اثر همزمان افزایش نیتریک اکساید و مهار رادیکالهای آزاد اکسیژن بر تونوس آئورت موش صحرایی

مژده نوید حمیدی M.Sc.[☆]، مهری کدخدائی Ph.D.[☆♦]، منصور کشاورز Ph.D.[☆]
مهدیه فقیهی Ph.D.[☆]، حسینعلی عرب Ph.D.[☆]

☆ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

☆ دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه فیزیولوژی، فارماکولوژی و سم شناسی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۵۱۶۶-۵-۷۷۵۱، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

چکیده

* **هدف:** بررسی اثر توامان افزایش نیتریک اکساید و مهار رادیکالهای آزاد اکسیژن بر تونوس آئورت موش صحرایی

* **مواد و روشها:** بافتهای مورد آزمایش از آئورت توراسیک موشهای صحرایی نر (۳۲۰-۴۲۰g) پس از بیهوشی تهیه شد. سپس این قطعات به سیستم ایزوله متصل گردیده و انقباضات آئورت توسط دستگاه فیزیوگراف ثبت گردید. در این تحقیق گروههای اصلی شامل گروه SNP (10^{-5}M، n=۶، 10^{-10}-10^{-10} SNP، نیتروپروساید سدیم) و گروه DMTU+SNP (10^{-5}M، n=۶، 10^{-10}-10^{-10} SNP+8×10^{-5} M دی متیل تیواوره) بودند. میزان شل شدگی ایجاد شده توسط داروی SNP به تنهای و نیز میزان شل‌شدگی ایجاد شده توسط دو داروی DMTU+SNP در ۶ بافت بررسی، میانگین و خطای معیار IC_{50} دوگروه به روش student-test ارزیابی شد.

* **یافته‌ها:** نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که SNP می‌تواند باعث ایجاد شل‌شدگی (relaxation) در آئورت بشود. همچنین این دارو قادر است که اثر شل کنندگی DMTU را بر روی آئورت به طور معنی داری تشدید نماید ($IC_{50}=1/975\times10^{-10}$M و $P<0/0003$).

* **نتیجه‌گیری:** با استفاده از دُزهای متوسط دو داروی مهارکننده رادیکالهای آزاد اکسیژن و دهنده نیتریک اکساید، شل‌شدگی مناسبی در رگ ایجاد می‌شود. که این امر در کنترل فشار و میزان جریان خون اندامها و مواردی نظیر برقراری جریان خون پس از ایسکمی (که میزان تولید نیتریک اکساید کاهش و میزان تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن افزایش می‌یابد) قابل توجه است.

گل واژگان: نیتریک اکساید، رادیکالهای آزاد اکسیژن، آئورت، نیتروپروساید سدیم

مقدمه

سلولهای آندوتلیالی که سطح داخلی عروق را پوشانیده‌اند، ارتباط فعالی بین خون و سلولهای عضله صاف ایجاد می‌نمایند و این عمل را در پاسخ به محرکهای مکانیکی و شیمیایی مانند مواد وازواکتیو انجام می‌دهند. نیتریک اکساید (NO) و رادیکالهای آزاد مشتق از اکسیژن (OFR) از جمله مواد و ترکیبات تولید شده از روی این سلولها هستند(۱).

نیتریک اکساید ناشی از اندوتلیوم، با ایجاد تون گشادکننده مداوم در بستر عروق موجب خونرسانی بهتر اندامها می‌گردد (۲). اما برخی از محققان صدمات سلولی را متعاقب افزایش غلظت NO گزارش نموده‌اند (۳). از سوی دیگر همه سلولها قادر به تولید OFR هستند. این رادیکالها ترکیبات فعالی هستند که از طریق واکنش با اجزای مختلف سلولی موجب تحریک تولید مواد مؤثر بر سلولها می‌شوند. به عنوان نمونه نشان داده شده است که OFR با تولید ترومبوکسان A_2 موجب انقباض آئورت در موشهای صحرایی مبتلا به هیپرتانسیون می‌شود (۴). در سلولهای اندوتلیال، این رادیکالها به وسیله آنزیمهای گزانتین اکسیداز/دهیدروژناز ایجاد شده و یا از فضای خارج سلولی منتقل می‌شوند. گزانتین اکسیداز به عنوان یکی از منابع اصلی تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است. این آنزیم واکنش زیر را کاتالیز می‌کند:

$$XO+H2O2+O2^{\cdot -} \rightarrow X+2O2+H2O$$

در واکنش بالا، آنیون سوپراکساید ($O_2^{\cdot -}$) و پراکسید هیدروژن همزمان تولید می‌شوند (۵، ۶). OFR ترکیباتی است که به طور طبیعی در همه بافتهای بیولوژیک به وجود می‌آید. این ترکیبات، به ویژه رادیکال سوپراکساید ($O_2^{\cdot -}$) و رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) در ایجاد صدمه بافتی دخالت دارند (۶). رادیکالهای آزاد اکسیژن هم اثرات مفید و آثار زیان آوری بر سلولها دارند.

برخی از مطالعات نشان داده است که تولید رادیکالهای آزاد مشتق از اکسیژن، سبب ایجاد انقباض در بافت عروقی گردیده است (۱، ۴). همچنین گزارش شده است که افزودن آنتی اکسید، باعث افزایش فعالیت آنزیم تولیدکننده نیتریک اکساید می‌شود (۷). همچنین نشان داده شده است که رادیکالهای آزاد مشتق از اکسیژن قادرند که NO را غیر فعال کرده و تولید پروستاسیکلین را نیز در سلولهای اندوتلیال مهار کنند. اثر خالص این انقباض عروقی می‌باشد.

از سوی دیگر در مطالعات دیگری نشان داده شده که غلظتهای پایین داخل سلولی رادیکالهای آزاد اکسیژن در سلولهای اندوتلیال باعث تحریک آنزیم سیکلواکسیژناز، تولید پروستاسیکلین از این سلولها و در نتیجه القای وازودیلاتاسیون در بسترهای عروقی می‌گردد (۹). به این ترتیب علیرغم تحقیقات فراوان، هنوز اثرات دقیق رادیکالهای آزاد اکسیژن بر روی عروق مهم است و بررسی تداخل اثرات این رادیکالها با NO در این زمینه راهگشاست.

مواد و روشها

برای انجام این تحقیق موشهای صحرایی نر با وزن (۳۲۰-۴۲۰g) از نژاد (Sprague-Dawley) واز انیستیتو رازی تهیه شدند. حیوانات در حیوانخانه گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری می‌شدند. برای تهیه حلقه‌های آئورتی بیهوشی با استفاده از داروی کتامین هیدروکلراید (۸۰mg/kg/ip) داده شد. آئورت سینه‌ای بلافاصله بعد از بیهوشی بیرون آورده شده و در محلول کربس - هنسله (Kcl:۴/۷۰، Nacl:۱۱۸/۰، Gilcose:۵/۵۵، Kh2Po4:۱/۱۸، NaHCo3، MgS04:۱/۶۴، CaCL2:۲/۵۲ میلی‌مول، PH=۷/۴) سرد اکسیژنه قرار داده شد. سپس بافت همبند و چربی اطراف مجرای رگ جدا شده و داخل رگ نیز به آهستگی شستشو داده شد و بافت به قطعات ۵-۴ میلی‌متر تقسیم گردید. حلقه‌های آئورتی درون حمام بافتی ایزوله که از محلول کربس - هنسله پر شده در دمای حدود ۳۷°c قرار داده شده و بافت توسط قلاب پایه بافت و یک قلاب دیگر درون حمام بافتی ثابت نگه داشته شد. محلول هر پانزده دقیقه یکبار تعویض گردید. در این شرایط حدود یک گرم کشش به بافت وارد شد و بافت به مدت یکساعت تحت آداپتاسیون قرار گرفت. تغییرات تونوس بافت بوسیله ترانسدیوسر A-385 به دستگاه فیزوگراف NARCO منتقل و ثبت گردید.

* مواد مورد استفاده

در این تحقیق از داروی فنیل افرین جهت ایجاد انقباض اولیه (10^{-8}M)، نیترو پروساید سدیم داروی تولیدکننده نیتریک اکساید (10^{-5}M - 10^{-10})، دی متیل تیواوره داروی مهارکننده رادیکالهای آزاد اکسیژن (10^{-4}M - و 8×10^{-5})، استیل کولین برای اطمینان از سالم بودن اندوتلیوم (10^{-7}M) استفاده گردید.

* روش آزمایش

پس از اتصال و تطابق بافت با محیط حمام بافتی، برای اطمینان از سلامت اندوتلیوم از داروی استیل کولین (10^{-7}M) استفاده شد که سبب ایجاد شل شدگی واضحی در بافت گردید. پس از اطمینان از سلامت اندوتلیوم آزمایش به روش زیر ادامه یافت. ابتدا از داروی فنیل افرین (10^{-8}M) برای ایجاد انقباض اولیه استفاده شد. پس از رسیدن انقباض به حداکثر (کفه) دوگروه اول (n=۶) از داروی SNP به صورت دُز تجمعی (10^{-5}M - 10^{-10}) استفاده شد. در گروه دوم (n=۸) پس از ایجاد انقباض توسط داروی فنیل افرین (10^{-8}M)، از داروی دی متیل تیواوره (10^{-4}M) استفاده شد. در گروه سوم (n=۶) پس از ایجاد انقباض توسط داروی فنیل افرین ابتدا داروی DMTU (8×10^{-5}M) به حمام بافتی اضافه شده و سپس داروی SNP (10^{-5}M - 10^{-10}) به صورت تجمعی اضافه شد.

* محاسبات و آنالیز آماری

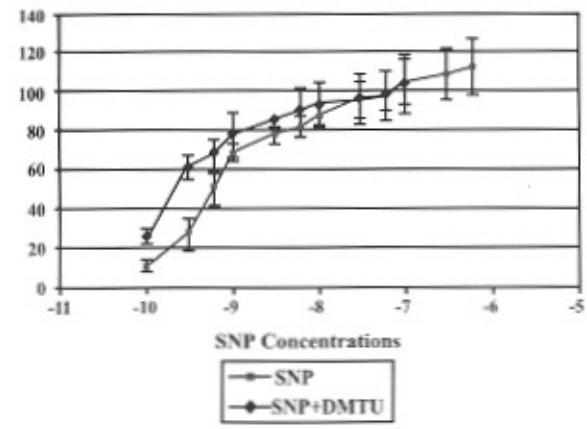
پاسخ انقباضی به فنیل افرین به عنوان پاسخ پایه در نظر گرفته شد و افزایش یا کاهش تونوس ناشی از تجویز داروها SNP و DMTU نسبت به آن سنجیده شد. میانگین و انحراف معیار پاسخ در هر غلظت از دارو

برای هر گروه محاسبه شد و منحنی دُز - پاسخ رسم گردید. برای مقایسه اثر داروها به دو صورت عمل شد. اولاً، تفاوت پاسخ در هر غلظت با استفاده از t-test بین دو گروه مقایسه شد. ثانیاً، برای مشخص نمودن تفاوت منحنیهای دُز - پاسخ IC_{50} هر گروه محاسبه و با استفاده از T-Test مقایسه بین دوگروه صورت پذیرفت. P-Value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

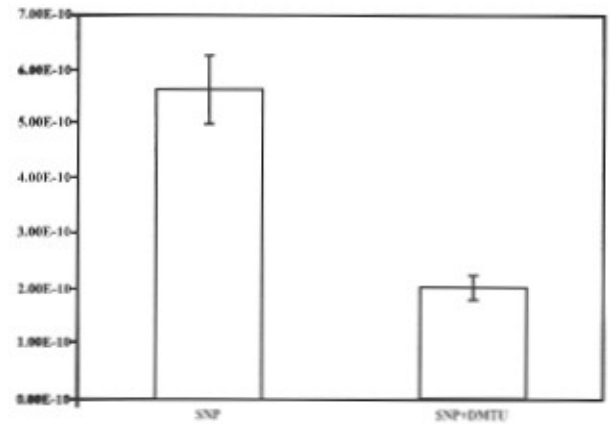
یافته‌ها

* شل شدگی ایجاد شده توسط داروی SNP

ابتدا از داروی فنیل افرین (10^{-8}M) برای ایجاد انقباض استفاده شد. پس از رسیدن انقباض به حداکثر مقدار (کفه) از SNP به صورت دُزهای تجمعی (10^{-5}M-10^{-10}) استفاده شد و شل شدگی قابل توجهی ایجاد گردید و در دُز (10^{-5}M) حداکثر شل شدگی ایجاد شد. میانگین IC50 در این گروه $5/583\times10^{-10}$M و خطای معیار $6/431\times10^{-11}$M بود (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱: اثرات SNP بر روی حلقه‌های آئورت مجزا در حضور DMTU



شکل ۲: مقایسه میزان متوسط IC_{50} بین دو گروه درمان شده با SNP و SNP+DMTU

* شل شدگی ایجاد شده توسط داروی DMTU

ابتدا از داروی فنیل افرین (10^{-8}M) برای ایجاد انقباض استفاده گردید و پس از رسیدن انقباض به حداکثر مقدار (کفه) از داروی DMTU (10^{-2}M) بر روی بافت منقبض شده استفاده شد (n=۶) و اثر شل شدگی واضحی مشاهده گردید. میانگین شل شدگی و خطای معیار به دست آمده در این گروه ۹/۰۴±۶۷/۰۶۹۸درصد بود.

* شل شدگی ایجاد شده توسط داروی SNP در حضور DMTU

پس از ایجاد انقباض توسط داروی فنیل افرین (10^{-8}M)، داروی SNP (10^{-5}M-10^{-10}) در حضور DMTU (10^{-5}M-۸×) اضافه شد (n=۶). میانگین IC_{50} در این گروه $1/9765\times10^{-5}$M و خطای معیار $2/524\times10^{-11}$M بود که نسبت به گروه SNP به تنهایی با VALUE P<۰/۰۰۰۳ اختلاف معنی دار داشته و موجب شل شدگی بیشتری می‌گردید (شکل ۱ و ۲).

بحث

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که در شرایط طبیعی، رادیکالهای آزاد اکسیژن نظیر آنیون سوپراکساید و رادیکالهای هیدروکسیل تأثیرات قابل ملاحظه‌ای بر روی اندوتلیوم دست نخورده آئورت دارند. بیشتر مطالعات بر پایه اثرات انقباضی این ترکیبات استوار است. برخی مطالعات اخیر نشان می‌دهد که آنتی اکسیدانها شل‌شدگی ناشی از NO را در شرایط هیپرکلسترولمی افزایش می‌دهند (۱۰). ولی در برخی از مطالعات دیگر به اثرات شل کنندگی این رادیکالهای بر روی اندوتلیوم اشاره شده است (۱۱). در این مطالعه DMTU که یک مهار کنندهٔ شناخته شده رادیکالهای آزاد اکسیژن بوده، از غشای لیپیدی به سرعت عبور کرده و بر روی OFR داخل سلولی اثر می‌گذارد، مورد استفاده قرار گرفت. تجویز DMTU سبب ایجاد پاسخ شل شدگی واضح در بافت آئورت ایزوله گردید. بر اساس نتایج این تحقیق روشن می‌گردد که رادیکالهای آزاد اکسیژن قادر به انقباض عروقی هستند. DMTU یکی از داروهای مهار کننده رادیکالهای آزاد اکسیژن است که بر انواع مختلفی از OFR تأثیر می‌گذارد، ولی اثر اختصاصی آن بر رادیکال ($\dot{O}H$) است (۱۲) و نیز مطالعات نشان می‌دهد که رادیکال هیدروکسیل قادر است که هر دو اثر شل کنندگی و انقباضی را بر روی بافت عروقی ایجاد نماید (۱۳). مطالعه اخیر نشان داد که در این شرایط احتمالاً رادیکال ($\dot{O}H$) قادر است که ایجاد انقباض در بافت آئورت را نماید. بررسی اثر توام دو داروی SNP و DMTU بر روی آئورت نشان می‌دهد که استفاده همزمان این دو دارو، سبب تشدید اثرات شل کنندگی SNP بر بافت آئورت می‌شود. به طوری که مقایسه IC_{50} داروی SNP در حضور DMTU با IC_{50} داروی SNP به تنهایی نشان می‌دهد که با حضور DMTU به دُز کمتری از SNP برای ایجاد شل شدگی در بافت آئورت نیازمندیم. به این معنی که حضور DMTU سبب کاهش IC_{50} داروی SNP می‌شود. با توجه به اینکه DMTU مهارکننده رادیکالهای آزاد اکسیژن بوده و اثر اختصاصی آن بر روی رادیکال هیدروکسیل می‌باشد می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً تأثیر OFR بر روی آئورت اثر انقباضی بوده و این تأثیر بیشتر مربوط به وجود رادیکال هیدروکسیل می‌باشد. بنابراین با استفاده توام از آزادکننده‌های NO و مهارکننده‌های رادیکال آزاد اکسیژن می‌توان اثر شل کنندگی NO را بر روی آئورت

افزایش داده و از این طریق میزان جریان خون رسیده به بافتها را در شرایط مختلف بالا برد.

References

1. Rubany, GM, Vanhoutte PM: Oxygen-derived free radicals,endothelium and responsiveness of vascular smooth muscles. Am Jphysiol 1986; 250: H 815-821
2. Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Kieler-Jenson N, Lundin S,Petersson A-S, waagstein F: Nitric oxide synthesis and metabolism in man.Ann NY Acad Sci 1994; 714: 158-164
3. Richter C, Gogvadze V, Schlapbach R, Schweizer M, Schlogel J: Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium Biochem Biophys Res Comm. 1994; 205: 1143-1150
4. Hibino M, Okumura K, Iwama Y, Mokuno S, Osanai H, Matsui H, Toki Y, Ito T: Oxygen-derived free radical-induced vasoconstriction bythromboxane A2 in aorta of the spontaneously hypertensive rat. J.Cardiovasc. Pharmacol. 1999; 33: 605-610
5. Kuppusamy P, Zweier JL: Characterization of free radical generation byxanthine oxidase: Evidence for hydroxyl radical generation. J Biol Chem 1989; 264: 9880-9884
6. Ashraf M, Samra ZQ: Subcellular distribution of Xanthine Oxidaseduring cardiac ischemia and reperfusion: Animmunocytochemical study. J Submicros Cytol Pathol 1993; 25(2):193-201
7. Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Trnavsky-Hobbs DL: Effect of antioxidanttherapy on blood pressure and NO synthase expression inhypertensive rats. Hypertention 2000; 36: 957-964
8. Rubanyi G, Vanhoutte P: Superoxide anions and hypoxia inactivatesendothelial derived relaxing factor. Am J phydiol 1986; 250: 822-827
9. Beny JL; Vander weid PY: Hyperpolarity factors. Coron Art Dis 1992; 2: 300-306
10. Adachi T, Matsui R, Xu S, Kirber M, Lazar HL, Sharov VS, Schoneich C, Cohen RA: Antioxidant improves smooth muscle sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase function andlowers tyrosine nitration in hypercholesterolemia and improves nitric oxide-induced relaxation. Circ Res 2002; 90: 1114-1121
11. Weir EK, Eaton JW, Chesler E: Redox status and pulmonary vascularreactivity. Chest 1985: 88: 249-251
12. Boli R, Jeroudi Mo, Patel BS, Arouma Ol, Iou EK, Mc Cay PB: Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction byantioxidant therapy began at the time of reperfusion. Circ Res 1989; 65: 607-622
13. Rosenblum WJ: Effects of free radical generation on mouse pialarterioles, Probable role of hydroxyl radicals. Am J physiol 1983 14: 139-142