بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

خانم زهرا امامی رودبالی رشته بیوشیمی بالینی پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان « تعیین میزان فعالیت و بیان کمی آنزیم نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) در پلاکتهای بیماران قلبی – عروقی آنژیوگرافی شده » در تاریخ ۱۳۹۰/۴/۶ ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پـذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر سید علیرضا مصباح نمین	(استاد راهنمای اصلی)
دکتر مژگان راستی	(استاد راهنمای دوم)
دکتر صغری کرمی تهرانی	(استاد ناظر)
دکتر سعید قاسم زاده	(استاد ناظر)
دکتر محمد جواد رسایی	(نماینده تحصیلات تکمیلی)

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئیننامههای مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **زهرا امامی رودبالی** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۷** مقطع **کارشناسی‌ارشد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ ۱۳۹۰/۴/۱۴

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **بیوشیمی‌بالینی** است که در سال ۱۳۹۰ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر سید علیرضا مصباح نمین ، خانم دکتر مژگان راستی** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **زهرا امامی رودبالی** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

۱۳۹۰/۶/۱۴

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایـان نامه

دوره کـارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

تعیین میزان فعالیت و بیان کمی آنزیم نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) در پلاکت های بیماران قلبی-عروقی آنژیوگرافی شده

نگارش

زهرا امامی رودبالی

اساتید راهنما

دکتر سید علیرضا مصباح نمین

دکتر مژگان راستی

تابستان ۱۳۹۰

تقدیم به:

همسرعزیزم

که در تمام سختیها و مشکلات، هیچ گاه مرا تنها نگذاشت.

گرانبهاترین گوهرهای زندگیم،

پدر و مادرم، که زندگیم را مرهون تلاشها و زحمات بی پایانشان میدانم.

تشکروقدردانی:

بر خود لازم می دانم از زحمات اساتید راهنمای گرامی جناب آقای دکترسید علیرضا مصباح نمین وخانم دکتر مژگان راستی که همواره از راهنماییهای ایشان بهره مند بوده ام کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم.

همچنین تشکر می کنم از استاد عزیزجناب آقای دکتر کجوری و سرکار خانم مشایخی که با راهنمایی های بی دریغ خود مرا در انجام این پروژه یاری فرمودند.

مراتب سپاس و قدردانی خود را نسبت به کلیه استادان بزرگواری که در مدت تحصیل از محضر ایشان بسیار کسب فیض نمودم بویژه استادان گروه بیوشیمی بالینی را ابراز می دارم.

در پایان از همه دوستان و همکلاسی های عزیزم و سایر عزیزانی که در این مدت افتخار آشنایی با آنها را داشتم از جمله آقای راهوار،آقای جبه دار باشی نیز کمال تشکر را دارم.

چکیده

در میان مدیاتورهایی که توسط اندوتلیوم آزاد می شوند، نیتریک اکسید بسیار مهم می باشد. آنـزیم های مسئول سنتز نیتریک اکسید، نیتریک اکسید سنتازها هستند. تاکنون سه ایزوفرم اندوتلیالی، نـورونی و القایی ازاین آنزیم شناخته شده است. ایزوفرم اندوتلیالی این آنزیم عـلاوه بـر سـلول هـای انـدوتلیالی در پلاکت ها نیز بیان می شود و نقش مهمی در سیستم قلبی- عروقی ایفا می کنـد. نیتریـک اکـسید تولیـد شده ازاین ایزوفرم در کنترل فشار خون، ترومبوز و انبساط دیواره عروقی شرکت می کند. اختلال در تولید نیتریک اکسید ممکن است در بروز ترومبوتیک عروق شرکت کند.

هدف از این مطالعه بررسی رابطه غلظت نیتریک اکسید، بیان وفعالیت آنزیم eNOS با بیماری هـای قلبـی عروقی می باشد. از ۶۰ نفر مورد مطالعه،۲۰نفر بیمار قلبی- عروقی بوده کـه لختـه داشـتند،۲۰نفـر دارای چسبندگی عروق کمتر از ۷۰٪ بوده و ۲۰ نفر هم افرادی که مشکل قلبی عروقی نداشته و نرمال بودند.

اندازه گیری غلظت پلاسمایی NO بر اساس معرف گریس، فعالیت آنزیم بر اساس اسـپکتروفلوریمتر و بیان آنزیم در پلاکت ها بر اساس Real-Time PCR صورت گرفت.

نتایج نشان می دهند که غلظت NO پلاسمایی در بیماران دارای لخته (۰/۵۳ ±۰/۰۹µM) و بیماران دارای چسبندگی عروق (۱/۳۱ ±۰/۱۱µM) نسبت به افراد نرمال (۲/۶ ±۰/۱۰µM) کاهش یافته و تفاوت معنی داری میان آنها وجود دارد (Sig=0.000, P<0.05). همچنین فعالیت آنـزیم در بیمـاران دارای لختـه (۰/۶۸ ±۰/۰۱۳µM) وبیمـاران دارای چـسبندگی عـروق (۰/۸۵ ±۰/۰۱۷µM) نـسبت بـه افـراد نرمـال (۱/۲۹ ±۰/۰۱۹µM) کاهش یافته و بین آنها تفاوت معنی داری وجود دارد (Sig=0.000, P<0.05) .

بیان آنزیم نیز در افراد دارای گرفتگی عروق نسبت به افراد نرمال بـه میـزان ۱به ۵ برابـر و در افـراد دارای لخته، نسبت به افراد نرمال به میزان ۱به ۷۵ برابر کاهش یافته است .

آنالیز رگرسیون نشان داد که بیماری های قلبی با میزان NO، بیان وفعالیت آنـزیم eNOS در ارتبـاط است.

کلمات کلیدی : نیتریک اکسید سنتاز، قلبی-عروقی، پلاکت، ترومبوز، Real- Time PCR

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه ومروری بر مطالعات انجام شده..... ۱

۱-۱. مقدمه..... ۲

۱-۲. ساختار نیتریک اکسید سنتازها و چگونگی تنظیم آن ها..... ۵

۱-۳. تنظیم نیتریک اکسید سنتازها و چگونگی عملکرد آن ها..... ۶

۱-۴. تنظیم محل قرارگیری نیتریک اکسید سنتازها در سلول..... ۷

۱-۵. موقعیت کروموزومی ایزوفرم های نیتریک اکسید سنتازها..... ۸

۱-۶. نیتریک اکسید وخواص بیولوژیک آن..... ۸

۱-۶-۱. نقش نیتریک اکسید در سیستم قلبی-عروقی..... ۸

۱-۶-۲. بیماری عروق کرونر ۹

۱-۷. جزئیات بیشتر در نقش پلاکت ها در خون..... ۱۰

۱-۸. مسیر سنتز NO از L- آرژینین در پلاکت ها..... ۱۱

۱-۹. نحوه عملکرد نیتریک اکسید تولید شده از eNOS پلاکتی در مقایسه با نوع اندوتلیالی..... ۱۴

۱-۱۰. نقش NO مشتق شده از پلاکت در بیماری های قلبی –عروقی ۱۵

۱-۱۱. اهمیت تکنیک Real Time RT-PCR ۱۷

۱-۱۱-۱. روش های سنجش با Real Time PCR ۱۸

۱-۱۱-۲. آنالیز منحنی ذوب ۲۰

فصل دوم: مواد و روشها..... ۲۳

۲-۱. مواد و روشها..... ۲۴

۲-۱-۱. طرز تهیه محلول DEPC..... ۲۶
۲-۱-۲. طرز تهیه بافر انکوباسیون PBS..... ۲۶
۲-۱-۳. طرز تهیه EDTA (۰/۵ مولار)..... ۲۶
۲-۱-۴. طرز تهیه سیترات سدیم..... ۲۶
۲-۲. شرایط بیماران..... ۲۶
۲-۳. جداسازی پلاکت ها..... ۲۷
۲-۴. اندازه گیری NO تام به کمک معرف گریس ۲۸
۲-۵. تهیه استاندارد برای اندازه گیری نیتریک اکسید..... ۲۸
۲-۶. پروتکل اندازه گیری نیتریک اکسید..... ۲۹
۲-۷. اندازه گیری فعالیت آنزیم نیتریک اکسیدسنتاز ۲۹
۲-۸. روش جداسازی RNA توتال..... ۳۱
۲-۹. الکتروفورز RNA بر روی ژل جهت تعیین تمامیت RNA توتال ۳۲
۲-۱۰. تولید cDNA با استفاده از آنزیم نسخه بردار معکوس..... ۳۳
۲-۱۱. واکنش PCR جهت تکثیر cDNA مربوط به آنزیم eNOS..... ۳۴
۲-۱۲. رقیق کردن پرایمرها و ساختن محلول های کار..... ۳۵
۲-۱۳. روش انجام PCR..... ۳۶
۲-۱۴. تعیین برنامه دستگاه Thermal cycler..... ۳۷
۲-۱۴-۱. عوامل موثر در تعیین زمان بندی واکنش..... ۳۷
۲-۱۴-۲. طرز تهیه بافر TAE..... ۳۸
۲-۱۴-۳. محلول اتیدیوم بروماید..... ۳۸
۲-۱۵. الکتروفورز محصولات PCR..... ۳۸
۲-۱۶. Real-Time PCR..... ۳۹

۲-۱۶-۱. روشهای تعیین کمیت با Real-Time PCR ۳۹
۲-۱۶-۲. شرایط Real-Time PCR ۴۰
۲-۱۶-۳. چگونگی رسم یک منحنی استاندارد ۴۲
۲-۱۶-۴. محاسبه محصولات Real-Time PCR ۴۳

فصل سوم: نتایج و یافته ها ۴۵
۳-۱. نتایج مربوط به اندازه گیری غلظت NO ۴۶
۳-۲. نتایج مربوط به اندازه گیری فعالیت eNOS ۵۱
۳-۳. نتایج مربوط به استخراج RNA از پلاکت ها ۵۶
۳-۴. نتایج مربوط به انجام Real-time PCR ۵۷

فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها ۷۰
۴-۱. بحث و نتیجه گیری ۷۱
۴-۲. پیشنهادها ۷۷

فهرست منابع ۷۹
چکیده انگلیسی ۸۳

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱. منحنی تکثیردرReal-Time PCR ۱۹

شکل ۱-۲. مفهوم Threshold و Ct value ۲۰

شکل ۱-۳. منحنی ذوب..... ۲۱

شکل ۳-۱. منحنی استاندارد نیتریک اکسید..... ۴۶

شکل ۳-۲. منحنی مقایسه میانگین غلظت نیتریک اکسید در سه گروه مورد مطالعه.. ..... ۵۰

شکل ۳-۳. منحنی مقایسه میانگین فعالیت آنزیم eNOS در هر سه گروه..... ۵۵

شکل ۳-۴. الکتروفورز RNA بر روی ژل آگارز..... ۵۶

شکل ۳-۵. منحنی استاندارد (رقت 1/5) برای ژن eNOS ۵۷

شکل ۳-۶. منحنی تکثیر ژن eNOS در نمونه های استاندارد ۵۷

شکل ۳-۷. منحنی ذوب Real-time PCR مربوط به ژن eNOS در نمونه های استاندارد..... ۵۸

شکل ۳-۸. منحنی تکثیر ژن eNOS در نمونه های افـراد نرمـال ۵۸

شکل ۳-۹. منحنی تکثیر ژن eNOS در نمونه های بیماران دارای چسبندگی عروق کمتر از ۷۰٪..... ۵۹

شکل ۳-۱۰. منحنی تکثیر ژن eNOS در نمونه های بیماران دارای لخته..... ۵۹

شکل ۳-۱۱. مقایسه منحنی تکثیر ژن eNOS در هر سه گروه..... ۶۰

شکل ۳-۱۲. منحنی ذوب محصولات Real-time PCR مربوط به ژن eNOS..... ۶۰

شکل ۳- ۱۳. منحنی استاندارد (رقت 1/5) برای ژن بتا-اکتین..... ۶۱

شکل ۳-۱۴. منحنی تکثیر ژن بتا – اکتین در نمونه های استاندارد..... ۶۱

شـکل۳-۱۵. منحنـی ذوب محـصولات Real-time PCR مربـوط بـه ژن بتـا -اکتـین در نمونـه هـای استاندارد..... ۶۲

شکل ۳-۱۶. منحنی تکثیرمربوط به ژن بتا -اکتین در همه نمونـه هـا.....۶۲
شکل ۳-۱۷. منحنی ذوب محصولات Real-time PCR مربوط به ژن بتا- اکتـین.....۶۳
شکل ۳-۱۸. الکتروفورز Real-time PCR Products مربوط به ژن آنزیم نیتریک اکسید سنتاز.....۶۳
شکل ۳-۱۹. الکتروفورز Real-time PCR Products مربوط به ژن بتا-اکتین.....۶۴

فهرست جداول

جدول ۲-۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده.....۳۵

جدول۲-۲. غلظت عناصر واکنش PCR جهت ژن نیتریک اکسید سنتاز (eNOS) ۳۶

جدول ۲-۳. غلظت عناصر واکنش PCR جهت ژن بتا -اکتین.....۳۶

جدول ۲-۴. زمان بندی دستگاه PCRبرای ژن بتا-اکتین واندوتلیال نیتریک اکسید سنتاز.....۳۸

جدول ۲-۵. غلظت عناصر واکنش Real- Time PCR ژن نیتریک اکسید سنتاز و بتا اکتین.....۴۲

جدول ۲-۶. پروتکل مناسب جهت Real –Time PCR برای دو ژن بتا- اکتین و نیتریک اکسید سنتاز.....۴۲

جدول ۳-۱. غلظت نیتریک اکسید در پلاسمای خون افراد نرمال.....۴۷

جدول ۳-۲. غلظت نیتریک اکسید در پلاسمای خون بیماران دارای گرفتگی عروق کمتر از ۷۰درصد....۴۸

جدول ۳-۳. غلظت نیتریک اکسید در پلاسمای خون بیماران دارای لخته.....۴۹

جدول ۳-۴. مقایسه میانگین غلظت نیتریک اکسید در سه گروه.....۵۰

جدول ۳-۵. میزان فعالیت آنزیم اندوتلیال نیتریک اکسید سنتاز در پلاکت های افراد نرمال.....۵۲

جدول ۳-۶. میزان فعالیت آنزیم eNOS در پلاکت های بیماران دارای گرفتگی عروق کمتر از ۷۰٪.....۵۳

جدول ۳-۷. میزان فعالیت آنزیم eNOS در بیمارن دارای لخته.....۵۴

جدول ۳-۸. مقایسه فعالیت در هر سه گروه.....۵۵

جدول ۳-۹. نتایج بیان ژن آنزیم نیتریک اکسید سنتاز در مقایسه با ژن بتا-اکتین در افراد نرمال.....۶۵

جدول ۳-۱۰. نتایج میزان بیان ژن آنزیم نیتریک اکسید سنتاز در مقایسه با ژن بتا-اکتین در بیماران قلبی-عروقی دارای لخته.....۶۶

جدول ۳-۱۱. نتایج میزان بیان ژن آنزیم نیتریک اکسید سنتاز در مقایسه با ژن بتا-اکتین در بیماران قلبی-عروقی دارای گرفتگی عروقی کمتر از ۷۰درصد.....۶۷

جدول ۳-۱۲. مقایسه Fold در گروه های مختلف.....۶۸

جدول ۳-۱۳. مقایسه تغییرات میانگین نیتریک اکسید،فعالیت آنزیم eNOS وتغییرات بیان ژن eNOS در سه گروه.....۶۸
جدول۳-۱۴. بررس رابطه همبستگی با استفاده از آزمون پیرسون.....۶۹

فصل اول

مقدمه و
مروری بر مطالعات
انجام شده

۱-۱. مقدمه

نیتریک اکسید سنتازها[1] ؛ دسته ای از آنزیم های اکسیدو ردوکتاز هستند که از نظر ساختار و تنظیم بسیار پیچیده هستند. این آنزیم ها طی یک واکنش پیچیده اکسیداسیون باعث تولید نیتریک اکسید (NO) از L- آرژینین و O_2 می شوند [۱،۲و۳].

NO گازی بیرنگ با نیمه عمری حدود ۶ تا ۱۰ ثانیه می باشد و معمولاً بصورت رادیکال آزاد وجود دارد. این مولکول نقش های کلیدی بسیاری را در سیستم قلبی- عروقی ایفاء می کند [۴].

NO در سال ۱۷۷۲به وسیله Jose ph. priestly کشف شد و در سال۱۹۷۷دکتر Murad Feriod متوجه شد که NO می تواند باعث فعال سازی گوانیلیل سیکلاز و افزایش سطح cGMP و نهایتا" انبساط عروق شود.

در سال ۱۹۸۰، دکتر Robert F.Furchgott که اثر داروها بر روی انبساط عروق را بررسی می کرد متوجه شد که سلول های اندوتلیال در پاسخ به استیل کولین ماده ای به نام (EDRF)[2] تولید می کنند که این ماده به سلول های عضله صاف مجاور اندوتلیوم نفوذ کرده و آرامش آنها را موجب می شود[۵].

در سال ۱۹۸۶ دانشمند دیگری به نام دکتر Louisigrro متوجه شد که NO همان EDRF می باشد.

NO علاوه بر نقشی که بعنوان EDRF دارد، نقش های بسیار مهم بیولوژیکی را در سیستم قلب

1 .Nitric Oxide Synthase (NOS)

2. Endothelial–Derived Relaxing Factor.

و عروق ایفاء می کند [۵].

NO به دو صورت آنزیمی و غیر آنزیمی تولید می شود که تولید آنزیمی آن در شرایط فیزیولوژیکی از اهمیت بیشتری برخوردار است.

تولید آنزیمی NO که توسط آنزیم های نیتریک اکسید سنتازها صورت می گیرد در زیر مورد بررسی قرار می گیرد.

نیتریک اکسید سنتازها که عامل اصلی تولید NO هستند، اولین بار در سلول های اندوتلیال رگ های خونی یافت شدند، ولی امروزه سه ایزوفرم از آنها در پستانداران شناخته شده است که در ردیف اسید آمینه ای بخش پروتئینی و نیز مکانیسم تنظیم فعالیت با یکدیگر متفاوت هستند [۱و۵].

این سه ایزوفرم را براساس بافتی که نخستین بار از آن تخلیص شده اند تقسیم بندی می کنند:

۱) NOS عصبی (nNOS, NOS1)، ابتدا در سلول های عصبی کشف گردید.

۲) NOS ماکروفاژی (iNOS, mNOS, NOS2)، ابتدا در ماکروفاژها شناسایی گردید.

۳) NOS اندوتلیالی (eNOS, NOS3)، در ترومبوسیت ها، سلول های اندوتلیال، میوسیت های قلبی، ماهیچه اسکلتی و مغز (هیپوکامپ) یافت شدند [۵،۱و۶].

هر سه ایزوفرم محصول ژن های مختلفی هستند که بر روی کروموزوم های مختلف وجدا ازهم قرار دارند. ژن nNOS بر روی کروموزوم ۱۲، ژن iNOS بر روی کروموزوم ۱۷ و ژن eNOS بر روی کروموزوم ۷ واقع شده اند [۷].

ایزوفرم های اندوتلیالی و نورونی که اجزای نرمال سلول ها هستند بطور دائمی و پیوسته بیان می شوند و میزان NO آنها کم ودر حد (پیکومولار) می باشد. فعالیت این دسته توسط کلسیم-کالمودولین (CaM) تنظیم می شود، در حالی که ایزوفرم القائی در سلول های سالم دیده نمی شود و بعداز فعال شدن سلول ها توسط عوامل عفونی یا التهابی (مثل سیتوکین ها – اندوتوکسین ها و....)در سلول ها پدیدار می گردد و فعالیت آن وابسته به کلسیم نیست [۲،۵،۸،۹و۱۰].

نوع اندوتلیالی اگرچه بطور پیوسته و به میزان کم بیان می شود، ولی بیان آن به وسیله بسیاری از محرک ها مثل هورمون ها، فاکتورهای بیوشیمیایی و بیوفیزیکی مثل استرس، ورزش و....تحت هر

دو شرایط فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک تنظیم می شود [۱۱و۱۲].

از دیدگاه بیولوژیکی تغییر در بیان این سه ایزوفرم ممکن است پیامدهای فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک داشته باشد. بسیاری ازبیماری های قلبی- عروقی مربوط به کاهش سطح NO زیستی می باشند [۹و۱۲].

مقدارNO به فاکتورهای متعددی وابسته است از جمله میزان بیان آنزیم NOS، حضور سوبسترا، کوفاکتور، فسفریله شدن موقعیت ها بر روی NOS و حضور گونه های اکسیژن واکنش پذیر (ROS). اختلال در هرکدام از این موارد ممکن است در ایجاد بیماری نقش داشته باشد [۳].

بلوکه کردن سنتز NO توسط مهارکنند های فارماکولوژیکی باعث انقباض عروق محیطی مهم و افزایش فشار خون می گردد [۱۲].

علاوه بر نقشی که NO در کنترل عملکرد دیواره عروق دارد، دارای خواص آنتی اسکلروتیک چند گانه از جمله مهار اتصال لکوسیت ها به دیواره عروق، مهار تکثیر ماهیچه صاف عروق و همچنین خاصیت آنتی ترومبوتیک می باشد [۱۲].

از میان این سه ایزوفرم، نوع اندوتلیالی آن که علاوه بر اندوتلیال عروق در بسیاری از سلول های خونی دیگر از جمله لکوسیت ها و پلاکت ها بیان می شود، نقش بسیار مهمی در هموستاز عروقی ایفاء می کند.

نیتریک اکسید تولید شده توسط نوع اندوتلیالی (eNOS) از یک طرف از فعالیت، ترشح و تجمع پلاکت ها جلوگیری کرده، بیان مولکول های چسبنده را بطور موثر و قابل برگشتی کاهش می دهد و تا حدودی مانع تشکیل لخته می گردد. از طرف دیگر باعث فعال شدن آنزیم گوانیلیل سیکلاز محلول (SGC)[1] می گردد که باعث تولید cGMP می شود که بعنوان پیک ثانویه عمل کرده و طبق مسیر زیر باعث کاهش کلسیم درون سلولی می گردد.

$$NO \rightarrow SGC \rightarrow cGMP \rightarrow PKG \rightarrow promote \rightarrow SERCA$$

1.Soluble Guanylil Cyclase