Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۶، شماره ۱، پائیز ۱۳۸۳

نقش برادی‌کینین دراعمال پروتئین جدید افزاینده فشارخون (NPP) وابسته به FXIIa پلاسمایی انسانی

اکبر پژهان[۱*] (Ph.D)، پیتر پاپاجورجیو[۲] (Ph.D)، دنیل اسموند[۲] (Ph.D)

۱- دانشکده علوم پزشکی سبزوار، گروه فیزیولوژی

۲- دانشگاه تورنتو-کانادا، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

چکیده

سابقه وهدف: آزمایشات نشان می‌دهندکه دربیماران هایپرتنسیو فاقدکلیه، مقدار NPP و مقدار برادی‌کینین(BK) افزایش می‌یابد. هم‌چنین شناخته شده است که هم NPP و هم BK باعث رهایی کاتکولامین‌ها از بخش مرکزی غده آدرنال می‌شوند. بنابراین فرضیه ما این است که تزریق NPP باعث پیش‌برد تولید BK آندوژن می‌شود، که این امر ممکن است در بروز مشکلات قلبی و فشارخون NPP سهیم باشد. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات ضربان قلب (HR) و فشارخون سیستولیک (SBP) در اثر تزریق (BK) در موش‌های کنترل (sham-2NX) و موش‌های نفرکتومی شده (2NX) و مقایسه این اثرات با پاسخ‌های NPP است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژادWistar استفاده شد. ۲۴ ساعت پس از 2NX یا sham-2NX (کنترل) حیوان با داروی Inactin بی‌هوش شده و پس از تزریق داروی مسدودکننده گانگلیونی و یا کاپتوپریل (Cap)، برای اندازه‌گیری SBP و HR در پاسخ به تزریق BK ۱۰۰ ng/kg و ۱۰۰۰ ng/kg، NPP 20 µl.BK آماده گردید.

یافته‌ها: درگروه کنترل بدون Cap، کاربرد NPP پاسخ SBP را ۳±۳۲ میلی‌مترجیوه و HR را ۳±۲۰ ضربان در دقیقه افزایش داد.کاربرد ۱۰۰ BK پاسخ SBP را ۱±۲ میلی‌متر جیوه وHR را ۰/۵±۱ ضربان دردقیقه افزایش داد. پس از کاربرد۱۰۰۰ BK، این پاسخ‌ها به ترتیب ۳±۱۳ و۲±۱۳ بود. در موش‌های 2NX بدون Cap، کاربرد NPP پاسخ SBP را ۶±۵۸ میلی‌مترجیوه و HR را ۱۴±۷۰ ضربان در دقیقه افزایش داد. کاربرد ۱۰۰ BK پاسخ SBP را ۱±۴ و HR را ۱±۳ افزایش داد؛ اما با تزریق ۱۰۰۰ BK این مقادیر به ترتیب به ۱±۶ و ۱±۲ کاهش یافت. پس از کاربرد Cap در موش‌های کنترل، این پاسخ‌ها به شدت تقویت شد؛ ولی این درمان در موش‌های نفرکتومی، فقط پاسخ ۱۰۰ BK و۱۰۰۰ BK را تقویت نمود.

نتیجه‌گیری: در موش‌های کنترل، اثرات هردو دوز پائین و بالای BK روی SBP و HR مشابه اثرات NPP بوده و پس ازکاربرد Cap، این اثرات تقویت می‌گردد. اما این پاسخ‌ها در موش‌های 2NX به‌طور متفاوتی تحت تأثیر قرار می‌گیرد.کاربرد HOE-140 (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های B2) باعث بلوک کامل پاسخ‌های مربوط به BK می‌شود، ولی پاسخ‌های مربوط به NPP را به مقدار متوسط کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: NPP، فاکتور انعقادی XII، کاپتوپریل، برادی‌کینین، نفرکتومی

مقدمه

پروتئین جدید افزاینده فشارخون (NPP)، یک پروتئین

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۵۷۱-۴۴۴۶۰۳۰، نمابر: ۰۵۷۱-۴۴۴۶۰۰۸، E-mail: pejhan_a@yahoo.com

تاریخ دریافت:۱۳۸۲/۶/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۸۳/۹/۱۹

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیمی خارج کلیوی است که از پلاسمای نرمال انسان یا موش صحرایی که توسط تریپسین فعال شده باشد، به‌دست می‌آید. مطالعات بیوشیمیایی NPP انسانی، نشان می‌دهد که این پروتئین آنزیمی، در مقابل حرارت ناپایدار بوده و وزن مولکولی آن حدود ۳۰ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک آن بین ۴/۷ تا ۴/۹ می‌باشد. توالی N ترمینال آن (۱۹ اسیدآمینه) هومولوگی قوی با زنجیره سنگین قطعه بتا فاکتور انعقادی XII فعال شده انسانی ($BFXII_a$) دارد [۱۵،۱۱] اساس ساختمانی و عملی این پروتئین، نشان می‌دهد که هیچ‌گونه تشابهی با ترکیبات شناخته شده افزاینده فشارخون مثل رنین، آنژیوتانسین یا اندوتلین ندارد. تزریق مقادیر ناچیز NPP ناخالص انسانی یا NPP موش صحرایی (معادل ۱۰ تا ۲۰ میکرولیتر به موش صحرایی ۳۰۰ گرمی) باعث ایجاد پاسخ‌های دو فازی در فشارخون می‌شود که در ابتدا یك پاسخ کاهش فشارخون کوتاه مدت و به‌دنبال آن یك پاسخ افزایش فشارخون ۱۰ تا ۱۵دقیقه‌ای مشاهده می‌گردد و همراه با آن تعداد ضربانات قلب نیز افزایش می‌یابد [۴]. در موش‌های صحرایی که قبلاً گانگلیون‌های آن‌ها توسط پنتولینیوم بلوك شده و هم‌چنین توسط مهارگر سیستم رنین-آنژیوتانسین یعنی کاپتوپریل (Cap) درمان شده باشند، تزریق این مقادیر پائین NPP انسانی، فشارخون سیستولیك (SBP) را ۴۰ تا ۵۰ میلی‌مترجیوه و فشارخون دیاستولیك (DBP) را ۱۵ تا ۲۰ میلی‌مترجیوه و تعداد ضربانات قلب (HR) را ۷۰ تا ۹۰ ضربان در دقیقه افزایش می‌دهد. حجم ضربه‌ای، هم‌چنین افزایش یافته و بدون تغییر مقاومت کل محیطی، برون‌ده قلب به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و این نتایج پیشنهاد می‌کنند که مکانیسم عمل NPP از طریق ایجاد اثرات کرونوتروپیك و اینوتروپیك مثبت روی قلب است [۱۲].

هم‌زمان با بروز این اثرات قوی قلبی- عروقی، مشاهده می‌شود که مقدار کاتکولامین‌های پلاسما شدیداً افزایش می‌یابد و دیده شده است که منشأ این کاتکولامین ها بخش مرکزی غده آدرنال است. مقدار اپی‌نفرین پلاسما بیش از ۵۰ برابر افزایش می‌یابد، درحالی‌که مقدار نوراپی‌نفرین فقط ۱۰ برابر افزایش می‌یابد؛ بنابراین نسبت اپی‌نفرین به نوراپی‌نفرین بیش از ۲۰ برابر افزایش می‌یابد. در عین حال مقدار افزایش دوپامین، متوسط است. وجود این مقدار بالای کاتکولامین‌ها در پلاسما، پیشنهاد می‌کند که آن‌ها در مکانیسم عمل NPP و اثرات مشاهده شده، دخیل هستند. شواهد موجود پیشنهاد می‌کنند که NPP، باعث تولید و یا فراخوانی پپتیدهایی می‌شود که این پپتیدها در رهایش کاتکولامین‌ها از بخش مرکزی آدرنال سهیم هستند [۱۹].

این چنین یك همکاری عملی که توسط NPP شروع می‌شود، بیان‌گر حضور یك محور ارتباطی جدید بین FXII انعقادی با سیستم سمپاتوآدرنال و مکانیسم‌های تنظیم کننده فعالیت‌های قلبی ـ عروقی است.

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که در بیماران هایپرتنسیو همودیالیزی، مقدار NPP اندوژن افزایش می‌یابد [۱۶] و از طرف دیگر مشخص شده که در موش‌های صحرایی دارای نفروپاتی دیابتیك یا در موش‌های صحرایی دارای نارسایی کلیوی، مقدار برادی‌کنین (BK) در بافت‌های مختلف افزایش می‌یابد [۱۰،۲]) و BK می‌تواند از طریق تحریك گیرنده‌های B2 باعث رهایی کاتکولامین‌ها از سلول‌های کرومافین غده آدرنال گردد [۴،۳]. بنابراین هدف مطالعه حاضر این است که اثرات BK را روی SBP و HR در موش‌های صحرایی کنترل (sham-2NX) و موش‌های صحرایی نفرکتومی شده (2NX) بررسی نموده و سپس این اثرات را با اثرات حاصل از NPP، مقایسه نماید تا نقش BK درپاسخ‌های ناشی از NPP مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

پلاسمای انسانی وروش تهیه NPP ازآن. پلاسمای انسانی نرمال از بانك خون شهر تورنتو کانادا تهیه شدند. این پلاسماها از خون‌های دارای ماده ضدانعقادی CP2D (سیترات-فسفات-دکستروز) تهیه شده بودند. پس از تهیه این بسته‌های پلاسما یا آن‌ها در آب سرد قرار داده شده و بلافاصله

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده می‌شدند یا در لوله‌های پلاستیکی در بسته در دمای $-20\ ^{o}c$ فریز می‌شدند تا دفعات بعد از آن‌ها استفاده شود.

فعال کردن کنترل شده پلاسمای انسانی با ترپسین، بدین ترتیب است که ترپسین (تیپ III، گاوی، T-8253 از شرکت Sigma-Aldrich) به‌صورت محلول استوک در ۰/۰۰۲ مول/لیتر اسیدکلرئیدریک تهیه شده و به نسبت ۱۰-۳٪ حجم/حجم به پلاسما اضافه و مخلوط می‌شد تا به یك غلظت نهایی ترپسین ۱mg/ml برسیم. پس از اینکوبه کردن این پلاسما در دمای $23\ ^{o}c$ به‌مدت ۱۰ دقیقه، فریزکردن سریع آن در یخ خشك باعث ختم واکنش خواهد شد. می‌توان قبل از فریز کردن، این نمونه را در لوله‌های پلاستیکی به حجم ۱۰۰μl تقسیم کرده و سپس آن را در دمای $-40\ ^{o}c$ فریز کنیم. در هر روز آزمایش، یکی از این لوله‌های پلاستیکی تازه حاوی پلاسمای فعال شده (NPP) در داخل یخ قرار داده شد، تا برای تزریق وریدی به موش‌های صحرایی (۲۰ میکرولیتر به‌ازای هر موش ۳۰۰ گرمی) آماده شود.

داروهای استفاده شده.

(Pentolinium, Poulenc, Montreal, Que) Ansolysen به عنوان داروی بلوك کننده گانگلیونی در پلی‌وینیل‌پیرولیدون حل شده و با دوز ۱۹/۲ mg/kg تزریق می‌شد.

(Sigma-Aldrich C-4042, st Louis, Mo, USA) Captopril به‌عنوان مهارگر آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین، روزانه در سالین ۰/۹٪ حل شده و محلول تازه آن با دوز ۲/۵mg/kg تزریق می‌شد.

(Ingram and Bell, Toronto, ont) Atropin Sulphate در حین عمل جراحی کانول‌گذاری با دوز ۲/۴mg/kg به‌صورت زیرجلدی (s.c) تزریق می‌شد.

برادی‌کینین(Sigma,B-3359) Bk در آب مقطر حل شده و پس از تهیه محلول استوك ۲mg/ml، در لوله‌های پلاستیکی با حجم ۱۰۰μl بسته‌بندی و ابتدا در یخ خشك و سپس در دمای $-40\ ^{o}c$ فریز شده و در هر روز آزمایش، یك بسته آن در آب سرد قرار داده شده و پس از رقیق کردن با سالین ۰/۹٪ با دوزهای ۱۰۰ng/kg i.v و ۱۰۰۰ng/kg i.v به موش‌ها تزریق می‌شد. در طول انجام آزمایش، کلیه داروها در ظرف حاوی یخ معمولی نگهداری می‌شدند.

HOE-140 (Phoenix Pharmaceuticals, Inc. Mountain view, CA, USA) به‌عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های B2 برادی‌کینین در سالین ۰/۹٪ حل می شد تا محلول ۱۰۰ng/μl ایجاد شود. پس از ساخت، در دمای $4\ ^{o}c$ در یخ نگه‌داشته شده و دو دقیقه قبل از داروهای اصلی با دوز ۱۵ μg/kg i.v تزریق می‌شد.

روش جراحی برای انجام نفرکتومی دوطرفه (2NX) یا کنترل (sham-2NX).

مخلوطی از هالوتان ۳/۵٪ همراه با یك بخش اکسیژن و ۱۰ بخش نیتروزاکسید با یك جریان گازی ۳ لیتر در دقیقه به‌کار برده شد تا موش‌ها را بی‌هوش کند. سپس موش‌ها را روی صفحه تشریح قرار داده و یك ماسك روی بینی حیوان قرار داده شد تا مخلوطی از هالوتان ۲٪ همراه با یك بخش اکسیژن و ۱۰ بخش نیتروزاکسید را با جریان گازی ۱/۵ لیتر در دقیقه دریافت نماید و بی‌هوشی پیوسته‌ای ایجاد گردد. در تحت شرایط بی‌هوشی، موهای قسمت وسط پشت حیوان تراشیده و این ناحیه به کمك اتانول ۷۰٪ و محلول بتادین، ضدعفونی شد. سپس پوست در بالای نخاع و در امتداد خط میانی برش زده و به کنار کشیده شد. آن‌گاه یك برش لاترال در لایه عضلانی در سطح هر کلیه ایجاد گردید. حفره شکمی، باز شد و کلیه‌ها در داخل آن آشکار گردید، به کمك یك نخ ابریشمی نمره ۰-۱ عروق کلیوی بسته شد. کپسول روی کلیه کنار زده شد، تا غده آدرنال آسیب نبیند. کلیه‌ها حذف گردید و برش‌های عضلانی با یك نخ ابریشم نمره ۰-۳ بخیه زده شد. برش خط میانی پوست نیز به کمك گیره‌های فلزی ۹ میلی‌متری بسته شد. سپس حیوان به قفس منتقل گردید تا مرحله ریکاوری را طی نماید و در طول این مدت آب و غذای کافی در دسترس او قرار گرفت. ۲۴ساعت پس از عمل جراحی نفرکتومی، حیوان برای آزمایش و ثبت آماده می‌شد. در موش‌های کنترل نفرکتومی (sham-2NX) که به

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان گروه کنترل جراحی به‌کاررفتند، کلیه اعمال جراحی فوق انجام می‌شد ولی کلیه را به کمك پنس فقط جابجا کرده و حذف نمی‌شد.

آماده سازی موش‌ها برای ثبت مستقیم فشارخون سیستولیك (SBP) و تعداد ضربانات قلب (HR). همه حیوانات مطابق با اصول و روش کار ارائه شده توسط انجمن کانادا نگهداری شده و طراحی و انجام کلیه آزمایش‌ها توسط کمیته‌های مراقبت از حیوانات در دانشکده پزشکی دانشگاه تورنتو کانادا موافقت شده است. موش‌های صحرایی نر نژاد Wistar با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم مطابق با روش Pickens و همکاران [۱۷] و با کمی تغییر در روش کار برای ثبت آماده می‌شدند. موش‌ها در ظروف استاندارد فلزی نگهداری شده و دسترسی کافی به آب و غذا داشتند.

در ابتدا به کمك داروی Inactin (۱۰۰mg/kg i.p) موش‌ها بی‌هوش و سپس داروی سولفات آتروپین (۲/۴ mg/kg s.c) به حیوان تزریق شد تا جلوی هرگونه کاهش فعالیت قلب که در اثر بی‌هوشی به‌وجود می‌آید گرفته شود و ضمناً ترشحات برونشی را حین عمل جراحی کاهش دهد. از طریق ایجاد یك برش در خط میانی گردن، درست زیر ایستموس تیروئید یك تراکئوستومی انجام شد تا از انسداد مجرای تنفسی جلوگیری شود. سپس تنه‌های اعصاب واگ که روی هر دو شریان کاروتید قرار داشتند در همان سطح قطع شد تا مانع بروز رفلکس برادی‌کاردی گردد. برای ثبت مستقیم فشارخون سیستولیك شریانی (SBP) و تعداد ضربانات قلب (HR) یك لوله پلی‌اتیلن PE-50 در یکی از شریان‌های کاروتید مشترك کانول‌گذاری می‌شد. آن‌گاه به کمك یك دستگاه مبدل فشار Stathman DC که به یك سیستم جمع‌کننده اطلاعات به نام Maclab/8 متصل بوده و آن هم به یك کامپیوتر دارای برنامه نرم‌افزاری Maclab chart version 3.5.6 است، فاکتورهای فوق اندازه‌گیری شد. کانول شریان کاروتید توسط سالین هپارینه (سالین فیزیولوژیك حاوی ۲۰U /ml هپارین) پر و گه‌گاهی هم حدود ۰/۱ میلی‌لیتر از این مایع به‌داخل کانول تزریق می‌شد تا مانع ایجاد لخته خون در کانول گردد. یك فشارسنج جیوه‌ای نیز به‌کار رفت تا در هر روز آزمایش، سیستم ثبت را کالیبره کند.

همه تزریقات وریدی توسط یك سرنگ 27-gauge که به آن یك کانول پلی‌اتیلن PE-20 متصل بود انجام شد. این کانول به‌راحتی در داخل ورید فمورال فرو میرود و هیچ مشکلی از نظر بازگشت وریدی در محل تزریق ایجاد نمی‌کند. بعد از تزریق دارو، حدود ۰/۱ میلی‌لیترسالین فیزیولوژیك، به داخل کانول تزریق شد، تا تمام دارو را به داخل ورید منتقل نماید. داروی بلوك‌کننده گانگلیونی Ansolysen (Pentolinium tartarat salt) در ماده پلی‌وینیل پیرولیدون حل شد تا در طول آزمایش به‌تدریج از این محلول رها شده و اثر آن طولانی مدت باشد. این دارو با دوز ۱۹/۲ mg/kg در پایان عمل جراحی و قبل از شروع ثبت به تمام موش‌ها تزریق شد. داروی مهارگر آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین یعنی کاپتوپریل، ابتدا در سالین فیزیولوژیك حل شده و سپس با دوز ۲/۵ mg/kg پس از عمل جراحی موش‌ها و ۴۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش تزریق شد. فقط موش‌هایی که در هنگام جراحی دارای حداقل خونریزی و آسیب بافتی بوده و در ضمن فشارخون آن‌ها پایدار بود (80/40 mmHg~) و تعداد ضربانات آن‌ها (۳۵۰beat/min~) بود برای آزمایش و ثبت، انتخاب شدند.

روش اجرای آزمایش‌ها. موش‌های مورد مطالعه به دو گروه موش‌های کنترل (sham-2NX) و موش‌های نفرکتومی شده (2NX) تقسیم شدند. هر کدام از این گروه‌ها دارای دو زیرگروه بودند. یك گروه کاپتوپریل دریافت کردند (Cap+) و گروه دیگر کاپتوپریل دریافت نکردند (Cap-). در هر زیرگروه ۸ تا ۱۲ موش مورد آزمایش قرار گرفته و هر موش فقط یك دوز از NPP 20μl، BK ۱۰۰ng/kg و BK ۱۰۰۰ ng/kg را به صورت داخل وریدی (i.v) دریافت می‌کرد و هم‌زمان اندازه‌گیری SBP و HR انجام می‌شد. هم‌چنین در یك گروه از موش‌های کنترل که کاپتوپریل نیز دریافت کرده بودند اثر آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های B_2

www.SID.ir

Archive of SID

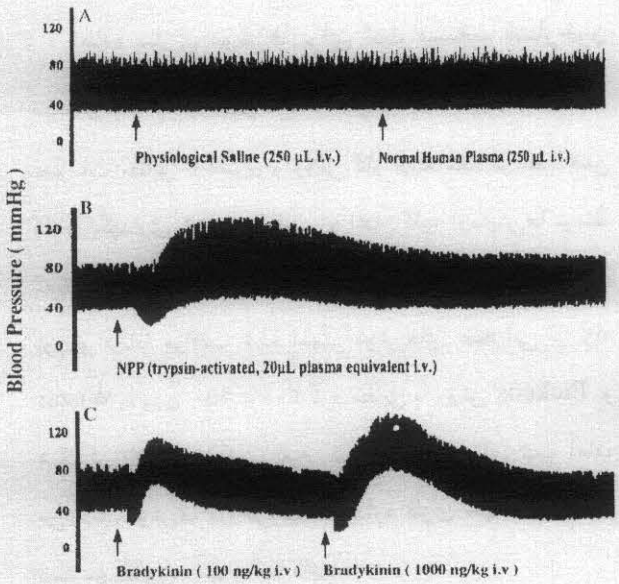
برادی‌کینین (HOE-140) روی پاسخ‌های NPP و BK بررسی شد.

روش های آماری. اعداد به‌دست آمده از آزمایش‌ها به کمك برنامه تحلیل آماری Maclab (Instat for Macintosh,Graph Pad software v.1.2) تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به‌صورت Mean±SEM بیان شده‌اند. مقایسه‌های آماری با استفاده از تست آنالیز واریانس یك‌طرفه یا آزمون student T-test انجام شده و مقادیر با $p < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

نتایج

اثرات تزریق مستقیم داخل وریدی NPP انسانی و برادی‌کینین. تزریق سالین فیزیولوژیك یا پلاسمای انسانی فعال نشده، فشارخون را در موش‌های مورد مطالعه تغییر نمی‌دهد. (یعنی هیچ‌گونه فعالیت NPP مشاهده نمی‌گردد) (شکل 1-A)، ولی همان‌گونه که در شکل 1-B,C دیده می‌شود تزریق NPP (معادل ۲۰ میکرولیتر پلاسمای انسانی فعال شده با تریپسین) یا تزریق BK ۱۰۰ng/kg یا BK ۱۰۰۰ ng/kg به‌طور وابسته به دوز باعث ایجاد یك پاسخ دوفازی (در ابتدا افت کوتاه مدت فشارخون و به دنبال آن یك پاسخ قوی افزایش فشارخون) می‌شود؛ که این پاسخ برای NPP حدود ۱۵ دقیقه و برای BK حدود ۵ دقیقه طول می‌کشد.

اثر پیش‌درمانی با کاپتوپریل، روی پاسخ‌های فشارخون و ضربان قلب پس از تزریق NPP انسانی و برادی‌کینین در موش‌های کنترل. همان‌گونه که شکل ۲ نشان می‌دهد، تزریق NPP و BK به موش‌های کنترل، باعث ایجاد پاسخ‌های مشابهی در SBP و HR می‌گردد ولی از نظر مقدار پاسخ باهم تفاوت دارند. پاسخ‌های SBP و HR نسبت به تزریق NPP بیش‌تر از BK است. پیش‌درمانی حیوانات با کاپتوپریل باعث تقویت بسیار شدید این پاسخ‌ها می‌گردد و پاسخ‌های NPP تا ۲ برابر و پاسخ‌های BK، ۴ تا ۲۸ برابر افزایش می‌یابد، در حالی‌که تقویت پاسخ‌های HR برای NPP حدود ۵ برابر و برای BK حدود ۶ تا ۴۶ برابر است.

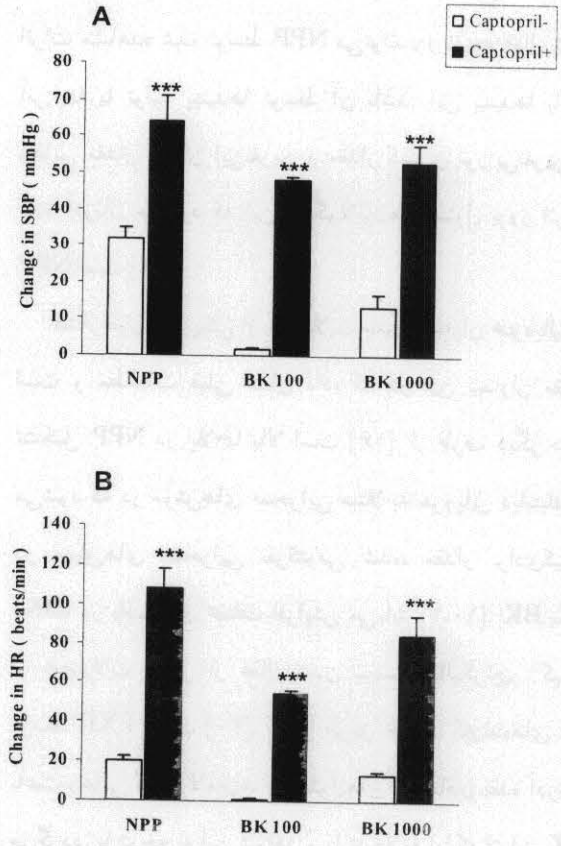


شکل ۱. پاسخ‌های ثبت شده فشارخون موش‌های صحرایی پس از تزریق سالین فیزیولوژیك، پلاسمای نرمال انسانی فعال نشده (A)، پروتئین جدید افزاینده فشارخون NPP (B) و برادی‌کینین (C). تزریق NPP انسانی (معادل ۲۰ میکرولیتر پلاسمای فعال شده، داخل وریدی) یك پاسخ افزایش فشارخون را به مدت ۱۵ دقیقه و تزریق برادی‌کینین (۱۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر کیلوگرم، داخل وریدی) یك پاسخ افزایش فشارخون را به مدت ۵ دقیقه ایجاد می‌کند. تزریق سالین فیزیولوژیك (۲۵۰ میکرولیتر، داخل وریدی) یا تزریق پلاسمای نرمال انسانی فعال نشده با تریپسین (۲۵۰ میکرولیتر، داخل وریدی) هیچ تغییری در فشارخون ایجاد نمی‌کند.

اثر نفرکتومی بر پاسخ‌های فشارخون و ضربان قلب پس از تزریق NPP انسانی و برادی‌کینین. شکل ۳ نشان می‌دهد که نفرکتومی به تنهایی می‌تواند پاسخ‌های SBP و HR را برای NPP و BK ۱۰۰ تقویت نماید ولی پاسخ‌های BK ۱۰۰۰ را کاهش می‌دهد. پیش‌درمانی این حیوانات با کاپتوپریل، تغییری در پاسخ SBP و HR نسبت به تزریق NPP ایجاد نمی‌کند ولی این درمان باعث تقویت پاسخ‌های SBP و HR نسبت به تزریق هر دو دوز BK می‌شود.

www.SID.ir

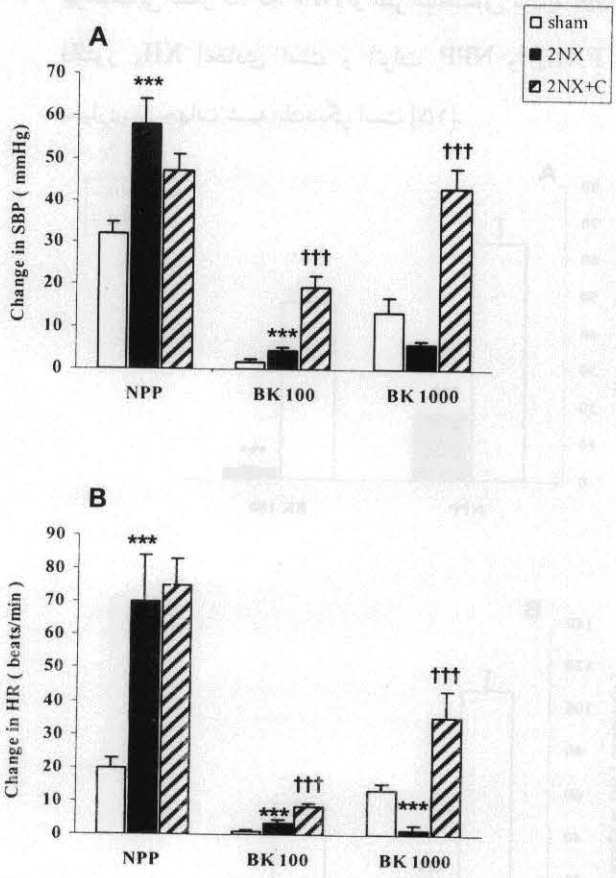
کتابخانه منطقه‌ای علوم و فنون شیراز
Archive of SID



شکل ٢. اثر NPP انسانی (معادل ٢٠ میکرولیتر پلاسمای فعال شده، داخل وریدی) یا برادی‌کینین (١٠٠ و ١٠٠٠ نانوگرم بر کیلوگرم، داخل وریدی) روی فشارخون سیستولیك (SBP، میلی‌متر جیوه، قسمت A) و روی تعداد ضربانات قلب (HR، ضربان در دقیقه، قسمت B). ستون‌های خالی نمایانگر پاسخ قبل از کاپتوپریل و ستون‌های توپر نمایانگر پاسخ پس از کاربرد کاپتوپریل (٢/٥ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل وریدی) است. افزایش در SBP و HR در مقایسه با قبل از تزریق کاپتوپریل با P<٠/٠٠١ معنی‌دار است (Mean ±SEM, n=٨-١٢).

اثر HOE-140 روی پاسخ‌های فشارخون و ضربان قلب ناشی از تزریق NPP و برادی‌کینین.

کاربرد HOE-140 آنتاگونیست بسیار اختصاصی و قوی گیرنده‌های B_2 برادی‌کینین با دوز (١٥ $\mu g/kg$) به‌طور معنی‌داری اثرات NPP را روی SBP تا ٧٢٪ و روی HR تا ٨٦٪ کاهش می‌دهد. پس از کاربرد این آنتاگونیست، پاسخ‌های BK١٠٠ ng/kg برای SBP تا ٩٢٪ و برای HR تا ٩٩٪ کاهش می‌یابد (شکل ۴).



شکل ٣. اثر نفرکتومی دوطرفه (2NX) و اثر کاربرد کاپتوپریل پس از نفرکتومی دوطرفه (2NX+C) بر پاسخ‌های فشارخون سیستولیك (SBP، میلی‌متر جیوه، قسمت A) و تعداد ضربانات قلب (HR، ضربان در دقیقه، قسمت B) ناشی از تزریق NPP (معادل ٢٠ میکرولیتر پلاسمای فعال شده، داخل وریدی) یا تزریق برادی‌کینین (١٠٠ و ١٠٠٠ نانوگرم بر کیلوگرم، داخل وریدی. P<٠/٠٠١ *** نمایانگر تفاوت معنی‌دار بین موش‌های کنترل (sham) و موش‌های نفرکتومی شده (2NX) بوده و p<٠/٠٠١ ††† نمایانگر تفاوت معنی‌دار بین موش‌های 2NX قبل از کاربرد کاپتوپریل (ستون‌های توپر) و پس از کاربرد کاپتوپریل (٢/٥ میلی‌گرم برکیلوگرم، داخل وریدی) (ستون‌های هاشور خورده) می‌باشد. (Mean±SEM و n=٨ - ١٢).

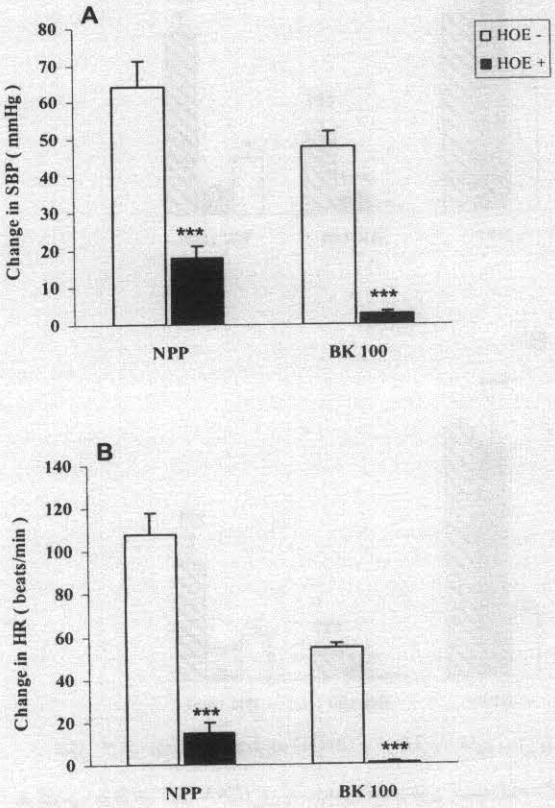
بحث

اثر افزاینده فشارخون NPP برای اولین بار در پلاسمای انسانی یا پلاسمای موش صحرایی که توسط تریپسین فعال شده بود مشاهده گردید [١١،١۴]، تزریق این نمونه‌های پلاسمای فعال شده (٢٠ میکرولیتر پلاسما، داخل وریدی) به موش‌های صحرایی که گانگلیون آن‌ها بلوك شده باشد، اثرات قوی افزایش فشارخون و ضربان قلب را ایجاد می‌کند. مطالعات

www.SID.ir

Archive of SID

بیوشیمیایی نشان داد که NPP از نظر ساختمانی مشابه قطعه β فاکتور XII_a انعقادی است و اثرات NPP و $FXII_a$ در بسیاری از جهات شبیه یک‌دیگر است [۱۵].



شکل ۴. اثر پیش‌درمانی با HOE-140 (۱۵ میکروگرم بر کیلوگرم، داخل وریدی) روی پاسخ‌های فشارخون سیستولیک (SBP، میلی‌متر جیوه، قسمت A) و تعداد ضربانات قلب (HR، ضربان در دقیقه، قسمت B) ناشی از تزریق NPP (معادل ۲۰ میکرولیتر پلاسمای فعال شده، داخل وریدی) یا برادی‌کینین (۱۰۰ نانوگرم بر کیلوگرم، داخل وریدی). P<۰/۰۰۱ *** نمایانگر تغییر معنی‌دار در میزان پاسخ قبل از کاربرد HOE-140 (ستون‌های خالی) و پس از کاربرد HOE-140 (ستون‌های توپر) می‌باشد. (Mean ±SEM, n=۸-۱۲).

برخلاف آن‌چه که انتظار می‌رود دیده می‌شود که کاربرد داروهای ضد فشارخون از نوع مهارکنندگان آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین ($ACEI_s$) نه تنها جلوی پاسخ افزایش NPP را نمی‌گیرد بلکه آن را شدیداً تقویت نیز می‌نماید [۱۴]. به‌نظر نمی‌رسد که اثرات مشاهده شده توسط تزریق NPP مستقیماً توسط خود این ماده ایجاد شود زیرا از آن‌جا که این ماده یک پروتئین آنزیمی بوده و مشابه FXII است، می‌تواند در بسیاری از واکنش‌های آنزیمی و تولید مواد، شرکت نماید و بنابراین اثرات مشاهده شده توسط NPP می‌تواند در نتیجه فعال شدن آنزیم‌ها یا تولید پپتیدها توسط آن باشد. این پپتیدها باعث رهایی مقدار فراوان اپی‌نفرین و مقدار کمتری نوراپی‌نفرین از غده آدرنال می‌شود که این کاتکولامین‌ها مسئول بروز اثرات NPP است [۱۹].

فشارخون بالا یکی از مشکلات جدی بیماران همودیالیزی است و مطالعات قبلی نشان داده که در این بیماران مقدار تشکیل NPP در پلاسما بالا است [۱۶]. از طرف دیگر دیده می‌شود که در موش‌های صحرایی مبتلا به نفروپاتی دیابتیک یا در موش‌های صحرایی نفرکتومی شده، مقدار برادی‌کینین (BK) در بافت‌های مختلف افزایش می‌یابد [۱۰،۲]. BK یکی از محصولات ناشی از فعال شدن سیستم کالیکرئین -کینین توسط FXII است [۲۰]، که از طریق تحریک گیرنده‌های B_2 باعث رهایی کاتکولامین‌ها از سلول‌های کرومافین غده آدرنال می‌گردد. با توجه به این شواهد و با توجه به این‌که اثرات BK نیز توسط داروهای $ACEI_s$ تقویت می‌گردد [۴،۳]، این فرضیه مطرح می‌شود که BK در میانجی‌گری اعمال NPP دخیل است.

آزمایشات اولیه نشان داد که تزریق BK در دوزهای پائین و بالا به موش‌های صحرایی کنترل باعث افزایش SBP و HR شده و الگوی پاسخ، مشابه NPP است (شکل ۱). پاسخ افزایش فشارخون ناشی از BK همانند پاسخ NPP چندفازی است. این تشابه اثر، یکی از شواهدی است که دخالت BK را در مکانیسم عمل NPP تأیید می‌کند ولی به‌هرحال تفاوت‌هایی هم مشاهده می‌شود از جمله این‌که مدت زمان اثر BK کوتاه‌تر از مدت زمان اثر NPP است و دلیل آن این است که در پلاسما چندین آنزیم برای تخریب BK وجود دارد و بنابراین نیمه عمرآن کوتاه می‌شود [۵]. با توجه به این‌که فاز اول پاسخ BK یک فاز هایپوتنسیو است، این پاسخ می‌تواند ناشی از اثر مستقیم BK روی گیرنده‌های آن در عروق و تولید نیتریک اکسید و پروستاگلاندین‌ها و به‌دنبال آن اتساع عروق باشد [۱۸،۶] هم‌چنین مطالعات انجام شده نشان می‌دهد

www.SID.ir

Archive of SID

که BK قادر است باعث رهایی نورآدرنالین از پایانه‌های عصبی دیواره قلب [۱۳] یا باعث رهایی کاتکولامین‌ها از سلول‌های کرومافین آدرنال گردد [۴،۳]. این رهایش موضعی یا سیستمیک کاتکولامین‌ها می‌تواند موجب افزایش فعالیت انقباضی قلب و بنابراین افزایش فشارخون شده و فاز هایپرتنسیو BK را ایجاد نماید. مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهند BK قادر است باعث افزایش فشارخون گردد [۷].

برای ارزیابی نقش سیستم رنین –آنژیوتانسین در بروز اثرات مشاهده شده NPP و BK، تزریق داروی کاپتوپریل قبل از تزریق NPP و BK انجام شد و نتایج به‌دست آمده قبلی نشان داد که با مهار آنزیم ACE نه تنها از پاسخ NPP جلوگیری نمی‌شود، بلکه پاسخ شدیداً تقویت می‌شود [۱۴،۱۱]. در این مطالعه نیز نتایج به‌دست آمده (شکل ۲) نشان می‌دهد که کاربرد کاپتوپریل باعث تقویت شدید پاسخ‌های SBP و HR نسبت به تزریق NPP و BK می‌گردد و از این نظر اثرات این دو ماده شبیه هم است. مکانیسم تقویت اثرBK پس از کاربرد داروهای $ACEI_s$ مثل کاپتوپریل به‌خاطر مهار آنزیم ACE (کینیناز II) و بنابراین جلوگیری از تخریب BK و سایر پپتیدها می‌باشد که این پپتیدها در بروز اثرات NPP دخیل هستند [۸،۳].

۲۴ ساعت پس از ایجاد نفرکتومی دوطرفه در موش‌ها، پاسخ‌های SBP و HR نسبت به تزریق NPP و BK۱۰۰ شدیداً تقویت می‌شود ولی پاسخ HR مربوط به BK۱۰۰۰، کاهش می‌یابد (شکل ۳). مکانیسم تقویت پاسخ‌های SBP و HR توسط نفرکتومی این است که در اثر این پدیده، بخش زیادی از آنزیم‌های ACE و NPP که قبلاً در کلیه‌ها وجود داشته و عمل تخریب پپتیدهای واسط NPP و BK را بر عهده داشته‌اند حذف گردیده‌اند و بنابراین پاسخ، تقویت می‌گردد [۱]. هم‌چنین این نتایج نشان می‌دهند که اثر نفرکتومی یا اثرتوأم نفرکتومی و کاپتوپریل روی پاسخ HR ناشی از تزریق NPP خیلی بیش‌تر از BK است. کاربرد کاپتوپریل در موش‌های نفرکتومی شده اثری بر پاسخ‌های NPP ندارد، ولی باعث تقویت شدید پاسخ‌های BK می‌شود. دلیل احتمالی این پدیده این است که در تخریب پپتیدهای واسط NPP آنزیم‌های داخل کلیوی نقش بیش‌تری دارند، درحالی‌که در تخریب BK نقش آنزیم‌های خارج کلیوی بیش‌تر است. بنابراین اثرات NPP و BK در دوزهای پائین و بالا روی SBP وHR تا حدودی با هم متفاوت بوده و توسط نفرکتومی و کاپتوپریل به‌طور متفاوتی تحت تأثیر قرار می‌گیرند.

نتایج به‌دست آمده پس از کاربرد HOE-140 (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های B_2 برادی‌کینین) نشان می‌دهد که پاسخ‌های SBP و HR مربوط به NPP به‌طور متوسط و پاسخ‌های مربوط به BK به‌طور کامل مهار می‌شود و اثر این درمان روی پاسخ HR مربوط به BK شدیدتر است (شکل ۴). این پدیده نشان می‌دهد که تنظیم قدرت انقباض قلب و ضربانات قلب از طریق مسیرهای جداگانه‌ای انجام می‌شود. BK از طریق تحریک گیرنده‌های B_2 باعث رهایی کاتکولامین‌ها می‌شود [۱۳،۴،۳]، بنابراین مهار گیرنده‌های B_2 باعث جلوگیری از این اثر و بروز پاسخ می‌گردد، چون پس از کاربرد این آنتاگونیست، پاسخ NPP نیز کاهش یافته است می‌توان گفت که BK در بروز پاسخ NPP سهیم است. از طرف دیگر ناتوانی HOE-140 در مهار کامل اثرات NPP نمایانگر این است که احتمالاً غیر از BK مدیاتورهای دیگر نیز در بروز پاسخ NPP دخیل هستند و آن‌ها نیز باید مطالعه گردند. مطالعات، نشان می‌دهد که در هنگام آسیب عروق، تماس خون با سطوح باردار منفی از قبیل مولکول‌های پلی‌ساکارید سولفات‌دار غشاء پایه باعث فعّال شدن سیستم تماسی انعقاد خون شده و این امر منجر به تولید BK می‌گردد. شروع کننده این زنجیره واکنش‌های انعقادی خون، FXII (فاکتور هاگمن) و HMWK (کینینوژن با وزن مولکولی بالا) است. اتصال FXII با این سطوح باردار منفی و فعال شدن مولکول آن و به‌ویژه قطعه β آن باعث ایجاد یك تغییر شکل ساختمانی و بنابراین تبدیل آنزیم پرکالیکرئین به کالیکرئین می‌شود. آنزیم کالیکرئین باعث جداشدن BK از HMWK می‌شود [۹]. از آن‌جا که NPP دارای توالی مشترك با قطعه β فاکتور XII می‌باشد، بنابراین امکان دارد که NPP نیز بتواند با

www.SID.ir

Archive of SID

فعال کردن سیستم تماسی انعقاد خون باعث تولید BK شود و این نیز یکی از دلایل دیگر است که نقش BK را در بروز پاسخ NPP تأیید می‌نماید. روی هم رفته این مشاهدات حاکی از این است که گرچه تفاوت‌های اندکی بین نحوه عمل NPP و BK وجود دارد ولی با تشابهات عمل بسیاری که بین این دو ماده دیده می‌شود، حاکی از این است که BK یکی از مدیاتورهای عمده برای بروز اثرات NPP است ولی روشن است که تنها مدیاتور دخیل نمی‌باشد.

این یافته‌ها نمایانگر وجود یك محور ارتباطی جدید بین سیستم انعقادی خون (NPP) و سیستم سمپاتوآدرنال (رهایی کاتکولامین‌ها) است که در کنترل فشارخون سهیم است. در شرایط التهابی، ترومبوتیك یا حالات کلینیکی تروماتیك هرگونه رهایی یا تولید NPP اندوژن می‌تواند باعث رهایی کاتکولامین‌ها شده و فشارخون و ضربانات قلب را افزایش دهد. این امر می‌تواند با اثرات مفید درمانی داروهای $ACEI_s$ تداخل کند. تحقیقات بیش‌تر راجع به NPP و مکانیسم عمل آن روشن خواهد کرد که اگر واقعاً NPP به‌طور اندوژن تولید شود می‌تواند این اثرات گزارش شده NPP اگزوژن را ایجاد کند.

تشکر و قدردانی

این طرح با کمك مالی انجمن بیماری‌های قلب وحملات قلبی کانادا و راهنمایی پروفسور دنیل اسموند و با همکاری بخش فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تورنتو کانادا انجام شده است؛ که از همکاری صمیمانه آنان تشکر می‌نمائیم. همچنین از همکاران محترم بخش کامپیوتر دانشکده علوم پزشکی سبزوار که در تایپ مقاله ما را یاری نموده‌اند قدردانی می‌نمائیم.

منابع

[1] Campbell DJ, Anastasopoulos F, Duncan AM, James GM, Kladis A, Briscoe TA. Effects of neutral endopeptidase inhibition and combined angiotensin converting enzyme and neutral endopeptidase inhibition on angiotensin and bradykinin peptides in rats. J Pharmacol Exp Ther, 1998 Nov; 287(2): 567-77.

[2] Campbell DJ, Kelly DJ, Wilkinson-Berka JL, Cooper ME, Skinner SL. Increased bradykinin and "normal" angiotensin peptide levels in diabetic Sprague-Dawley and transgenic (mRen-2)27 rats. Kidney Int, 1999 Jul; 56(1): 211-21.

[3] Dendorfer A, Hauser W, Falias D, Dominiak P. Bradykinin increases catecholamine release via B2 receptors. Pflugers Arch, 1996; 432(3 Suppl): R99-106.

[4] Dendorfer A, Fitschen M, Raasch W, Tempel K, Dominiak P. Mechanisms of bradykinin-induced catecholamine release in pithed spontaneously hypertensive rats. Immunopharmacology, 1999 Oct 15; 44(1-2): 99-104.

[5] Dendorfer A, Wolfrum S, Schafer U, Stewart JM, Inamura N, Dominiak P. Potentiation of the vascular response to kinins by inhibition of myocardial kininases. Hypertension, 2000 Jan; 35(1 Pt 1): 32-7.

[6] Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, Gavras H. Vasoactive potential of the b(1) bradykinin receptor in normotension and hypertension. Circ Res, 2001 Feb 16; 88(3): 275-81.

[7] Hoagland KM, Maddox DA, Martin DS. Intrarenal infusion of bradykinin elicits a pressor response in conscious rats via a B2-receptor mechanism. Can J Physiol Pharmacol, 1999 Aug; 77(8): 563-70.

[8] Johnston CI. Biochemistry and pharmacology of the renin-angiotensin system. Drugs, 1990; 39 Suppl 1: 21-31.

[9] Kaplan AP. Editor. Progress in homeostasis and thrombosis. Inhibition of the intrinsic coagulation and fibrinolitic pathways of man: the role of surfaces, hageman factor, prekallikrein, high molecular weight kininogen and factor XI. New York: Grune and Stealton; 1978.

[10] Mackie FE, Campbell DJ, Meyer TW. Intrarenal angiotensin and bradykinin peptide levels in the remnant kidney model of renal insufficiency Kidney Int, 2001 Apr; 59(4): 1458-65.

[11] Mavrogiannis L, Kariyawasam KP, Osmond DH. Potent blood pressure raising effects of activated coagulation factor XII. Can J Physiol Pharmacol, 1997 Dec; 75(12): 1398-403.

[12] Mavrogiannis L, Trambakoulos DM, Boomsma F, Osmond DH. The sympathoadrenal system mediates the blood pressure and cardiac effects of human coagulation factor XII-related "new pressor protein". Can J Cardiol, 2002 Oct; 18(10): 1077-86.

[13] Moura D, Pinheiro H, Paiva MQ, Guimaraes S. Prejunctional effects of angiotensin II and bradykinin in the heart and blood vessels. J Auton Pharmacol, 1999 Dec; 19(6): 321-5.

[14] Osmond DH, Movrogiannis L, Cotter BR: Potent "new pressor protein" related to coagulation FXII is potentiated by inhibition of angiotensin converting enzyme. J Hypertension, 1998; 16: 311-320.

[15] Papageorgiou PC, Pourdjabbar A, Amfilochiadis AA, Diamandis EP, Boomsma F, Osmond DH. Are cardiovascular and sympathoadrenal effects of human "new pressor protein" preparations attributable to human coagulation beta-FXIIa? Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004 Mar; 286(3): H837-46. Epub 2003 Oct 23.

[16] Pearl RJ, Papageorgiou PC, Goldman M, Amfilochiadis AA, Boomsma F, Rojkjaer R, et al. Possible role of new pressor protein in hypertensive anephric hemodialysis patients. Pediatr Nephrol, 2003 Oct; 18(10): 1025-31.

[17] Pickens PT, Bumpus FM, Lloyd AM, Smeby RR, Page IH. Measurement of renin activity in human plasma. Circ Res, 1965 Nov; 17(5): 438-48.

[18] Rajani V, Hussain Y, Bolla BS, de Guzman FQ, Montiague RR, Igic R, et al. Attenuation of epinephrine-induced dysrhythmias by bradykinin: role of nitric oxide and prostaglandins. Am J Cardiol, 1997 Aug 4; 80(3A): 153A-157A.

[19] Simos D, Boomsma F, Osmond DH. Human coagulation factor XII-related "new pressor protein": role of PACAP in its cardiovascular and sympathoadrenal effects. Can J Cardiol, 2002 Oct; 18(10): 1093-103.

[20] Waeber B, Nussberger J, Brunner HR, de Agostini A, Schapira M. Hypotensive effect of human factor XII active fragment in conscious normotensive rats: role of bradykinin. J Hypertens Suppl, 1984 Dec; 2(3): S341-2.

www.SID.ir