها به طرف زردی، وقوع یا عدم وقوع کلتستاز تعیین گردید. موشهایی که فاقد این علامت بودند از مطالعه خارج شده و حذف گردیدند. میزان خروج حیوانات نیز حدود ۵٪ بود.

**گروه SHAM:** در این گروه نیز تعداد موشهای انتخاب شده برابر تعداد گروه BDL بودند. همانند گروه BDL در این گروه نیز عمل جراحی روی موشها انجام شد. پس از باز کردن شکم و کنار زدن کبد و دوازدهه و پیدا شدن مجرای صفراوی، آنرا کمی با انگشت دستکاری کرده و سپس بدون زدن گره دوباره در داخل شکم رها گردید. بعد از آن عضلات و پوست شکم بخیه زده شد و بقیه مراحل دقیقاً مطابق روش انجام شده گروه BDL بود. در این گروه مرگ و میری دیده نشد.

شده است (۱۸،۱۹). تأثیرات محافظتی S-آدنوزیل متیونین بر روی کبد در این گروه از بیماران سیروزی تجربی همراه با کاهش غلظت هوموسیستئین بوده است. تاکنون هیچگونه اطلاعاتی که در بر گیرنده هوموسیستئین پلاسما و سطوح S-آدنوزیل متیونین و S-آدنوزیل هوموسیستئین کبدی در بیماری کلتستاز کبدی و سیروز صفراوی در آنها باشد وجود ندارد.

بنابراین از اهداف مهم این مطالعه بررسی سطح پلاسمایی هوموسیستئین در بیماری کلتستاز می باشد که به طور تجربی بیماری فوق در موشها ایجاد گردید. علاوه بر آن، یکی دیگر از اهداف این مطالعه بررسی تأثیر هوموسیستئین بر ترشح نیتریک اکساید در بیماری کلتستاز می باشد که سعی گردید، رابطه بین این اسیدآمین و موانع عملکردی نیتریک اکساید را تا حدودی روشن سازد. از آنجائیکه غلظت این اسیدآمین به راحتی با انجام اقدامات تغذیه ای قابل کنترل می باشد، لذا گمان می رود با مشخص شدن تغییرات موجود در غلظت هوموسیستئین پلاسمایی بتوان اقدامات بعدی را در جهت کنترل عوارض ناشی از تغییرات غلظت پلاسمایی ایجاد شده به عمل آورد.

### روش کار:

**حجم نمونه:** در این بررسی جمعاً از ۱۵۰ عدد موش صحرایی نر نژاد Sprague-Dawley به وزن تقریبی ۲۰±۲۰۰ گرم استفاده گردید. در گروههای آزمایشی مورد نظر شامل گروه کنترل، SHAM و گروه تحت عمل جراحی بستن مجرای صفراوی (BDL) هر کدام بین ۱۲-۱۰ عدد موش با مشخصات فوق استفاده شد. تعدادی از موشها نیز در حین انجام عمل جراحی و بعد از آن تلف شدند که از نمونه ها حذف گردیدند. حیوانات در دمای ۱°C ± ۲۳ و نور مناسب ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و جیره غذایی و آب یکسان تا پایان آزمایش نگهداری شدند.

روش نمونه گیری و تقسیم حیوانات به طور تصادفی انجام گرفت (Simple Random Sampling) و از هر حیوان در هر گروه فقط یک بار استفاده گردید. داده های هر کدام از گروههای آزمایشی ثبت و نتایج حاصله از آنها با یکدیگر مقایسه گردید.

**روش انجام کار:** برای انجام این مطالعه حیوانات آزمایشگاهی در ۳ گروه کنترل، گروه SHAM و گروه بستن مجرای صفراوی (BDL) تقسیم شدند و مطالعات

Hi Chrom c18 (250 x 4.6mm) و قطر ذرات 5 $\mu$  بوده است (۱۶).

اندازه گیری متیونین نیز پس از دپروتئینه شدن به وسیله سولفوسالیسیلیک اسید و توسط دستگاه-HPLC (Fluorescence detector, Knauer RF-10AXL) UV صورت پذیرفت. برای جداسازی SAM و SAH، بافت کبد نمونه های جمع آوری شده را ابتدا با همزن مخصوص خرد کرده و سپس کاملا هموژنیزه گردیدند. بعد در ۴ حجم از ماده HClO<sub>4</sub> با غلظت 0.4 M قرار داده شدند. سپس عمل سانتریفیوژ برای مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت 10000 g صورت گرفت. اندازه گیری SAM و SAH توسط دستگاه HPLC و با استفاده از اشعه مافوق بنفش به طور همزمان از نمونه ها ی کبد هموژنیزه شده به عمل آمد. پس از اندازه گیری مقادیر SAM و SAH جهت کاهش خطا و همچنین ارزیابی صحیح تر داده ها، نسبت این دو پارامتر به یکدیگر به دست آورده شد (SAM/SAH ratio). جداسازی ترکیبات فوق الذکر با استفاده از فاز معکوس ستون c18 و در شرایط فاز متحرک توسط ماده NH<sub>4</sub> H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> با غلظت 40m M و ماده ملح نمکی ۱- هپتان سولفوریک اسید و با استفاده از متانول ۱۸٪ (حجم به حجم) و با pH = 3 انجام شد. پروتئین توتال با استفاده از روش ارزیابی پروتئین که توسط Lowry ارائه شده است و در حالیکه به عنوان استاندارد از آلبومین سرم گاوی استفاده شده است مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۱). تمامی اندازه گیری های به عمل آمده به صورت نانو مول در میلی گرم گزارش گردیده است تا بتوان براحتی آنها را در مقیاس میلی گرم پروتئین به ازاء هر گرم بافت کبدی تغییر داد.

در مدل مورد بررسی در هفته اول و دوم کلاستاز بدون افزایش فشار خون سرخرگ باب (without portal hypertension) وجود داشت و با گذشت زمان، یعنی در هفته چهارم، سیروز ثانویه صفراوی در حیوانات دیده شد. علاوه بر این portal hypertension هم ایجاد گردید.

ارزیابی نیتریک اکساید: نیتریک اکساید (NO) به وسیله متابولیت های نهائی خود یعنی نیتريت و نترات طبق روش Miranda سنجیده شد (۲۲). جهت اندازه گیری نیتریک اکساید، پلاسمای جمع آوری شده از نمونه های خون حاوی EDTA استفاده شد. پس از جداسازی پلاسمای

گروه کنترل: در این گروه حیوانات، بدون انجام عمل جراحی، داروها را دریافت کردند و آزمایشات لازم روی آنها به انجام رسید.

بررسی حیوانات پس از انجام آزمایشات: بعد از گذشت ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز پس از شروع آزمایشات حیوانات هر سه گروه جهت ارزیابی و مشاهده نتایج بدست آمده مورد بررسی قرار گرفتند. طریقه بررسی موشها بعد از کلاستاز به قرار ذیل بود. ابتدا موشهای هر گروه را در موعد مقرر یعنی رسیدن به زمان ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز پس از شروع عملیات، توسط اتر بیهوش کرده و سپس برشی توسط قیچی در وسط قفسه سینه داده شد و بعد از ظاهر شدن قلب حیوان، توسط دو سرنگ هیپارینه و حاوی ماده ضد انعقاد EDTA مستقیماً از داخل قلب خونگیری به عمل آمد. در هر بار خونگیری در هر گروه بین ۱۲-۱۰ عدد موش در هر بار مورد استفاده قرار گرفتند.

همچنین جهت ارزیابی میزان متیونین به موشهای هر گروه دو ساعت قبل از خونگیری از قلب آنها و به روش داخل صفاقی متیونین در دوزهای متفاوت 40 mg/kg و 100 mg/kg تزریق گردید. بعد از دو ساعت حیوانات مطابق روش فوق بیهوش گردیدند و از قلب آنها خونگیری به عمل آمد و متیونین آن جهت اندازه گیری در آزمایشگاه بررسی گردید.

نمونه کبدی از حیوانات نیز جهت بررسی S- آدنوزین متیونین (SAM) و S- آدنوزین هوموسیستئین (SAH) جدا گردیده و به سرعت در نیتروژن مایع (-70°C) فریز گردید. خونهای جمع آوری شده از هر کدام از گروهها توسط سانتریفیوژ و با سرعت 3000 rpm برای مدت ۲۰ دقیقه عمل جداسازی پلاسمای صورت پذیرفت. بلافاصله پلاسمای جدا شده نمونه ها توسط قرار گیری در نیتروژن مایع و با برودت -70°C فریز گردید.

آنزیم های کبدی به وسیله کیت های مخصوص خریداری شده از شرکت زیست شیمی مورد اندازه گیری قرار گرفت. روش انجام آزمایش نیز در این مورد به صورت روش اسپکتروفتومتری بود.

اندازه گیری میزان هوموسیستئین و سیستئین بر اساس روشی که توسط های لند و همکاران ارائه شده است انجام پذیرفت (۲۰). این آزمایش توسط دستگاه HPLC (Multiple wavelength variable, Cecil CE 1200) و با تعیین فلورسانس انجام شد و ستون بکار رفته از نوع

Post Hoc Test استفاده شد. در این بررسی  $P < 0.05$  به عنوان تفاوت معنی داری در نظر گرفته شده است. نتایج به صورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  نمایش داده شده است. برای بررسیهای آماری از نرم افزار SPSS و برای رسم نمودارها از نرم افزار Sigmaplot استفاده شد.

### نتایج:

معمولاً یک تا دو روز پس از انجام عمل BDL، موشهای این گروه علائم کلستاز را که بیشتر شامل وجود زردی در ادرار و تغییر رنگ گوش های آنها بود نشان دادند. بیلی روبین پلاسما و آنزیم های کبدی در موشهای BDL نسبت به گروههای کنترل و شاهد افزایش معنی داری را نشان دادند (جدول ۱).

جدول ۱: تغییرات ایجاد شده در آنزیم های کبدی و بیلی روبین پلاسما در زمان انجام مطالعه روی موشها. (ALT) آلانین آمینو ترانسفراز، (AP) آلکالین فسفاتاز ( $\gamma$ -GT) گاما گلوتامین ترانس پپتیداز و (Bili) بیلی روبین توتال

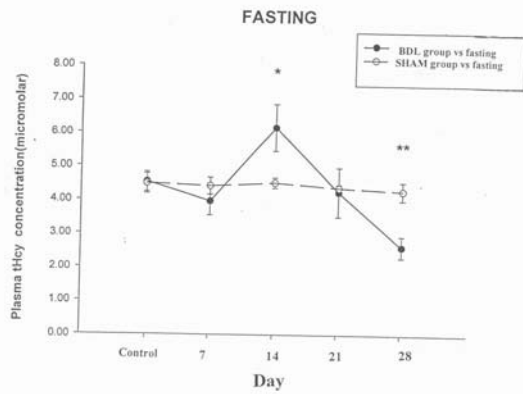
	week	SHAM	BDL
ALT (U/L)	1 <sup>st</sup> week	50 ± 10	153 ± 23
	2 <sup>nd</sup> week	43 ± 9	133 ± 23
	3 <sup>rd</sup> week	27 ± 9	84 ± 42
	4 <sup>th</sup> week	25 ± 6	87 ± 28
AP (U/L)	1 <sup>st</sup> week	488 ± 39	889 ± 93
	2 <sup>nd</sup> week	460 ± 48	1242 ± 140
	3 <sup>rd</sup> week	378 ± 44	710 ± 120
	4 <sup>th</sup> week	268 ± 51	638 ± 245
GT (U/L)	1 <sup>st</sup> week	35.2 ± 0.6	10.1 ± 0.3
	2 <sup>nd</sup> week	4.2 ± 4.0	1242 ± 2.3
	3 <sup>rd</sup> week	6.8 ± 5.3	29.8 ± 8.3
	4 <sup>th</sup> week	6.0 ± 2.9	30.0 ± 8.3
Bili (mg/dl)	1 <sup>st</sup> week	6.2 ± 3.0	62.8 ± 13.4
	2 <sup>nd</sup> week	5.8 ± 2.0	70.1 ± 18.5
	3 <sup>rd</sup> week	10.1 ± 4.0	82.9 ± 33.8
	4 <sup>th</sup> week	7.5 ± 3.1	85.1 ± 32.1

در موشهای گروه BDL، مصرف غذا کاهش پیدا کرد و به طور مستقیم کاهش وزن نیز در حیوانات دیده شد، اما این نقص به آرامی و بعد از چند هفته دوباره به حالت اول باز گشت. در موشهای گروه BDL، پس از انجام عمل جراحی، افزایش قابل توجهی در مقدار هوموسیستین مشاهده گردید. بالاترین میزان هوموسیستین در این گروه از موشها در روز ۱۴ دیده شد (نمودار ۱).

توسط سانتریفوژ، پلاسما مورد نظر در اولین مرحله با استفاده از اتانول و با نسبت ۱ به ۲ دپروتئینه گردید. در این روش پس از استفاده از اتانول با نسبت ذکر شده پلاسما مورد نظر با سرعت ۱۰۰۰۰g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس مایع بالای لوله (Supernatant) جمع آوری گردید. قبل از انجام آزمایشات ابتدا از داروی وانادیوم کلراید III ( $\text{VCl}_3$ ) جهت احیای نترات ( $\text{NO}_3^-$ ) به نیتريت ( $\text{NO}_2^-$ )، در پلاسما جمع آوری شده استفاده شد. ترکیب وانادیوم کلراید III را که قبلاً آنرا به صورت غلظت 400 mg در 50 میلی لیتر اسیدکلریدریک یک مولار تهیه شده بود، بر روی نمونه های پلاسما ریخته تا عمل احیا نترات صورت بگیرد، سپس محلول بدست آمده توسط فیلتر 0.45g، صاف گردید (چون محلول  $\text{VCl}_3$  بصورت Super saturated بکار رفت طبق روش کار فیلتر شده است). جهت انجام آزمایشات روی پلاسما فیلتره شده به ترتیب زیر عمل شد. ابتدا ترکیبی از Griess Reagent که در بر گیرنده 2% -Sulfanilamid (دراسیدکلریدریک) و 0.1% Naphtylethilendiamid dihydrochloride (در آب) به نسبت ۱ به ۱ بود را با هم مخلوط کرده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مورد آزمایش به ظرف حاوی مخلوط فوق اضافه شد. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیب  $\text{VCl}_3$  و ۱۰۰ میکرولیتر Griess به آن اضافه گردید. بعداً نمونه های آماده شده به مدت ۴۵ دقیقه و در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار داده شد. جهت استاندارد کردن نیز از استاندارد های نترات سدیم با غلظت های صفر تا ۲۰۰ میکرو مولار استفاده شد. نمونه ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردیدند.

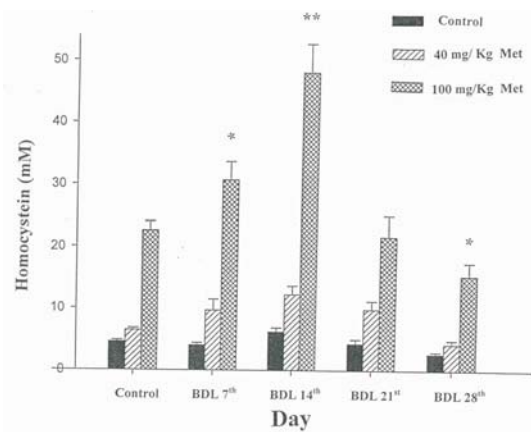
بیلیروبین پلاسما نیز به عنوان مارکر سرمی جهت نشان دادن وقوع کلستاز و آنزیمهای کبدی به منظور نشان دهنده های آسیب سلولهای کبدی مورد ارزیابی قرار گرفت. اندازه گیری بیلیروبین و آنزیم های کبدی توسط کیتهای تجارتي شرکت زیست شیمی انجام شد که بر مبنای روش کالوریمتریک وبا استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتریک (Pharmacia Novaspec II) و Single beam این عمل صورت گرفت.

روش های بررسی آماری: برای بررسی آماری داده های بدست آمده از روش Universal Analysis of Variance (آنوا دو طرفه) و برای بررسی نقطه به نقطه زمان ها از



نمودار ۲: سطح پلاسمائی هوموسیستئین در موشهای گروه SHAM و BDL در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از ایجاد کلستاز. مقادیر محاسبه شده  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  را نشان می دهد. \* بیانگر اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) و \*\* بیانگر اختلاف معنی دار ( $P < 0.01$ ) می باشد.

سپس کاهش در مقدار آن ایجاد شد. این کاهش نسبت به گروههای SHAM و کنترل در روز ۲۸ دارای تفاوت معنی داری نبود. بطوریکه در گروه گرسنه نگه داشته شده و با تجویز 40-100 mg/kg متیونین به صورت یک بار مقادیر حاصله عبارت بودند از: در گروه کنترل و  $4.53 \pm 0.98 \mu\text{M}$  و در گروه BDL  $8.01 \pm 0.69 \mu\text{M}$  در روز ۲۸ (جدول ۲، نمودار ۲).



نمودار ۱: سطح پلاسمائی هوموسیستئین در موشهای گروه کنترل و BDL به ترتیب در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ و با تجویز دو ساعت قبل متیونین به مقادیر ۴۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg بعد از ۲۰-۱۶ ساعت گرسنگی. علامت \* بیانگر اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) و علامت \*\* بیانگر اختلاف معنی دار ( $P < 0.01$ ) بین گروههای آزمایشی می باشد.

نتایج حاصله با  $P < 0.01$  با یکدیگر دارای تفاوت معنی داری بودند. تفاوت در میانگین غلظتهای هوموسیستئین در زمانیکه 100 mg/kg متیونین تجویز شد در هفته اول در گروه کنترل برابر بود با  $22.51 \pm 4.6 \mu\text{M}$  و در گروه BDL  $34.36 \pm 10.2 \mu\text{M}$  پس از انجام BDL. این نتایج با  $P < 0.01$  با یکدیگر دارای اختلاف معنی داری بودند. در عین حال هیچگونه اختلاف معنی داری بین گروه کنترل با گروه SHAM در این رابطه دیده نشد. اسیدهای آمینه حاوی سولفور، سیستئین و متیونین در حیوانات مبتلا به سیروز کبدی نسبت به گروه SHAM افزایش نشان داده است. این موضوع در جدول ۲ نشان داده شده است. در این بررسی اختلافات حاصله با  $P < 0.05$  با یکدیگر دارای تفاوت معنی داری بودند که در هفته دوم و سوم بعد از شروع کلستاز دیده شد. همچنین این امر در گروههای کنترل و SHAM فاقد هر گونه اختلافات معنی داری بوده است.

جدول ۲: غلظت پلاسمائی متیونین، سیستئین و

هوموسیستئین در موشهای مبتلا به کلستاز و کنترل. نتایج فوق بیانگر میانگین  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  در گروههای ۱۰-۱۲ عددی موشها بوده و علامت \* نشان دهنده اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) برای هر کدام از گروهها نسبت به گروه کنترل می باشند.

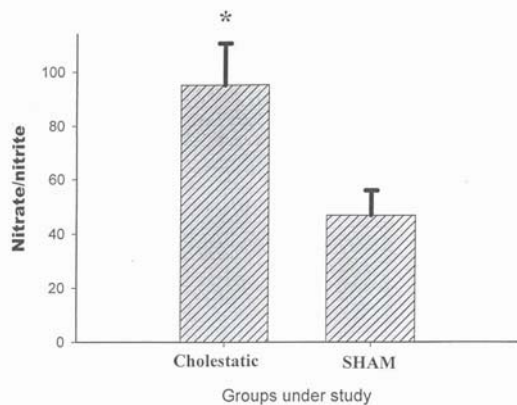
مقدار S-آدنوزین هوموسیستئین (SAH) پس از انجام BDL در موشها افزایش نشان داده است که نسبت به گروههای SHAM دیده شده است. این پدیده که در مدت زمان بین اولین و دومین هفته ایجاد شده است. به هر حال این افزایش در خلال هفته سوم و چهارم پس از شروع آزمایش به آرامی و با شیب ملایمی کاهش نشان داد (جدول ۳).

Group	Methionie $\mu\text{mol/L}$	Cysteine $\mu\text{mol/L}$	Homocystein $\mu\text{mol/L}$
Control	41.09±4.46	12.90±1.95	4.53±0.29
BDL (1 <sup>st</sup> week)	56.20±7.79	17.77±3.05	5.59±0.51
BDL (2 <sup>nd</sup> week)	55.08±5.91	25.09±2.47*	8.01±0.69*
BDL (3 <sup>rd</sup> week)	68.98±5.68*	27.58±3.54*	4.23±0.72
BDL (4 <sup>th</sup> week)	70.33±6.01*	24.71±2.84*	3.89±0.37

در ارتباط با این موضوع هیچگونه تفاوت معنی داری در بین گروههای کنترل و SHAM دیده نشد.

در حیوانات کلستاتیک غلظتهای نیتريت و نیترات مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصله در این قسمت نشان دهنده این بود که حیوانات کلستاتیک دارای غلظت های افزایش یابنده نیتريك اكساید بودند که این افزایش از هفته اول بعد از کلستاز مشاهده گردید.

میانگین نسبت نیترات/ نیتريت در موشهای SHAM برابر 8±45 بود. درحالیکه این غلظت در حیوانات کلستاتیک در حدود 9.1±98 گزارش گردید. با این اوصاف اختلاف فیما بین آنها با  $P < 0.05$  معنی دار بود ( نمودار ۴).



نمودار ۴: بررسی سطح پلاسمایی نسبت نیترات / نیتريت در دو گروه موشهای SHAM و کلستاتیک پس از انجام آزمایشات. علامت \* بیانگر اختلاف معنی دار با  $P < 0.05$  بین گروههای آزمایشی می باشد.

### بحث:

سطح ابتدایی و پایه ای غلظت های متیونین و هوموسیستئین و همچنین بررسی این غلظت ها پس از انجام آزمایشات مورد نظر که توسط این بررسی بدست آمده است با نتایج حاصله از بیماری سیروز که قبلا از طریق ایجاد مدل های دیگری در حیوانات رخ داده است کمی تفاوت داشت. برای مثال Mato و همکارانش نشان دادند که افزایش غلظت هوموسیستئین در هفته ۹ در حیواناتی که با  $CCl_4$  درمان شده بودند دیده می شود (۲۳). اما چرا در مطالعات به عمل آمده توسط ما این افزایش در هفته نخست و دوم ایجاد گردید و با شیب ملایمی به طرف سطح نرمال اولیه برگشت نمود. اگر چه تفسیر دقیق این نتایج نیازمند آزمایشات تکمیل کننده بعدی

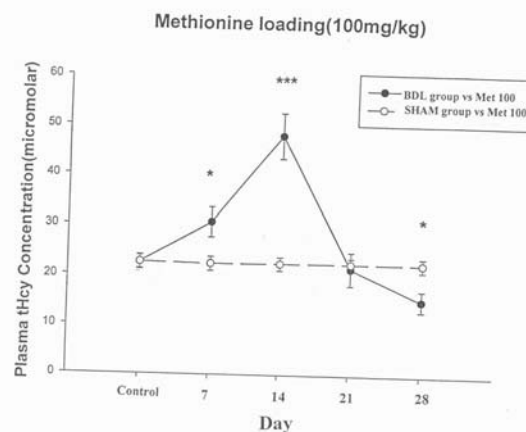
جدول ۳: غلظت کبدی (SAM) - S - آدنوزین - متیونین و (SAH) - S - آدنوزین هوموسیستئین و نسبت آنان در موشهای کلستاتیک و کنترل. نتایج فوق بیانگر  $mean \pm SEM$  در گروههای ۱۲-۱۰ عددی موشها می باشد و علامت \* نشان دهنده اختلاف معنی دار با  $P < 0.01$  برای هر کدام از گروهها نسبت به گروه کنترل می باشد.

Group	SAM nmol/mg protein	SAH nmol/mg protein	SAM/SAH
Control	0.50±0.03	0.13±0.01	3.88±0.28
BDL(1 <sup>st</sup> week)	0.46±0.24	0.22±0.01*	2.17±0.20*
BDL(2 <sup>nd</sup> week)	0.41±0.29	0.25±0.02*	1.71±0.12*
BDL(3 <sup>rd</sup> week)	0.30±0.02*	0.18±0.01	1.80±0.19*
BDL(4 <sup>th</sup> week)	0.25±0.16*	0.18±0.01	1.31±0.11*

این پدیده در ارتباط با کاهش سطح سرمی Hcy می باشد. نکته قابل توجه اینکه آنزیم هیدرولاز (SAH-hydrolase) یک آنزیمی است که به طور عکس عمل کرده بنابراین باعث تغییر در هر کدام از ترکیبات هوموسیستئین یا S-آدنوزین هوموسیستئین به دیگری شود.

سطوح تقلیل پیدا کرده مقدار SAM در هفته سوم و چهارم در این مطالعه مشاهده شده است ( $P < 0.01$ ).

نسبت SAM/SAH در گروه کنترل  $3.88 \pm 0.28$  mmol/mg بود. این نسبت به میزان ۴۵٪ در هفته اول حیوانات کلستاتیک کاهش نشان داد و به طور معنی داری ( $P < 0.001$ ) تا پایان آزمایش در حد پایین باقی ماند (نمودار ۳).



نمودار ۳: سطح پلاسمایی هوموسیستئین در موشهای گروه SHAM و BDL پس از تجویز ۱۰۰ mg/kg میتونین در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از ایجاد کلستاز در حیوانات تحت درمان. علامت \* بیانگر اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) و \*\*\* بیانگر اختلاف معنی دار ( $P < 0.001$ ) می باشد.

متوقف و ترمیم بافتی صورت پذیرفته است بطوریکه هر کدام از آنها واکنشهای متیلاسیون اختصاصی را شتاب بخشیده و تولید SAH و آزاد شدن هوموسیستئین را موجب گردیده اند (۳۱). تغییرات مشاهده شده در هوموسیستئین پلاسمایی می تواند به طور متفاوتی بیان شود به طوریکه مکانیسمهای درگیر در ایجاد آن می تواند به طور مجزا مورد بررسی قرار گیرد. لذا پیشنهاد می شود که جهت بررسی دقیقتر این مکانیسم ها پژوهشهای کاملتری که در بر گیرنده فعالیتهای آنزیمی یا سایر مدیاتورهایی درگیر در چرخه مربوطه باشد انجام شود.

SAM نه تنها دهنده اصلی متیل می باشد بلکه به عنوان یک پیام داخل سلولی بوده که فعالیت اساسی کبدی از قبیل رشد سلولهای کبدی، تفکیک سلولی و حساسیت کبدی به آسیب ها را کنترل می کند. بنابراین کاهش نسبت SAM/SAH به عنوان یکی از نسبت های متیلاسیون داخل سلولی در بیماری کلستاز کبدی، می تواند بسیاری از فرایندها را تحت تاثیر قرار دهد.

یافته های این مطالعه از جایگزین کردن تکمیلی سطح SAM در بیماران کبدی حمایت می کند. این موضوع در مطالعه ای که در گروهی از بیماران با انسداد مجاری صفراوی صورت گرفت نیز نشان داده شده است (۳۲).

بیماران و حیوانات مبتلا به یرقان انسدادی مستعد ابتلا به بی اشتهایی هستند. این علامت در موشهای درمان شده با CCl<sub>4</sub> هم مشاهده شده است (۳۲،۳۳). این پدیده می تواند بر میزان متیونین دریافت شده توسط غذا تاثیر بگذارد بطوری که در حیوانات گروه BDL این مطالعه تجمع متیونین در داخل پلاسما مشاهده گردید. بنابراین، این یافته نباید سایر شواهد غیر طبیعی ایجاد شده در بیماران کبدی را مورد غفلت قرار دهد.

در این بررسی، ما تلاش کردیم تا نشان دهیم بعضی از تغییرات متابولیکی در سندرم کلستاز و سیروز ایجاد شده متعاقب آن، به طور فزاینده ای بالا خواهد رفت که می تواند این موضوع برای مطالعات بعدی در مورد بیماری کلستاز بویژه در دوران کودکی یا آترزی صفراوی انسانی قابل توجه باشد.

#### منابع:

1. Bergasa NV, Mehlman JK, Jones EA. Pruritis and fatigue in primary biliary cirrhosis. *Bailliere's Clin Gastroenterol* 2000;14:634.

است، اما در عین حال، بر اساس اطلاعات به دست آمده در موشهای BDL، می بایست توجه نمائیم که مدل حیوانی مورد آزمایش همانی نبودند که برای ایجاد سیروز توسط CCl<sub>4</sub> بکار گرفته شدند. هر چند هر دو این مدلها سرانجام سیروز را در کبد حیوانات ایجاد کردند. لازم است اشاره شود که ناهنجاریهای متابولیکی بعدی شامل تغییرات اسیدهای آمینه و لیپید های پلاسما در هر دو نوع مدل مشاهده شدند (۲۴). در سیروز ایجاد شده توسط CCl<sub>4</sub> در مقایسه با BDL جریان صفرا متوقف نشده است (۲۵) و به نظر می رسد الگوی متابولیکی بافتی این پدیده در مقایسه با آنچه که در سیروز حاصل از انسداد جریان صفرا دیده می شود متفاوت باشد (۲۶). اختلافی که بین این دو مدل از سیروز وجود دارد ممکن است تشریح کننده تغییرات و تفاوت های حاصل شده در نتایج آنها باشد.

به هر حال نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان دهنده این است که در کبد سطوح غلظت SAM، SAH، متیونین و هوموسیستئین پلاسما و علاوه بر اینها متابولیت های نیتریک اکساید بعد از ایجاد BDL تغییرات قابل توجهی را پیدا می کند. نسبت SAM/SAH در روز هفتم سقوط می کند و سطوح پلاسمایی هوموسیستئین و متیونین در روزهای ۱۴ و ۲۱ بعد از ایجاد کلستاز افزایش می یابد. تجمع متیونین در پلاسما در این مطالعات ایجاد شده در حالیکه SAM کاهش پیدا کرده در کبد، بیان کننده توقف احتمالی سطح فعالیت آنزیم متیونین آدنوزین ترانسفراز باشد. اخیرا نشان داده شده است که نیتریک اکساید موجب غیر فعال شدن آنزیم متیونین آدنوزین ترانسفراز کبدی از طریق S- نیتروزیلایسیون در موش صحرائی و در شرایط *In vitro* می گردد (۲۷).

افزایش میزان متابولیت های NO که در آزمایشات ما دیده شد این نتایج را تأیید می کند. نقش محوری که برای SAM و SAH در تنظیم متابولیسم متیونین - هوموسیستئین کبدی در نظر گرفته می شود توسط Finkelstein و همکاران گزارش شده است (۲۸،۲۹).

احیا شدن SAM باعث تشدید دوباره متیلاسیون هوموسیستئین می گردد و این پدیده موجب غیر فعال شدن ترانس سولفوراسیون بعدی خواهد شد (۲۹،۳۰).

افزایش هوموسیستئین پلاسما ۱۴ روز بعد از کلستاز همراه با افزایش سطح SAH کبدی، می تواند بیان کننده این واقعیت باشد که روندهای التهاب در کبد



2. Bergasa NV, Vergalla J, Swain MG. Hepatic concentration of proenkefalin – derived opioids are increased in a rat model of cholestasis. *Liver* 1996 Oct; 16(5): 298- 302.
3. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. Hyperhomocyst(e) inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr.* 1992; 12:279-98.
4. Szabo C. Role of poly (ADP-ribose) synthase activation in the suppression of cellular energetics in response to nitric oxide and peroxy nitrite. *Biochem Soc Trans* 1997; 25:919-924.
5. Garcia-Tevijano ER, Berasain C, Rodriguez JA, Corrales FJ, Arias R, Marthin-Duce A, et al. Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis. *Hypertension.* 2001 Nov; 38(5):1217-21.
6. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1709-1715.
7. Swain MG, Le T. Cholestasis in rats induces anhedonia and a loss of social interest. *Hepatology* 1998; 28:6.
8. Furchgott RF. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol Scand* 1990; 139:257-270.
9. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30:535-560.
10. Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: a systematic review. *Placenta* 1999; 20:519-29.
11. Carmel R, Jacobsen DW. *Homocysteine in health and disease.* Cambridge: Cambridge, 2001:501.
12. Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA. S-Adenosylmethionine synthesis: molecular mechanism and clinical Implication. *Pharmacol Ther* 1997; 73(3): 265-280.
13. Aleynik S, Lieber CS. Role of S-adenosylmethionine in hyperhomocysteinemia and in the treatment of alcoholic liver disease. *Nutrition* 2000; Nov-Dec; 16 (11-12) : 1104-8.
14. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 1: 228-236.
15. Stead LM, Brosnan ME, Brosnan JT. Characterization of homocysteine metabolism in the rat liver. *Biochem J* 2000 Sep; 350 Pt 3:685-92.
16. Bosy-Westphal A, Petersen S, Hinrichsen H, Czech N, Muller JA. Increased plasma homocysteine in liver cirrhosis. *Hepatology* 2001 May; 20(1) : 28-38.
17. Ferre N, Gomez F, Camps J, Simo JM, Murphy MM, Fernandez-Ballart J, et al. Plasma homocysteine concentration in patients with liver cirrhosis. *Clin Chem* 2002 Jan; 48(1):183-5.
18. Varela-Moreiras G, Alonso-Aperte E, Rubio M, Gasso M, Deulofeu R, Alvarez L, et al. Carbon tetrachloride-induced hepatic injury is associated with global DNA hypomethylation and homocysteinemia: effect of S-adenosylmethionine treatment. *Hepatology* 1995 Oct; 22(4 Pt 1): 1310-5.
19. Ferraz JGP, Wallace JL. Prostaglandins modulate the responsiveness of the gastric microcirculation to sodium nitroprusside in cirrhotic rats. *Hepatology* 1996; 23: 123-129.
20. Hyland K, Bottiglieri T. Measurement of total plasma and cerebrospinal fluid homocysteine by fluorescence following high-performance liquid chromatography and precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *J Chromatogr* 1992 Aug; 579(1):55-62.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
22. Miranda KM, Epsy MG, Wink DA. A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001; 5(1) 62-71.
23. Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA. S-Adenosylmethionine Synthesis:

- Molecular mechanism and clinical Implication . Pharmacol Ther 1997; 73(3): 265-280
24. Krahenbuhl S, Reichen J. Canalicular bile flow and bile salt secretion are maintained in rats with liver cirrhosis. further evidence for the intact cell hypothesis. J Hepatol 1988 Aug; 7(1):63-71.
25. Sokal EM, Mostin J, Buts JP. Liver metabolic zonation in rat biliary cirrhosis: distribution is reverse of that in toxic cirrhosis . Hepatology 1992 May; 15(5):904-8.
26. Ruiz F, Corrales FJ, Miqueo C, Mato JM. Nitric oxide inactivates rat hepatic methionine adenosyltransferase in vivo by S-nitrosylation. Hepatology 1998 Oct; 28(4):1051-7.
27. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. J Biol Chem 1984 Aug; 259(15):9508-13.
28. Finkelstein JD, Martin JJ. Inactivation of betaine-homocysteine methyltransferase by adenosylmethionine and adenosylethionine. Biochem Biophys Res Commun 1984 Jan;118(1): 14-9.
29. Finkelstein JD, Kyle WE, Martin JL, Pick AM. Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine. Biochem Biophys Res Commun 1975 Sep; 2,66(1):81-7.
30. Dudman NP. An alternative view of homocysteine . Lancet 1999 Dec; 354 (9195): 2072-4
31. Muriel P, Suarez OR, Gonzalez P, Zuniga L. Protective effect of S-adenosylmethionine on liver damage induced by biliary obstruction in rats: a histological, ultrastructural and biochemical approach. J Hepatol 1994 Jul; 21(1):95-102.
32. Okamoto T, Okabe S. Carbon tetrachloride treatment induces anorexia independently of hepatitis in rats. Int J Mol Med 2000 Aug; 6(2): 181-3.
33. Padillo FJ, Andicoberry B, Naranjo A, Mino G, Pera C, Sitges-Serra A. Anorexia and the effect of internal biliary drainage on food intake in patients with obstructive jaundice. J Am Coll Surg.2001 May; 192(5):584-90.