



مقاله پژوهشی

بررسی اثرات تحریکی و مهاری نیتریک اکساید (NO) بر روند تکامل میوکاردیوسیت‌های جنین موش صحرائی

سید محمد حسین نوری موگهی^۱، مهناز آذرنیا^۲، سید امیر احسان سمیعی^۴، زهرا نادیا شریفی^۲، شبنم موثقی^۲، عطارالسادات مصطفوی نیا^۲، پارسا نظری^۵، مریم شیاسی^{۶*}

^۱ گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

^۲ گروه علوم تشریحی و علوم اعصاب شناختی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.

^۳ گروه بیولوژی تکوینی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

^۴ گروه بیولوژی تکوینی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

^۵ گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

^۶ گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* (نویسنده مسئول مکاتبات): s.shiasi@gmail.com

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: بهمن ۱۴۰۰

چکیده

با توجه به افزایش مصرف مکمل‌های غذایی در دوران بارداری و اهمیت تأثیرات ناهنجاری‌زای برخی داروها بر تکامل دستگاه‌های حیاتی جنین، در این مطالعه برای ارتقاء سطح سلامت جنین و جلوگیری از بروز ناهنجاری‌های قلبی عروقی به عنوان بیشترین عامل مرگ و میر نوزادان، به بررسی اثرات تجویز L-Arginine و L-NAME بر تشکیل قلب جنین موش صحرائی پرداختیم. ۴۰ سر موش صحرائی ویستار ۸ هفته با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم، پس از مشاهده پلاک واژینال به پنج گروه تقسیم شدند. جز گروه کنترل بقیه گروه‌ها به ترتیب نرمال سالیب ۲ ml/kg، L-Arginine ۲۰۰ mg/kg، L-NAME ۲۰ mg/kg و مخلوط دو ماده L-Arginine و L-NAME را با دوزهای مشابه، در روزهای هشت تا یازده حاملگی داخل صفاقی دریافت کردند. در روز ۱۸ حاملگی قلب جنین‌ها خارج و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد و پس از آماده‌سازی بافتی و رنگ‌آمیزی (H&E) تغییرات بافتی با میکروسکوپ نوری الیمپوس مدل Cx31 ژاپن و نرم افزار Image tools III بررسی شدند. در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری ($p < 0.05$) در قطر سلول‌ها و هسته‌ها در گروه L-NAME مشاهده شد، همچنین گروه L-NAME با بی‌نظمی در ساختار عضله قلبی و صفحات بینابینی همراه بود و در گروه L-Arginine ماهیچه‌سازی شدید و رگ‌زایی مشاهده شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مقادیر کمتر یا بیشتر از حد طبیعی نیتریک اکساید (NO) با اختلالات تکاملی در سیستم قلبی-عروقی همراه است، لذا تجویز داروها و مکمل‌ها خصوصاً در دوران بارداری نیاز به دقت و بررسی بیشتری دارد.

کلیدواژه‌ها: پروتئین استنباپی، خانواده شب بو، گل‌دهی، منداب، EvsAP1.

مقدمه

در دنیای امروز که انسان با استفاده از داروها و ترکیبات جدید سعی در بالا بردن سطح سلامت و کیفیت زندگی خود دارد توجه به اثرات متقابل این ترکیبات و تأثیرات دراز مدت آن‌ها در نسل بشر بسیار حائز اهمیت است. بسیاری از این مواد در فرآیندهای تکامل، رشد و نمو جنین مؤثرند، به طوری که وجود مقادیر طبیعی آن‌ها موجب روند تکاملی متعادل و صحیح، و مقادیر کمتر یا بیشتر از حد طبیعی آن با بروز اختلالات و ناهنجاری‌ها، گاه بقای فرد را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اسید آمینه آرژینین و مشتقات آن نیز یکی از همین ترکیبات هستند که به عنوان مکمل‌های غذایی مورد استفاده قشر وسیعی از افراد جامعه به خصوص مادران باردار قرار می‌گیرند [۱، ۲].

L-Arginine به عنوان پیش‌ساز توسط آنزیم‌های نیتریک اکساید سنتتاز (NOS) در حضور اکسیژن و ترکیبی به نام Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) به نیتریک اکساید (NO) تبدیل می‌شود [۳] نیتریک اکساید یک مولکول چربی دوست با نیمه عمر کوتاه است که در بسیاری از اندام‌های بدن تولید می‌شود. این ترکیب به عنوان یک پیامبر داخل سلولی و بین سلولی در کنترل بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و بیولوژیک بدن از جمله رشد سلولی، آپوپتوز، انتقال پیام‌های عصبی، تنظیم جریان و فشار خون، تنظیم تونوسیت‌ها، عروق، اثر بر تشکیل مجاری تناسلی، عملکرد کلیه، مکانیسم دفاعی و به ویژه در طول تکامل اولیه جفت و جنین نقش اساسی دارد [۴-۹].

آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز دارای سه ایزوفرم نورال (Neuronal NOS, nNOS)، القاایی (Inducible NOS, iNOS) و اندوتلیال (Endothelial NOS, eNOS) می‌باشد. نیتریک اکساید تولید شده توسط nNOS و eNOS در فرآیندهای داخل سلولی و نیتریک اکساید حاصل از iNOS در فرآیندهای التهابی درگیر هستند. همچنین محققین گزارش کرده‌اند که ترکیباتی همچون L-NAME با تأثیر مستقیم بر آنزیم NOS تمام ایزوفرم‌های آن را مهار می‌کنند [۱۰-۱۲].

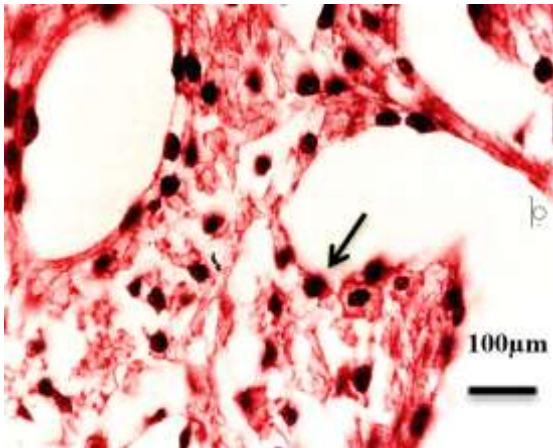
منبع اصلی نیتریک اکساید در قلب به شکل اساسی eNOS است که تقریباً هم‌زمان با تشکیل قلب و عروق کرونر در میوکاردیوسیت‌ها و اندوتلیوم عروق بیان می‌شود و در ریخت‌زایی

دریچه‌های قلبی، رگ‌زایی (Angiogenesis)، تکثیر میوکاردیوسیت‌ها و تغییر وضع عروق پس از تکامل، نقش دارد [۱۳].

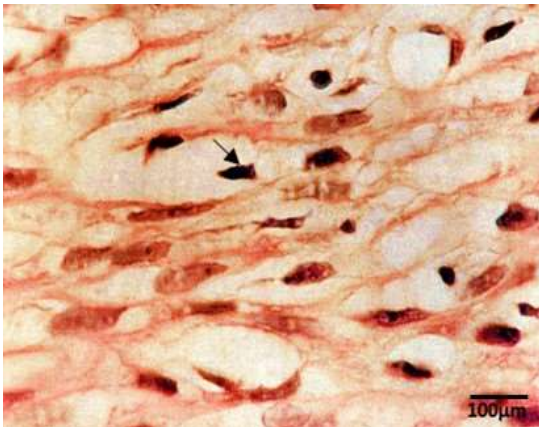
با توجه به اهمیت مواد استفاده شده توسط مادران در دوران بارداری [۱۴] و تأثیرات ناهنجاری‌زایی (Teratogenicity) برخی از مواد بر رشد، نمو و روند تکامل دستگاه‌های حیاتی جنین، تعیین حداقل و حداکثر مقدار ضروری این مواد برای بدن مادر و جنین و آستانه خطرزایی آنها و همچنین موارد منع مصرف در دوران بارداری امری ضروری به نظر می‌رسد. از این رو به منظور ارتقای سطح سلامت جنین و جلوگیری از بروز ناهنجاری‌های قلبی عروقی به عنوان بیشترین عامل مرگ و میر نوزادان، در این مطالعه به بررسی اثرات L-Arginine به عنوان پیش‌ساز نیتریک اکساید و L-NAME به عنوان مهارکننده آن، بر تشکیل قلب جنین موش پرداختیم.

مواد و روش‌ها

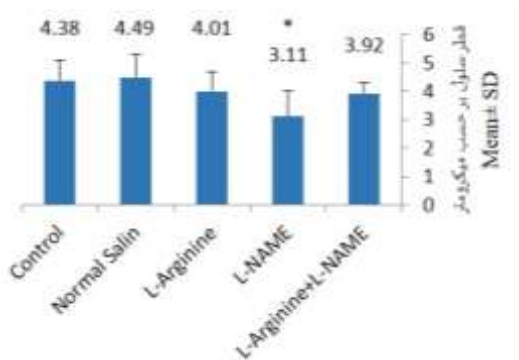
در این مطالعه تجربی-مداخله‌ای از ۴۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با وزن حدود ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم و سن متوسط هشت هفته تهیه شده از انستیتو رازی، استفاده شد. هر پنج سر موش (۱ سر نر+۴ سر ماده) مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت، در یک قفس استیل و در شرایط استاندارد از نظر دما، نور، رطوبت تغذیه و نگهداری شدند. مشاهده پلاک واژینال نشان انجام جفت‌گیری محسوب شده و به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. موش‌های حامله در پنج گروه کنترل، نرمال سالین، L-Arginine، L-NAME و مخلوط دو ماده L-Arginine، L-NAME (تهیه شده از شرکت سیگمای آلمان) تقسیم شدند. به غیر از گروه کنترل، بقیه گروه‌ها به ترتیب نرمال سالین ۲ ml/kg، L-Arginine ۲۰۰ mg/kg، L-NAME ۲۰ mg/kg و مخلوط دو ماده L-Arginine و L-NAME را با همان دوزهای مشابه، به صورت تزریق داخل صفاقی در روزهای هشت، نه، ده و یازده حاملگی دریافت کردند. برای آماده‌سازی محلول L-NAME، این ماده را در ۲ میلی‌لیتر محلول نرمال سالین حل کردیم [۱۵]. موش‌ها در روز هجدهم حاملگی با اتر بیهوش و سپس جنین‌ها از طریق سزارین برداشته شدند. تعداد جنین‌های زنده و ناقص ثبت و قلب جنین‌های سالم خارج و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس



فتومیکروگراف شماره ۲- ساختار نامنظم عضله قلبی در گروه L-NAME را نشان می‌دهد، به هسته‌های کوچک و هیپرکروماتیناسیون آن‌ها در میوکاردیوسیت‌ها (فلش) توجه شود (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۱۰۰x).



فتومیکروگراف شماره ۳- ماهیچه‌سازی شدید، هسته‌های فعال میوکاردیوسیت‌ها و وجود موئینه‌های (فلش) فراوان که نشانه رگ‌زایی است در گروه L-Arginine را نشان می‌دهد (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۱۰۰x).



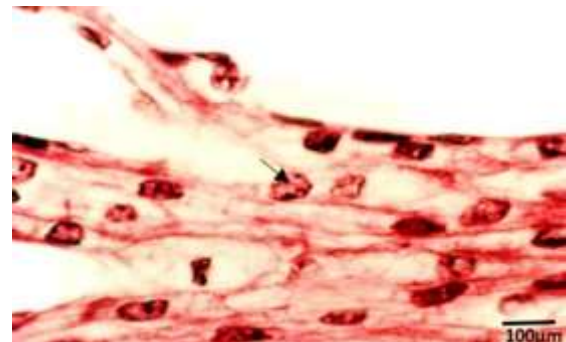
نمودار شماره ۱: مقایسه قطر سلول در گروه‌های مختلف نمودار (N=8, P<0.05).

شد. بعد از مراحل آماده‌سازی بافتی، از نمونه‌ها برش‌هایی با ضخامت ۵ تا ۶ میکرون تهیه و با روش معمولی (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. پارامترهایی نظیر قطر سلول و قطر هسته با میکروسکوپ نوری المپوس (Olympus) مدل CX31 ساخت ژاپن و نرم افزار Image tools III بررسی شدند [۱۶] برای آنالیز آماری و تعیین ارتباط گروه‌ها نیز از نرم افزار SPSS و آزمون One way ANOVA استفاده شد [۱۷].

یافته‌ها

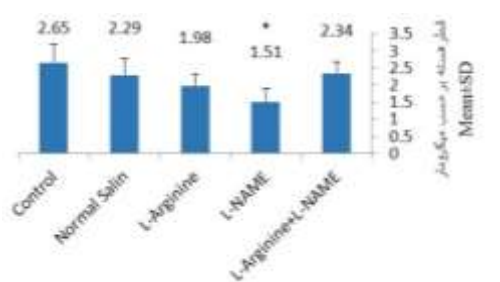
الف- یافته‌های کیفی: فتومیکروگراف‌های تهیه شده از گروه L-NAME در مقایسه با گروه کنترل (فتومیکروگراف شماره ۱)، برهم خوردن نظم و ساختار عضله قلبی، از بین رفتن صفحات بینابینی در بعضی نقاط، کوچک و هیپرکروماتینه شدن سلول‌ها و هسته آن‌ها و وجود موئینه‌های نامنظم را نشان می‌دهد (فتومیکروگراف شماره ۲). در گروه L-Arginine ماهیچه‌سازی شدید همراه با سیتوپلاسم اسیدوفیل در میوکاردیوسیت‌ها و رگ‌زایی دیده می‌شود (فتومیکروگراف شماره ۳). در گروه نرمال سالین و تجویز هم‌زمان L-Arginine و L-NAME نیز تفاوت قابل ملاحظه‌ای در ساختار بافتی قلب جنین‌ها نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد.

ب- یافته‌های کمی: اندازه‌گیری قطر سلول‌ها و هسته‌های گروه‌های مختلف نشان داد که علی‌رغم وجود تفاوت در گروه‌ها تنها در گروه L-NAME کاهش معنی‌داری ($p<0.05$) نسبت به سایر گروه‌ها دیده شد (نمودار شماره ۱ و ۲).



فتومیکروگراف شماره ۱- ساختار بافتی طبیعی در گروه کنترل را نشان می‌دهد. به ساختار منظم عضله قلبی و هسته دوکی شکل (فلش) میوکاردیوسیت‌ها توجه شود (رنگ آمیزی H&E بزرگنمایی، بزرگنمایی ۱۰۰x).

است [۱۱، ۲۶]. بنابراین می‌توان اظهار داشت که L-NAME و ترکیبات مشابه آن برای کاهش آسیب‌های بافتی حاصل از NO مؤثر هستند و در همین راستا مطالعاتی به نقش L-NAME در کاهش افت فشار خون در طی شوک، کاهش غیرطبیعی در حجم خون و پلاسمای در گردش (Hypovolemic) و افت فشار خون حاد ناشی از همودیالیز اشاره کرده‌اند [۲۷، ۲۸]. چون منبع اصلی نیتریک اکساید در قلب eNOS است، لذا تحقیقات متعددی به بررسی اثر eNOS بر روند تکاملی قلب پرداخته‌اند [۲۹، ۳۰]. لیو (Liu) و همکاران مواردی از نقص در عروق کرونر شامل کاهش معنی‌دار در قطر، تراکم و حجم عروق کرونر را در موش‌های eNOS منفی گزارش کردند. آن‌ها همچنین بعد از آنالیز قلب موش‌ها مشاهده کردند که بیان فاکتورهای دخیل در تکامل عروق مانند Gata4, bfgf (Basic fibroblast growth factor), VEGFa (Vascular endothelial growth factor) کاهش یافته است. لذا اظهار کردند که eNOS از عوامل حیاتی در تکامل عروق کرونری می‌باشد [۳۱]. مطالعات دیگر آن‌ها نیز نقص مادرزادی در قلب، خصوصاً اختلال در تشکیل شریان کرونری و افزایش تراکم مویرگ‌ها در قلب و ریه را در موش‌هایی با کمبود eNOS گزارش کرد که این نقایص در ایجاد نارسایی قلبی و افزایش مرگ و میرهای بعد از تولد نقش مهمی دارند [۳۲]. نتایج مطالعه لپیک (Lepic) و همکاران برای بررسی اثر eNOS بر روی تکثیر میوکاردیوسیت‌ها نشان داد که تعداد سلول‌های تکثیر شده حاصل از کشت میوکاردیوسیت‌ها در موش‌ها با کمبود eNOS در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشته است و برای تأیید این رابطه با افزودن NO به محیط کشت این سلول‌ها، افزایش قابل ملاحظه‌ای را در تعداد سلول‌ها گزارش کردند [۳۳]. نتایج این تحقیق با یافته‌های هاموند (Hammoud) و همکاران نیز مطابقت داشت [۳۴]. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که NO تولید شده از eNOS برای تکثیر میوکاردیوسیت‌ها بعد از تولد بسیار ضروری است [۳۵]. دریچه آنورت دولته‌ای یکی از شايع‌ترین ناهنجاری‌های قلبی مادرزادی است که در طول دوره تکامل جنین اتفاق می‌افتد و با عوارضی همچون اندوکاردیت، تنگی و کوآرکتاسیون آنورت همراه است. نتایج تحقیقات نیز حاکی از شیوع ۳۰ درصدی دریچه آنورت دولتی در شرایط کمبود eNOS می‌باشد [۱۳،



نمودار شماره ۲: مقایسه قطر هسته در گروه‌های مختلف (N=8, P<0.05).

بحث

به دنبال تزریق L-NAME در این تحقیق علاوه بر کاهش قطر میوکاردیوسیت‌ها و هسته این سلول‌ها ما شاهد تغییرات زیادی نیز در بافت طبیعی عضله قلب بودیم که در راستای نتایج بدست آمده در تحقیقات مشابه [۱۸-۲۰] بود. همچنین برهم خوردن نظم و ساختار عضله قلبی و در بعضی نقاط از بین رفتن صفحات بینابینی و به دنبال آن عدم هماهنگی عملکرد میوکاردیوسیت‌ها که می‌توان آن را در ایجاد اختلالات قلبی مؤثر دانست [۲۱، ۲۲].

در گروه L-Arginine نیز افزایش ماهیچه‌سازی و رگ‌زایی مشاهده شد که در توجیه آن می‌توان به افزایش تولید نیتریک اکساید و نقش آن در رشد سلولی، تکثیر میوکاردیوسیت‌ها و رگ‌زایی اشاره کرد [۱۳، ۲۳] و چنین بیان کرد که احتمالاً افزایش بیش از حد L-Arginine و به دنبال آن افزایش نیتریک اکساید، سبب ایجاد تغییرات بافتی و ناهنجاری‌های عملکردی در سیستم قلبی-عروقی می‌شود. این در حالی است که بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که تجویز L-Arginine به عنوان مکمل در دوران بارداری از بروز پره اکلامپسی و محدودیت رشد داخل رحمی جنین جلوگیری می‌کند [۱، ۱۴، ۲۴]. اگرچه غلظت‌های کم نیتریک اکساید در برخی از موارد اثر حافظتی دارد، ولی غلظت‌های بالای آن گاهی سمی و کشنده و در برخی از موارد بالعکس عمل می‌کند، لذا از این مولکول به عنوان یک «شمشیر دولبه» یاد می‌کنند [۲۵]. تجویز هم‌زمان L-Arginine و L-NAME علی‌رغم مشاهده وجود تفاوت‌هایی از لحاظ پارامترهای اندازه‌گیری شده در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری نشان نداد. این امر ممکن است به دلیل اثر مهاری L-NAME بر تولید نیتریک اکساید حاصل از L-Arginine باشد، این یافته توسط برخی دیگر از محققین نیز گزارش شده

- [5] Reina-Torres E, De Ieso ML, Pasquale LR, Madekurozwa M, van Batenburg-Sherwood J, Overby DR, et al. The vital role for nitric oxide in intraocular pressure homeostasis. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2021;83:100922.
- [6] Wu Z-H, Tang Y, Niu X, Sun H-Y. The role of nitric oxide (NO) levels in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: a meta-analysis. *Sleep & Breathing*. 2021;25(1).
- [7] Marino F, Scalise M, Cianflone E, Salerno L, Cappetta D, Salerno N, et al. Physical exercise and cardiac repair: the potential role of nitric oxide in boosting stem cell regenerative biology. *Antioxidants*. 2021;10(7):1002.
- [8] Nelin L, Kinsella JP, Courtney SE, Pallotto EK, Tarau E, Potenziano JL. Use of inhaled nitric oxide in preterm vs term/near-term neonates with pulmonary hypertension: results of the PaTTerN registry study. *Journal of Perinatology*. 2021:1-5.
- [9] Johal T, Lees CC, Everett TR, Wilkinson IB. The nitric oxide pathway and possible therapeutic options in pre-eclampsia. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2014;78(2):244-57.
- [10] Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008;45(1):18-31.
- [11] Karambaksh A, Hossein Noori Moughahi SM, Reza Hassan Zadeh G, Tak Zaree N. Excitatory and inhibitory effects of nitric oxide on weight, size, and histological changes of rat cerebellum. *Tehran University Medical Journal*. 2013;70(10).
- [12] Li H, Hergert SM, Schäfer SC, Brausch I, Yao Y, Huang Q, et al. Midostaurin upregulates eNOS gene expression and preserves eNOS function in the microcirculation of the mouse. *Nitric Oxide*. 2005;12(4):231-6.
- [13] Liu Y, Feng Q. NOing the heart: role of nitric oxide synthase-3 in heart development. *Differentiation*. 2012;84(1):54-61.
- [14] Lassala A, Bazer FW, Cudd TA, Datta S, Keisler DH, Satterfield MC, et al. Parenteral administration of L-arginine prevents fetal growth restriction in undernourished ewes. *The Journal of Nutrition*. 2010;140(7):1242-8.
- [15] Nouri MM, Azarnia M, GHobeh MN. Effects of nitric oxide on qualitative and differentiation of mouse uterus. *Jornal of Iranian Anatomical Sciences*. 2004;2(1): 61-67.
- [16] Noori S, Mahmmoudzadeh-Sagheb H, Heidari Z. Applied methods and terminology of histotechnology, stereology & morphology. Forth Edition, Tehran, TUMS; 2009:71-95.

[۳۶]. اخیراً محققین گزارش کردند که در موش‌ها با کمبود eNOS افزایش آپوپتوز در ناحیه بالشتک دهلیزی-بطنی منجر به نقص مادرزادی در دیواره (Septum) دهلیزی-بطنی و نارسایی قلبی می‌شود که با مرگ و میر ۸۵ درصدی بعد از تولد همراه است [۱۳]. نیدیو (Nedeau) و همکاران نیز به نقص در دیواره دهلیزی در شرایط کمبود eNOS اشاره کردند [۳۷]. برخی مطالعات دیگر به بررسی تأثیر کاهش تولید NO در بارداری بر روند تکامل سایر بافت‌های جنین پرداخته‌اند [۳۸, ۳۹]. افزایش تعداد و ضخامت سلول‌های لایه عضلانی حلقوی پیلور و متعاقب آن استنوز هیپرتروفیک در جنین به دنبال کاهش تولید NO در اواخر بارداری و همچنین کاهش بیان ژن کد کننده NOS در کودکان مبتلا به استنوز هیپرتروفیک از جمله این تحقیقات است [۴۰].

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالب فوق می‌توان نتیجه گرفت که مقادیر طبیعی نیتریک اکساید موجب روند تکاملی صحیح و متعادل، و مقادیر کمتر یا بیشتر از حد طبیعی سبب بروز اختلالات و ناهنجاری‌ها در تکامل قلب، دریچه‌ها و عروق می‌شود. لذا باید در استفاده از داروها و مکمل‌های غذایی مخصوصاً در دوران بارداری بسیار دقت شود و حتماً با تجویز پزشک متخصص و زیر نظر وی صورت پذیرد.

منابع

- [1] Zhu C, Li X, Bazer FW, Johnson GA, Burghardt RC, Jiang Z, et al. Dietary L-arginine supplementation during days 14-25 of gestation enhances aquaporin expression in the placenta and endometria of gestating gilts. *Amino Acids*. 2021;53(8):1287-95.
- [2] Goto E. Effects of prenatal oral L-arginine on birth outcomes: a meta-analysis. *Scientific Reports*. 2021;11(1):1-10.
- [3] Mondillo C, Pagotto RM, Piotrkowski B, Reche CG, Patrignani ZJ, Cymeryng CB, et al. Involvement of nitric oxide synthase in the mechanism of histamine-induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis via histamine receptor subtypes in Sprague-Dawley rats. *Biology of Reproduction*. 2009;80(1):144-52.
- [4] Tewari D, Sah AN, Bawari S, Nabavi SF, Dehpour AR, Shirooie S, et al. Role of Nitric Oxide in Neurodegeneration: Function, Regulation, and Inhibition. *Current Neuropharmacology*. 2021;19(2):114-26.

- [17] Peck R, Olsen C, Devore JL. Introduction to statistics and data analysis: Cengage Learning; 2015.
- [18] Liao X, Liu JM, Du L, Tang A, Shang Y, Wang SQ, et al. Nitric oxide signaling in stretch-induced apoptosis of neonatal rat cardiomyocytes. *The FASEB Journal*. 2006;20(11):1883-5.
- [19] Zanfolin M, Faro R, Araujo EG, Guaraldo AMA, Antunes E, De Nucci G. Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart, and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2006;47(3):391-5.
- [20] Hmaid AAAA, Markelic M, Otasevic V, Masovic S, Jankovic A, Korac B, et al. Structural alterations in rat myocardium induced by chronic L-arginine and L-NAME supplementation. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2018;25(3):537-44.
- [21] Li J, Radice GL. A new perspective on intercalated disc organization: implications for heart disease. *Dermatology Research and Practice*. 2010.
- [22] Dowling JJ, Gibbs E, Russell M, Goldman D, Minarcik J, Golden JA, et al. Kindlin-2 is an essential component of intercalated discs and is required for vertebrate cardiac structure and function. *Circulation Research*. 2008;102(4):423-31.
- [23] Mosqueira M, Konietzny R, Andresen C, Wang C, Fink RH. Cardiomyocyte depolarization triggers NOS-dependent NO transient after calcium release, reducing the subsequent calcium transient. *Basic Research in Cardiology*. 2021;116(1):1-21.
- [24] Vadillo-Ortega F, Perichart-Perera O, Espino S, Avila-Vergara MA, Ibarra I, Ahued R, et al. Effect of supplementation during pregnancy with L-arginine and antioxidant vitamins in medical food on pre-eclampsia in high risk population: randomised controlled trial. *BMJ*. 2011;342.
- [25] Narde MB, Domingues ELBC, Gonçalves KR, Viana ML, Zanini MS, de Lima WG, et al. L-arginine supplementation increases cardiac collagenogenesis in mice chronically infected with Berenice-78 *Trypanosoma cruzi* strain. *Parasitology International*. 2021;83:102345.
- [26] Nouri MS, Minaei ZM, Mehrannia T, Azarnia M, Shirazi R. The effects of L-Arginine and L-Name on corpus luteum and growing follicle changes in pregnant rats. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2010;17(4):1-8.
- [27] Rostoker G. Colloids in dialytic refractory hypotension. *Hemodialysis: IntechOpen*; 2013.
- [28] Corremans R, D'Haese PC, Vervaet BA, Verhulst A. L-NAME Administration Enhances Diabetic Kidney Disease Development in an STZ/NAD Rat Model. *International journal of Molecular Sciences*. 2021;22(23):12767.
- [29] Carlström M. Nitric oxide signalling in kidney regulation and cardiometabolic health. *Nature Reviews Nephrology*. 2021:1-16.
- [30] Severino P, D'Amato A, Prospero S, Magnocavallo M, Mariani MV, Netti L, et al. Potential Role of eNOS Genetic Variants in Ischemic Heart Disease Susceptibility and Clinical Presentation. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. 2021;8(9):116.
- [31] Liu Y, Lu X, Feng Q. Deficiency in endothelial nitric oxide synthase impairs fetal coronary artery development in mic. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2010;48:S94.
- [32] Liu Y, Lu M, Lu X, Lacefield JC, Feng Q. Deficiency in endothelial nitric oxide synthase results in congenital malformation of atrioventricular valves. *The FASEB Journal*. 2011; 25(s1):826-829.
- [33] Lepic E, Burger D, Lu X, Song W, Feng Q. Lack of endothelial nitric oxide synthase decreases cardiomyocyte proliferation and delays cardiac maturation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2006; 291(6): C1240-C6.
- [34] Hammoud L, Xiang F, Lu X, Brunner F, Leco K, Feng Q. Endothelial nitric oxide synthase promotes neonatal cardiomyocyte proliferation by inhibiting tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression. *Cardiovascular Research*. 2007; 75(2): 359-68.
- [35] Diab FM, Ayobe MH, Abdel-Salam MF, Otman MF, Abdel-Hady EA. Increased nitric oxide availability worsens the cardiac performance during early re-perfusion period in adult rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 2021.
- [36] Fernández B, Durán AC, Fernández-Gallego T, Fernández MC, Such M, Arqué JM, et al. Bicuspid aortic valves with different spatial orientations of the leaflets are distinct etiological entities. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(24):2312-8.
- [37] Nadeau M, Georges RO, Laforest B, Yamak A, Lefebvre C, Beaugard J, et al. An endocardial pathway involving Tbx5, Gata4, and Nos3 required for atrial septum formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(45):19356-61.
- [38] Olivier P, Loron G, Fontaine RH, Pansiot J, Dalous J, Thi HP, et al. Nitric oxide plays a key role in myelination in the developing

- brain. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2010;69(8):828-37.
- [39] Rodebaugh J, Sekulic M, Davies W, Montgomery S, Khraibi A, Solhaug MJ, et al. Neuronal nitric oxide synthase, nNOS, regulates renal hemodynamics in the postnatal developing piglet. *Pediatric Research*. 2012;71(2):144-9.
- [40] Panteli C. New insights into the pathogenesis of infantile pyloric stenosis. *Pediatric Surgery International*. 2009;25(12):1043-52.

Excitatory and inhibitory effects of nitric oxide on the process of evolution of the Cardiomyocyte of rat embryo

Noori Mugahi SMH.^{1,2}, Azarnia M.³, Samie E.⁴, Sharifi ZN.², Movassaghi SH.², Mostafavinia A.², Nazari P.⁵, SHiasi M.^{6*}

¹ Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences (TUMS)

² Department of Anatomical Sciences & cognitive neuroscience, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

³ Department of Cellular & Development Biology, Faculty of biological sciences, Islamic Azad University Tehran North Branch, Iran.

⁴ Development biology, faculty of biological sciences, Islamic Azad University Tehran North Branch, Iran.

⁵ Animal Biology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

⁶ Department of anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* (Corresponding author): s.shiasi@gmail.com

Received: January 2022

Accepted: July.2022

Abstract

According to increased consumption of supplements during pregnancy and the teratogenic impact of some drugs on evolution the vital systems of embryos, in this study to improve the health of the fetus and prevention of cardiovascular abnormalities as the most common cause of infant mortality, we examined the effects of L-Arginine and L-NAME administration on fetal rat heart. Forty Wister rats, weighing 200-250gr with age of 8 weeks, were divided into 5 groups after observing the vaginal plug. Except the control group, the others were received 2ml/kg normal saline, 200mg/kg L-Arginine, 20mg/kg L-NAME and a mixture of the same doses of L-Arginine & L-NAME respectively on 8 to 11th gestational days via Intraperitoneal. The fetal Hearts were removed on 18th gestational days and were fixed in formalin 10 percent, after tissue preparation and staining method (H&E) histological changes were studied by Light microscopy Olympus Cx31 and software Image tools III. Despite of the control group, the significant decrease ($p < 0.05$) in the diameter of cells and their nuclei were observed in L-NAME group, L-NAME group also was associated with irregularities in heart muscle structure and intercalated and in the L-Arginine group severe Myogenesis and Angiogenesis was observed. Results of this study showed that Nitric oxide (NO) in amounts higher or lower than normal is associated with congenital heart diseases. Therefore, drugs and supplements should be used with caution especially during pregnancy.

Keywords: L-NAME, L-Arginine, Cardiomyocyte, Rat.