بررسی نقش آندوتلیوم عروق روی پاسخهای انبساطی به ایزوپروترنول در حلقه شریانهای ریوی موش

دکتر مسعود کاولی حقیقی *، دکتر دیوید پولوک **

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به نتایج مغایر بدست آمده در ارتباط با نقش آندوتلیوم در عمل انبساط عروقی بتاآدرنوسپتور و احتمال دخالت مسیر ال آرژینین / اکسید نیتریک، این تحقیق در حلقه شریانهای اصلی ریوی و اولین شاخه‌هایش در موش به روش تجربی انجام شد.

مواد و روشها: تحقیق به روش تجربی روی ۶ موش نر نژاد Wistar با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم صورت پذیرفت. برای این منظور ابتدا با وارد کردن ضربه‌ای بر سر موشها، آنها را بی‌حس نموده و سپس بوسیلهٔ چاقوی جراحی سر بریده شدند. ریه به همراه قلب از بدن خارج گردید و بلافاصله در مایع کربس سرد شریان اصلی و اولین شاخه‌های ریه از بافتهای چسبیده به آن جدا گردید. شریانها به قطعات ۴-۳ میلی‌متر برش داده شد و بر روی دو قلاب استیل به قطر ۰/۲ میلی‌متر سوار و در حمام بافت قرار داده شد. سپس به مدت یک ساعت و به مقدار یک گرم تحت کشش قرار گرفتند. پس از مراحل فوق، آزمایشات با داروی ایزوپروترنول (ISO) با غلظت‌های ۱۰۰ پیکومول تا ۱۰ میکرومول در حضور و در غیاب ان امگا نیترو ال آرژینین متیل استر (L-MAME، مهار کننده سنتز NO) در حلقه شریانهای با آندوتلیوم و بدون آندوتلیوم ریوی انجام و محاسبه گردید.

یافته ها: ایزوپروترنول موجب انبساط حلقه شریانهای ریوی (اصلی و اولین شاخه‌ها) با آندوتلیوم سالم و بدون آندوتلیوم و از پیش منقبض شده با ۱۰۰ نانومول فنیل افرین شد. حداکثر پاسخ انبساطی به ۱۰ میکرومول ایزوپروترنول در حلقه شریانهای اصلی ریه ۱/۲۵±۹۳/۰۴ درصد و در اولین شاخه‌هایش ۲/۸۰±۷۷/۲۱ درصد بود (unpaired T-test, P< 0.001). پاسخ انبساطی شریان اصلی ریه در تمام غلظت‌های مذکور نسبت به اولین شاخه‌هایش بیشتر بود. L-NAME موجب کاهش پاسخ انبساطی حلقه شریانهای ریوی با آندوتلیوم سالم به غلظت‌های کم ISO گردید ولی اثری روی حداکثر غلظت نداشت.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده نشان داد که اثر انبساطی شریانهای ریوی موش به ISO به وجود NO نیاز ندارد ولی حضور عملی آندوتلیوم ممکن است پاسخ انبساطی به ISO را از طریق آزاد کردن اکسید نیتریک پایه و سپس افزایش مقدار cGMP پایه در عضلهٔ صاف عروق تسهیل نماید. در این ارتباط تحقیقات بیشتر همچون اندازه گیری cGMP به منظور عیار NO آزاد گردیده پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: اکسید نیتریک، عامل منبسط کنندهٔ آندوتلیالی، شریان ریوی، ایزوپروترنول، بتا آدرنوسپتور، ال آرژینین، ان امگا نیترو ال آرژینین متیل استر

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کاشان، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی

** رئیس بخش نوروساینس و بیوشیمی انستیتو بیوشیمی و لایف ساینس دانشگاه گلاسگو انگلستان

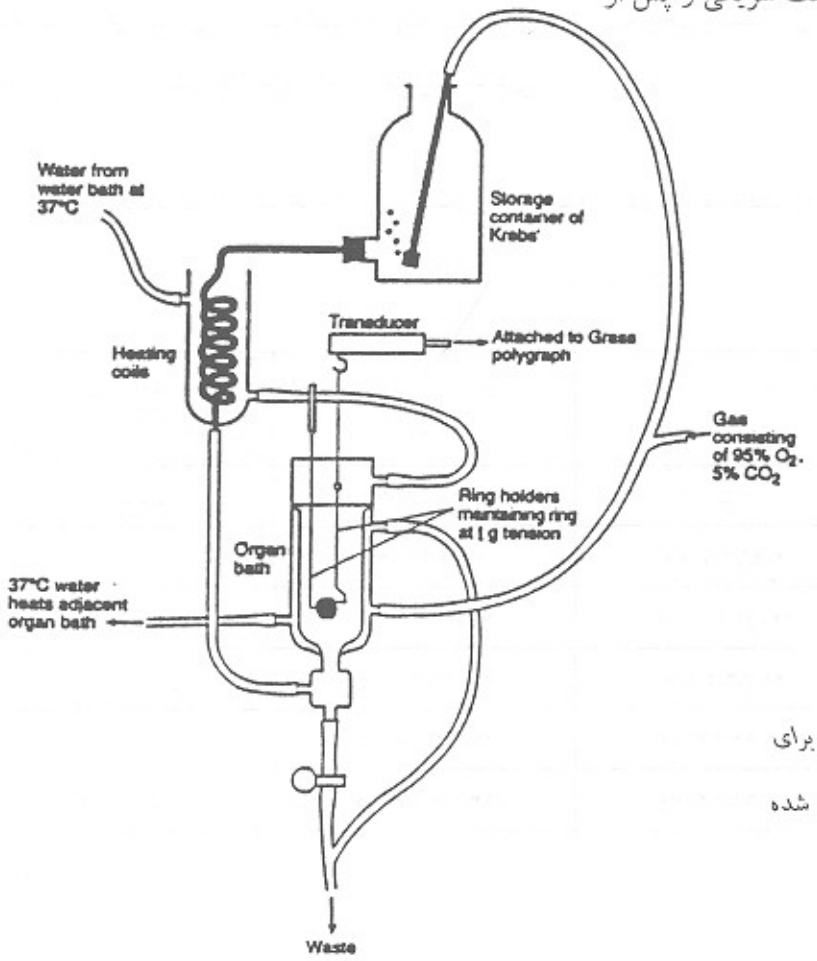
مقدمه

مطالعات فیزیولوژیکی نشان می‌دهد که بتا آدرنوسپتورها سبب انبساط بستر عروق ریوی و عروق سیستمیک می‌شوند (۱). انبساط عضلهٔ صاف عروق ناشی از بتا آدرنوسپتورها از طریق فعال شدن آنزیم آدنیل سیکلاز (AC) و افزایش تولید آدنوزین ۳،۵ منو فسفات حلقوی (cAMP) فراهم می‌گردد (۲). اخیراً گزارشات مغایری مبنی بر احتمال شرکت آندوتلیوم عروق در ایجاد انبساط عروق ناشی از بتا آدرنوسپتورها پیشنهاد شده و مسیر ال - آرژینین / اکسید نیتریک (L-Arg/NO) در این پاسخ ذکر گردیده است . نتایج بدست آمده در شریان کرونری Canine در in vitro نشان داد که انبساط عروق ناشی از بتا آدرنوسپتورها هم غیروابسته به آندوتلیوم (۴، ۳) و هم وابسته به آندوتلیوم (۵) می‌باشند که در آئورت سینه‌ای کاملاً وابسته به آندوتلیوم بود و پیشنهاد گردید که افزایش cAMP می‌تواند منجر به تحریک تولید NO شود (٦). این یافته‌ها با نتایج بدست آمده از تحقیقات Bea و همکارانش کاملاً متفاوت بود و آنها پیشنهاد کردند که NO مستقیماً در انبساط شریانهای کرونری اپیکاردیایی ناشی از بتاآدرنوسپتورهای canine شرکت ندارد ولی حضور عملی آندوتلیوم ممکن است که پاسخ انبساطی به ISO را از طریق آزادسازی NO پایه و سپس افزایش مقدار cGMP در عضلهٔ صاف عروق تسهیل نماید (۷). این تحقیق به منظور اهمیت نقش آندوتلیوم در پاسخهای انبساطی به ISO در حلقه شریانهای اصلی و اولین شاخه‌های ریوی در موش صورت پذیرفت.

مواد و روشها

تحقیق به روش تجربی با استفاده از تعداد ٦ موش نر نژاد Wistar با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم انجام گردید. موشها در محل نگهداری حیوان با داشتن درجهٔ حرارت ۲۲-۱۸ سانتی‌گراد و برخوردار از ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و نیز با در اختیار داشتن غذا و آب آشامیدنی کنترل و نگهداری شدند. به هنگام تهیه بافت ابتدا موشها از طریق ایجاد ضربه در ناحیهٔ سر بی‌حس گردیدند و سپس با چاقوی جراحی سر بریده شدند. به منظور خارج کردن ریه و شریانهای آن ، موشها در تخت‌های چوب پنبه‌ای رو به بالا قرار داده شدند و به شکل صلیب بوسیلهٔ سوزن فیکس گردیدند. سپس ریه به همراه قلب از حیوان جدا و در مایع کربس سرد قرار داده شد و بلافاصله شریان اصلی ریه و اولین شاخه‌های آن از بافتهای چسبیده به آن در مایع کربس سرد جدا گردید. از هر حیوان یک شریان اصلی ریه و دو شاخه اولیه راست و چپ به اندازهٔ ۴-۳ میلی‌متر بریده شد. تعدادی از حلقه شریانها بوسیلهٔ میلهٔ چوبی مخصوص و از طریق مالش ملایم از آندوتلیوم عاری و لخت گردیدند. هر یک از شریانهای آماده شده بر روی دو قلاب استیل به قطر ۰/۲ میلی‌متر در حمام بافتی ۲۵ میلی لیتری حاوی کربس - هنسلیت بافر ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد سوار شدند

و با استفاده از مخلوطی از گازها شامل ۹۵ درصد اکسیژن و ۵ درصد انیدرید کربنیک تنفس داده شدند. سپس به منظور تعادل بافتها به مدت یک ساعت از یک گرم کشش استفاده شد. پس از مراحل فوق آزمایشات با غلظت‌های مختلف ISO از ۱۰۰ پیکومول تا ۱۰ میکرومول در حضور و در غیاب ۲۰۰ میکرومول L-NAME در حلقه شریانهای ریوی با آندوتلیوم و بدون آندوتلیوم انجام گرفت. پاسخهای کششی بوسیله Grass FTO3 transducers و برروی پلی‌گراف Grass مدل ۷ نشان داده می‌شد، ثبت و محاسبه گردید (شکل ۱). سپس پاسخ‌های انبساطی به غلظت‌های متفاوت ISO با استفاده از unpaired T-test مورد قضاوت آماری واقع شد. در تعدادی از آزمایشات preload مطلوب برای هر قطعه بافت شریانی و پس از کشش اضافی از طریق اندازه‌گیری حداکثر پاسخ انقباضی به ۳۰ میلی مول کلرور پتاسیم تعیین گردید. اثر برداشت مکانیکی آندوتلیوم با غلظت یک میکرومول استیل کولین بررسی شد که روی شریانهای عاری از آندوتلیوم و از پیش منقبض شده با فنیل افرین اثری نداشت و حال آنکه این ماده سبب انبساط شریانهای دارای آندوتلیوم سالم و دست نخوردهٔ منقبض می‌گردید (این عمل استیل کولین از طریق آزاد شدن NO آندوتلیالی و افزایش cGMP داخل سلولی عضلهٔ صاف عروق صورت می‌پذیرد). پس از پایان آزمایشات شریانهای مهیا شده به آرامی خشک و سپس وزن گردیدند و نیروی انقباضی بصورت میلی‌گرم کشش در میلی گرم وزن بافت محاسبه گردید.



شکل ۱ـ دیاگرام دستگاه مورد استفاده برای اندازه‌گیری کشش حلقه شریانهای تهیه شده

یافته ها

بتاآدرنوسپتور آگونیست ، ایزوپروترنول در غلظت‌های ۱۰۰ پیکومول تا ۱۰ میکرومول در حضور و در غیاب ۲۰۰ میکرومول L-NAME موجب انبساط حلقه شریانهای ریوی (اصلی و اولین شاخه‌هایش) با آندوتلیوم سالم و بدون آندوتلیوم که از پیش با ۱۰۰ نانومول فنیل‌افرین منقبض شده بودند گردید (نمودارهای ۱ و ۲). حداکثر پاسخ انبساطی با غلظت ۱۰ میکرومول ISO درحلقه شریانهای اصلی ریه ۱/۲۵±۹۳/۰۴ درصد و در اولین شاخه‌هایش ۲/۸۰±۷۷/۲۱ درصد بود که با unpaired T -test قضاوت آماری گردید (جداول ۱ الی ۴). پاسخ انبساطی شریان اصلی ریه در تمام غلظت‌های مذکور نسبت به اولین شاخه‌هایش بیشتر بود . پاسخ‌های انبساطی به ISO با این غلظت‌ها در حلقه شریانهای عاری از آندوتلیوم (چه از طریق مکانیکی توسط مالش ملایم و چه از طریق شیمیایی بوسیلهٔ مهارکنندهٔ سنتز NO یعنی L-NAME با غلظت ۲۰۰ میکرومول و به مدت ۱۵ دقیقه قبل از استفاده از ISO) نیز بدست آمد . پاسخ‌های انبساطی در غلظت‌های کم ISO یعنی از ۱۰۰ پیکومول تا ۱۰۰ نانومول در شریان اصلی ریه و از ۱۰-۱ نانومول در اولین شاخه‌هایش کاهش داشت ولی اثری روی حداکثر غلظت و نزدیک به حداکثر غلظت پاسخ انبساطی این ماده ندارد (نمودارهای ۱ و ۲).

پروپرانولول ، آنتاگونیست بتا آدرنوسپتور با غلظت یک میکرومول پاسخ‌های انبساطی حلقه شریانهای ریوی به ۱۰ میکرومول ISO را متوقف کرد.

L-NAME به مقدار ۲۰۰ میکرومول بطور نسبی توانست حداکثر پاسخ انبساطی ایجاد شده در شریانهای ریوی به ۱۰ میکرومول ISO را برگرداند. این‌اثر L-NAME نیزبطورناچیزی توسط یکی میلی مول مهارکنندهٔ آن یعنی ال آرژینین (L-Arg) برگشت داده شد.

جدول ۱ـ درصد انبساط حلقه شریانهای اصلی ریه با و بدون آندوتلیوم به غلظت‌های مختلف ISO ، پیش منقبض شده با ۱۰۰ نانومول فنیل افرین

شریان اصلی ریه / غلظت ISO	شریانهای با آندوتلیوم n=6	شریانهای بدون آندوتلیوم n=6	نتیجه آزمون (ارقام P)
۱۰۰ پیکومول	۲/۳۰ ± ۰/۷۱	۰/۳±۰/۳	P<۰/۰۵
۱ نانومول	۹/۳۴±۱/۲۷	۲/۹۶±۱/۱۷	P<۰/۰۱
۱۰ نانومول	۴۲/۳۲±۱/۸۸	۱۴/۵۴±۳/۰۷	P<۰/۰۰۱
۱۰۰ نانومول	۸۰/۳۶±۱/۳۹	۵۸/۶۶±۶/۷	P<۰/۰۵
۱ میکرومول	۸۷/۲۶±۰/۸۶	۷۳/۹۲±۴/۷۹	P>۰/۰۵
۱۰ میکرومول	۹۳/۰۴±۱/۲۵	۸۲/۶۸±۴/۷۱	P>۰/۰۵

جدول ۲ـ درصد انبساط حلقه شریانهای اصلی ریه به غلظت‌های مختلف ISO در حضور و در غیاب L-NAME، پیش منقبض شده با ۱۰۰ نانومول فنیل افرین

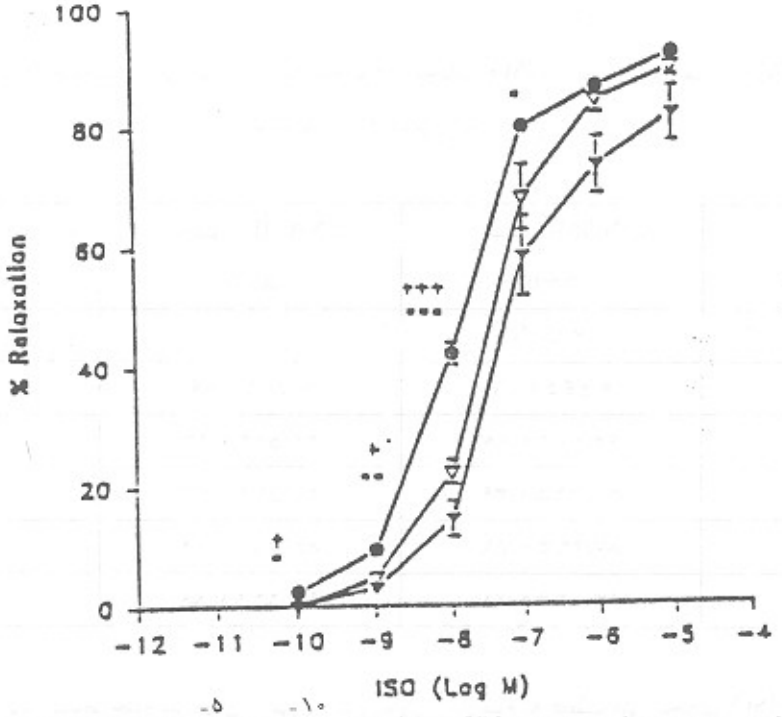
شریان اصلی ریه / غلظت ISO	در حضور L-NAME n=6	در غیاب L-NAME n=6	نتیجه آزمون (ارقام P)
۱۰۰ پیکومول	۰	۲/۳±۰/۷۱	P<۰/۰۵
۱ نانومول	۴/۷۸±۰/۹۴	۹/۳۴±۱/۲۷	P<۰/۰۵
۱۰ نانومول	۲۲/۵۱±۲/۱۲	۴۲/۳۲±۱/۸۸	P<۰/۰۰۱
۱۰۰ نانومول	۶۸/۵۱±۵/۴۶	۸۰/۳۶±۱/۳۹	P>۰/۰۵
۱ میکرومول	۸۵/۰۵±۲/۲۵	۸۷/۲۶±۰/۸۶	P>۰/۰۵
۱۰ میکرومول	۹۰/۶۶±۱/۵۵	۹۳/۰۴±۱/۲۵	P>۰/۰۵

جدول ۳ـ درصد انبساط حلقه شریانهای فرعی ریه با و بدون آندوتلیوم به غلظت‌های مختلف ISO، پیش منقبض شده با ۱۰۰ نانومول فنیل افرین

شریان فرعی ریه / غلظت ISO	شریانهای با آندوتلیوم n=8	شریانهای بدون آندوتلیوم n=8	نتیجه آزمون (ارقام P)
۱۰۰ پیکومول	۰	۰	P>۰/۰۵
۱ نانومول	۴/۶۶±۱/۲۵	۰/۵±۰/۵	P<۰/۰۵
۱۰ نانومول	۲۴/۴۹±۱/۸۷	۶/۵۹±۱/۵۸	P<۰/۰۰۱
۱۰۰ نانومول	۵۳/۵۹±۲/۶۷	۳۹/۰۸±۶/۷۲	P>۰/۰۵
۱ میکرومول	۶۶/۳۱±۳/۷۳	۶۲/۲۹±۱/۵۷	P>۰/۰۵
۱۰ میکرومول	۷۷/۲۱±۲/۸۰	۷۴/۴۷±۵/۳۱	P>۰/۰۵

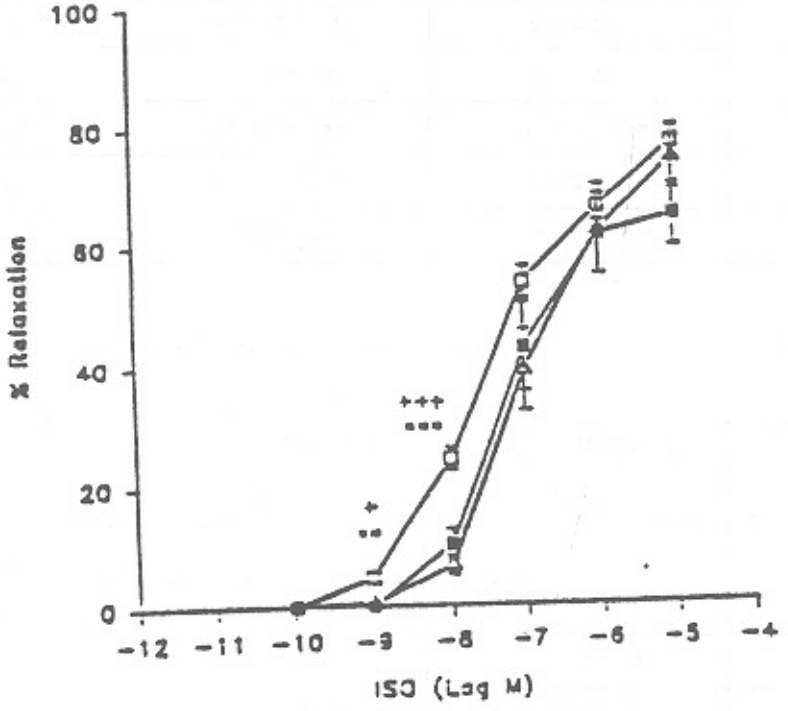
جدول ۴ـ درصد انبساط حلقه شریانهای فرعی ریه به غلظت‌های مختلف ISO در حضور و در غیاب L-NAME، پیش منقبض شده با ۱۰۰ نانومول فنیل افرین

شریان فرعی ریه / غلظت ISO	در حضور L-NAME n=8	در غیاب L-NAME n=8	نتیجه آزمون (ارقام P)
۱۰۰ پیکومول	۰	۰	P>۰/۰۵
۱ نانومول	۰	۴/۶۶±۱/۲۵	P<۰/۰۱
۱۰ نانومول	۱۰/۱۳±۲/۴۹	۲۴/۴۹±۱/۸۷	P<۰/۰۰۱
۱۰۰ نانومول	۴۲/۹۰±۷/۲۶	۵۳/۵۹±۲/۶۷	P>۰/۰۵
۱ میکرومول	۶۱/۵۹±۶/۷۸	۶۶/۳۱±۳/۷۳	P>۰/۰۵
۱۰ میکرومول	۶۴/۷۵±۵/۳۴	۷۷/۲۱±۲/۸۰	P>۰/۰۵



نمودار ۱ـ مقایسه بین غلظت ـ پاسخ انبساطی به داروی ISO از غلظت‌های 10^{-10} تا 10^{-5} در ٦ حلقه شریانهای اصلی با آندوتلیوم سالم در حضور و غیاب داروی L-NAME و در حلقه شریانهای بدون آندوتلیوم که با غلظت 10^{-7} مول با فنیل‌افرین قبلاً منقبض شده‌اند.

دایرهٔ تیره و مثلث روشن به ترتیب منحنی پاسخ غلظت به ISO در حلقه شریانهای اصلی ریه با آندوتلیوم سالم در غیاب و در حضور L-NAME و مثلث تیره در حلقه شریانهای بدون آندوتلیوم می‌باشد.



نمودار ۲ـ مقایسه بین غلظت ـ پاسخ انبساطی به داروی ISO از غلظت‌های 10^{-10} تا 10^{-5} در ۸ حلقه شریانهای فرعی با آندوتلیوم سالم در حضور و غیاب داروی L-NAME و در حلقه شریانهای بدون آندوتلیوم که با غلظت 10^{-7} مول با فنیل‌افرین قبلاً منقبض شده‌اند.

مربع روشن و مربع تیره به ترتیب منحنی پاسخ غلظت به ISO در حلقه شریانهای فرعی ریه با آندوتلیوم سالم در غیاب و در حضور L-NAME و مثلث روشن در حلقه شریانهای بدون آندوتلیوم می‌باشد.

علامت * : نشانه اختلاف معنی دار حلقه شریانهای ریوی با آندوتلیوم سالم در برابر ناسالم است.

علامت + : نشانه اختلاف معنی دار حلقه شریانهای ریوی با آندوتلیوم سالم در حضور و در غیاب L-NAME است.

بحث

این آزمایشات نشان داد که ایزوپروترنول حلقه شریانهای ریوی از پیش منقبض شده با فنیل افرین را چه در حضور و چه در غیاب آندوتلیوم منبسط می‌کند. برداشت آندوتلیوم یا پیش درمان حلقه شریانها با L-NAME پاسخ‌های انبساطی به ISO را در غلظت‌های کم کاهش می‌دهد ؛ ولی اثر روی حداکثر پاسخ‌های آن ندارد. با این وجود هنگامی که L-NAME پس از حداکثر پاسخ انبساطی به ۱۰ میکرومول ISO ایجاد شده اضافه می‌گردد، این اثر انبساطی ISO توسط L-NAME بطور نسبی برمی‌گشت و این اثر L-NAME نیز بطور ناچیزی توسط L-Arg مهار می‌شد.

این نتایج با پیشنهاد Bea و همکارانش مبنی بر اینکه برای ایجاد اثر انبساطی شریانی به ISO به NO نیاز نیست ولی حضور عملی آندوتلیوم ممکن است پاسخ انبساطی به آن را تسهیل نماید موافقت دارد (۷). این اثر انبساطی حلقه شریانهای ریوی به ISO نیز احتمالاً از طریق آزاد شدن NO پایه و سپس افزایش مقدار cGMP در عضلهٔ صاف عروق فراهم می‌گردد که تحقیق در اندازه‌گیری مقدار cGMP جهت روشن شدن این پیشنهاد توصیه می‌گردد. همچنین این نتایج نشان داد که پاسخ انبساطی شریانهای ریوی به ISO از طریق بتا آدرنوسپتورهای موجود در غشا سلول عضلهٔ صاف عروق فراهم می‌شود زیرا پروپرانولول ، آنتاگونیست بتا آدرنوسپتور پاسخ‌های انبساطی به ISO را ـ چه در حلقه شریانهای با آندوتلیوم سالم و چه بدون آندوتلیوم ـ کاهش می‌دهد یا متوقف می‌سازد. از طرفی این نتایج بیانگر آن است که حلقه شریانهای اصلی ریه در پاسخ به ISO پاسخ بیشتری نسبت به اولین شاخه‌هایش نشان می‌دهند. پیشنهاد می‌شود که ممکن است مکانیسمهای بتا آدرنوسپتورها در شریانهای اصلی ریه فعالتر از مکانیسم‌های آن در اولین شاخه‌هایش باشد.

References:

1. Hyman AL. Kadowitz PJ. Enhancement of α- and β- adrenoceptor responses by elevations in vascular tone in pulmonary circulation. Am J. 1986; 250: H1109-H1116.

2. Scheid CR. Honeyaman TW. Fay FS. β- adrenergic relaxation of smooth muscle. Nature.

1979; 277: 32-36.

3. Macdonald PS. Dubin PN. Dusting GJ. β- Adrenoceptors on endothelial cells do not influence release of relaxing factor in dog coronary arteries. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1987; 14: 525-534.
4. Orourke ST. Vanhoutte PM. Celiprolol has no direct or indirect relaxing effects in isolated arteries and veins. J Cardiovas Pharmacol. 1990; 15: 831-835.
5. Rubayi G. Vanhoutte PM. Endothelium - removal decreases relaxations of canine coronary arteries caused by β- adrenergic agonists and adenosine. J Cardiovase Pharmmacol. 1985; 7: 139-144.
6. Gray DW. Marshall I. Novel signal transduction pathway mediating endothelium- dependent β- adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. Br J Pharmacol. 1992; 107:1218-1224.
7. Bea ML. Ghaleh B. Giudicelli JF. Berdeaux A. Lack of importance of NO in β- adrenoceptor mediated relaxation of large epicardial canine coronary. Br J Pharmacol. 1994; 111: 981-982.