مطالعه نقش آندوتليوم و cGMP در اثر شلي ١٧ بتا- استراديول در ورید سافن انساني

*يداله آذرمي[١،٢]، حسين بابايي[١،٢]
[١]دانشكده داروسازي، [٢]مركز تحقيقات كاربردي دارويي دانشگاه علوم پزشكي تبريز

تاريخ دريافت: ٨٤/١٢/١ ، تاريخ پذيرش: ٨٥/٢/٣١

Effect of endothelium and cGMP on vasorelaxant effect of 17β-estradiol in human saphenous vein

*Azarmi Y.[1,2], Babaei H. [1,2]
[1]Faculty of Pharmacy, [2] Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences

Received: 2006/2/20 , Accepted: 2006/5/21

OBJECTIVES: Cardiovascular disease is a major cause of morbidity and mortality in the world. Compared to men of similar age, pre-menopausal women have significantly lower incidence of adverse cardiovascular event including coronary heart disease, essential hypertension and stroke. The incidence of these disorders increases in women with absence of functional ovaries. Estrogen therapy of post menopausal women reduces the incidence of these diseases. This beneficial effect of estrogen may have several mechanisms. The vasorelaxant effect of estrogens on vasculature is one of the important cardioprotective effects. The exact underlying molecular mechanism of this estrogen-induced vasodilatation has not yet been determined. Considering the important roles of veins in preload and heart failure and coronary artery diseases, in this study the acute relaxant effect of 17β-estradiol and role of endothelium and cyclic guanosin mono phosphate (cGMP) on this effect has been investigated on human saphenous vein. **Methods:** Rings of human saphenous vein with 3-5 mm length were prepared and equilibrated in Krebs' solution under 3 g tension (37 $^{\circ C}$; 95% O_2 ; 5% CO_2) for 60 min. In the various experiments, the vascular rings were contracted with prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$, 1.5μM) or potassium chloride (KCl, 60 mM). When contraction was stable 17β-estradiol was applied for 40 minutes in the presence or absence of endothelium and different inhibitors. Relaxation was expressed as % reversal of contraction induced by vasoactive agents. **Results:** 17β-estradiol (5-40 μM) elicited a concentration–dependent relaxation of KCl- and $PGF_{2\alpha}$ -induced active tone in human saphenous vein rings. Incubation of veins for 20 min with methylen blue or N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) reduced the relaxant effect of estrogen, significantly ($p<0.05$). This reduction was disappeared by denuding endothelium. However, when intact tissues were incubated with 10 μM indomethacin, cycloxygenase inhibitor or 1 μM KT5823, a protein kinase G inhibitor or cyclohexamide (100 μM) or puromycin (10μM) protein synthetase inhibitors, the vasorelaxant effect of 17β-estradiol on $PGF_{2\alpha}$-induced contraction was not modified significantly ($p>0.05$). **Conclusion:** These results suggest that 17β-estradiol induces dose dependent vasorelaxant effect in human saphenous vein, at least partially, by nitric oxide production and this relaxant effect is independent of cGMP, cycloxygenase or genomic pathways.

Key words: *Human saphenous vein, Vasorelaxant effect, 17β-estradiol, Nitric Oxide, Endothelium.*

زمينه و هدف: بيماريهاي قلبي - عروقي علت عمده مرگ و مير در اغلب كشورها ميباشد. بخوبي مشخص شده است كه خانمها در سنين قبل از يائسگي در مقايسه با مردان هم سن در معرض خطر كمتري در رابطه با ايجاد هيپرتانسيون و بيماريهاي عروق كرونر و مغزي قرار دارند و با قطع عملكرد تخمدان ها خطر اين بيماري ها افزايش مي يابد. مصرف استروژن در دوران يائسگي ميزان خطر بيماريهاي فوق را كاهش ميدهد. مكانيسمهاي متعددي در مورد اثرات محافظتي استروژنها بر روي قلب و عروق مطرح است. يكي از اثرات مهم محافظتي استروژنها در سيستم قلبي- عروقي اثرات گشاد كنندگي آنها بر روي عروق خوني است. مكانيسم مولكولي اين اثر گشاد كنندگي هنوز بطور دقيق مشخص نشده است. بيشتر مطالعات انجام يافته در روي شريانها و بافتهاي حيواني است و با توجه به نقش مهم ورید ها در پيش بار قلبي و اهميت آن در نارسايي قلبي و بيماري عروق كرونر در اين مطالعه اثر شلي حاد استروژن در ورید سافن انساني و نقش اندوتليوم و گوانوزين منوفسفات حلقوي (cGMP) دراين اثر بررسي شده است. **روش ها:** براي انجام اين مطالعه ورید سافن انساني از بيمارستان شهيد مدني تبريز تهيه شد. بافتها را بصورت حلقه هاي ٥-٣ ميلي متر در آورده و بين دو فلاب مثلثي شكل از جنس فولاد زنگ نزن قرار داديم. بافتها بمدت ٦٠ دقيقه در محلول كربس ٣٧ درجه سانتيگراد وگاز كاربوژن (٩٥% اكسيژن و ٥% دي اكسيدكربن) تحت كشش اوليه ٣ گرم تثبيت شدند. در آزمايشات مختلف حلقه هاي ورید انسان با پروستاگلاندين F2α ($PGF_{2\alpha}$, 1.5μM) يا پتاسيم كلراید (KCl, 60 mM) منقبض شدند. بعد از تثبيت انقباض، ١٧-بتا استراديول، در حضور يا عدم حضور اندوتليوم و مهار كننده هاي مختلف، به محيط اضافه شده و ٤٠ دقيقه بعد مقدار رسپانس شلي حاصل به صورت درصدي از رسپانس انقباضي اوليه اندازه گيري شد. **يافته ها:** بتا استراديول بصورت وابسته به دوز اثر شل كنندگي بر انقباض ناشي از PGF2α و KCl در ورید سافن انساني نشان داد. متيلن بلو و يا ال-نيترو ان متيل آرژينين (L-NAME) بطور معني دار ($p<0.05$) اثر شل كنندگي بتا استراديول را كاهش دادند و اثرات مهاري آنها با حذف آندوتليوم از بين رفت. ايندومتاسين، مهار كننده سيكلواكسيژناز، تركيب KT5823 بعنوان مهار كننده پروتئين كيناز G، پوروماسين و سيكلوهگزاميد، مهار كننده هاي سنتز پروتئين، تاثير معني داري بر روي اثر شلي استروژن ايجاد نكردند ($p>0.05$). **نتيجه گيري:** نتايج اين مطالعه نشان ميدهد كه بتا استراديول حداقل قسمتي از اثر شل كنندگي خود را در ورید سافن انساني با توليد نيتريک اكساید ولي مستقل از cGMP واسطه گري نموده و همچنين اين اثر مستقل از محصولات سيكلواكسيژناز و مسير ژنوميک ميباشد.

واژه هاي كليدي: *ورید سافن انسان، اثر شل كنندگي عروقي، ١٧–بتااستراديول، نيتريك اكساید، اندوتليوم.*

*نويسنده مسئول: دكتر يداله آذرمي، مربي دوره PhD فارماكولوژي، دانشكده داروسازي، مركز تحقيقات كاربردي دارويي دانشگاه علوم پزشكي تبريز، تلفن: ٣٣٧٢٢٥٠، نمابر: ٣٣٤٤٧٨٩

**Corresponding Author: Dr Yadollah Azarmi, Lecturer, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tel: 3372250 ; Fax: 3344789; E-mail:azarmiay@yahoo.com*

۱- مقدمه

بيماريهاي قلبي - عروقي علت عمده مرگ ومير در اغلب کشورهاي صنعتي و غير صنعتي ميباشد (۱). مطالعات اپيدميولوژيک بخوبي مشخص کرده اند که خانمها در سنين قبل از يائسگي در مقايسه با مردان هم سن در معرض خطر کمتري در رابطه با ايجاد هيپرتانسيون و بيماريهاي عروق کرونر و مغزي قرار دارند و با قطع عملکرد تخمدان ها خطر اين بيماري ها افزايش مي يابد (٤-۲). مصرف استروژن در دوران يائسگي ميزان خطر بيماريهاي فوق را کاهش ميدهد (٦-۵). مکانيسمهاي متعددي در مورد اثرات محافظتي استروژنها بر روي قلب و عروق مطرح است. درمان با استروژنها اثرات مطلوبي در پروفايل ليپيدي دارد (کاهش LDL و افزايش HDL) (۸-۷)2، استروژنها از آسيب عروقي محافظت مي نمايند. نقص در کنترل تون عروق منجر به آرترواسکلروز ميشود (۹) در بعضي از مطالعات در مدلهاي حيواني و انساني استروژنها وازوديلاتاسيون وابسته به آندوتليوم را افزايش ميدهند (۱۱-۱۰). تاثير استروژنها بر روي آندوتليال عروق ميتواند از اثرات مزمن (۱٤-۱۲) و يا حاد (۱٦-۱۵) آنها باشد. مکانيسمهاي متعدد ديگري در رابطه با اثرات حاد استروژنها بر روي عروق ايزوله مطرح است (۲۰-۱۷). با وجود مطالعات مختلف و همچنين نتايج متفاوت اثر اسروژنها بر روي عروق حيواني مختلف، مطالعه چنداني در رابطه با تاثير استروژنها بر روي عروق انساني وجود ندارد. از طرفي در اکثر مطالعات شريانها مورد بررسي قرار گرفته است. ورید ها بعنوان کنترل کننده مهم در پيش بار قلب در بيماريهاي نارسايي قلب و عروق کرونر از اهميت زيادي بر خودار هستند. با توجه به موارد مذکور در اين مطالعه اثر استروژنها بر روي ورید سافنوس ايزوله انسان و نقش نيتريک اکساید درآن بررسي گرديد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱: داروها و مواد مصرفي

۱۷-بتااستراديول, پروستاگلاندين $F_{2\alpha}$، ايندومتاسين، ان-نيترو-ال-آرژينين متيل استر (L-NAME)، استيل کولين، کارباکول، متيلن بلو، پوروماييسن و سيکلو هگزاميد همگي از شرکت Sigma و KT5823 از شرکت Calbiochem تهيه شدند. بتا استراديول دراتانول، ايندومتاسين در N/10 NaOH ، KT5823 در دي متيل سولفوکساید، پروستاگلاندين F2α ، L-NAME، استيل کولين، کارباکول، متيلن بلو، پوروماييسن و سيکلو هگزاميد در آب حل شدند. محلول کربس شامل (ميلي مول): سديم کلراید (۱۱۸)، پتاسيم کلراید (٤/۷)، کلسيم کلراید (۱/۲۵)، فسفات مونوپتاس (۱/۲)، سولفات منيزيم (۱/۲)، بيکربنات سديم (۲۵) و گلوکوز (۱۱) است. همه ترکيبات شيميايي مورد استفاده در تهيه محلول کربس از شرکت Merck بودند. از محلول کربس جهت انتقال ورید سافنوس انساني در دماي ٤ درجه سانتيگراد از بيمارستان به آزمايشگاه استفاده شد.

۲-۲: آماده کردن ورید سافنوس انساني و رسپانسهاي کنترل

ورید سافن انساني از اطاق عمل بيمارستان شهيد مدني تبريز از بـيماراني که تحت عمل جراحي بـاي پس عروق کرونري قرار مي گرفتند، تهيه و در محلول کربس کاربوژنه شده در دماي ٤ درجه سانتيگراد به آزمايشگاه انتقال داده شد. نمونه هاي تهيه شده از هر دو جنس بود و تفاوت معني داري در پاسخ شلي به بتا استراديول در هر دو جنس وجود نداشت. براي حذف تغييرات فردي در پاسخ در بررسي مکانيسم اثر پاسخ شلي به بتا استراديول در حضور ترکيب تاثير گذار و حامل (کنترل و تست) در بافت يکساني صورت گرفته است. جهت آزمايش بعد از تميز نمودن و جدا کردن قسمتهاي آسيب ديده، بافتها را بصورت حلقه هاي ۵-۳ ميلي متري در آورده و بين دو قلاب مثلثي شکل از جنس فولاد زنگ نزن قرار داديم، بطوريکه قلاب پائيني در داخل حمام عضو (Organ Bath) ثابت و قلاب بـالائي توسط يـک تکه نـخ به تـرانسديـوسر ايـزومتريک (TRI-202P,0-25Gr, Letica Scientific Transducer, Germany Instrument;HUGO Isometeric) وصل شـد تـا رسپـانس هاي عروقي را بـراي ثبت بـه دستـگاه Power Lab (ADInstrument, Recordr: power Lab/4Sp, Amplifier: QUAD Brige) منتقل کند. دستگاه مزبور نيز جهت ثبت و ذخيره داده ها به کامپيوتر متصل بود. تحت شرايط فوق بافتها در داخل محلول کربس در دماي ۳۷ درجه سانتيگراد تحت کشش اوليه ۳ گرم که با بررسيهاي اوليه بعنوان کشش optimum تعيين شده بود، قرار گرفتند. تنفس بافتي با گاز کاربوژن (CO_2 ۵% + O_2 ۹۵%) تامين گرديد. بعد از سپري شدن مدت ۶۰ دقيقه و انطباق يافتن بافتها با شرايط آزمايشگاهي، آزمايشات لازم انجام گرفت. در طول زمان انطباق بافتها، از هر ۱۵ دقيقه کشش پايه تنظيم و عمل شستشو انجام مي گرفت. قبـل از هر آزمايش عملکرد آندوتليوم بافت با رسپانس شلي مناسب به استـيل کولين و يـا کارباکول بررسي مي شد. زماني بافت براي آزمايش مناسب بود که پاسخ انقباضي به دوز يـکساني از کلراید پتاسيم در دو مرحله متوالي يـکسان ميشد. ابـتدا منحني دوز رسپانس به پتاسيم کلراید و پروستاگلاندين $F_{2\alpha}$ بصورت تجمعي رسم شد و از روي اين منحني ها مقدار Sub maximal (تقريباً EC_{80}) از پروستاگلاندين $F_{2\alpha}$ و پتاسيم کلراید تعيين و براي ايجاد انقباض پايدار در آزمايشات مختلف استفاده گرديد. نسبت به اثر شل کنندگي بتا استراديول منحني دوز رسپانس به شکل غير تجمعي رسم گرديد و از روي آن غلظت مناسب براي مطالعات بعدي مشخص شد. در بررسي مکانيسم اثر دارو بافت بمدت ۲۰ دقيقه درحضور حامل و يا ترکيب تاثير گذار انکوبه گرديد و سپس انقباض با پروستاگلاندين $F_{2\alpha}$ ايجاد شد و بعد از رسيدن انقباض به حالت

ثابت و پايدار بتا استراديول اضافه شد. با عنايت به اينكه اثر شل كنندگي استروژن يک اثر تدريجي و مداوم وابسته به زمان مي باشد، زمان ٤٠ دقيقه بعنوان زمان استاندارد انتخاب و بعد از مدت ٤٠ دقيقه مقدار شلي ايجاد شده بصورت درصدي از رسپانس انقباضي ناشي از ماده منقبض كننده محاسبه گرديد. مكانيسم هاي متعدد مكانيكي، فيزيكي، شيميايي و آنزيماتيک براي تخريب اندوتليوم وجود دارد. تخريب با ساييدن قسمت داخلي حلقه هاي رگي بوسيله نخ مناسب بدون تاثير مهم بر خواص انقباضي ناشي از آگونيست ها بهتر از بقيه موارد است كه در اين مطالعه هم تخريب آندوتليوم با اين روش انجام گرفت.

۳-۲: روشهاي آماري

تمام نتايج بصورت mean ± sem نشان داده شده اند. رسپانس شلي ٤٠ دقيقه بعد از افزودن استروژن به محيط، اندازه گيري و بر اساس درصد شلي انقباض ناشي از منقبض كننده ها در ورید سافن انسان بيان شده است. داده هاي مربوط به منحني دوز رسپانس با تست ANOVA و t-test و داده هاي مربوط به بررسي مكانيسم با توجه به اينكه هم كنترل و هم تست بر روي بافت يكساني انجام مي گرفت با t-test مزدوج آناليز شده است. مقادير P كمتر از ۰/۰۵ معني دار در نظر گرفته شده است. n تعداد نمونه هاي مورد آزمايش را نشان ميدهد.

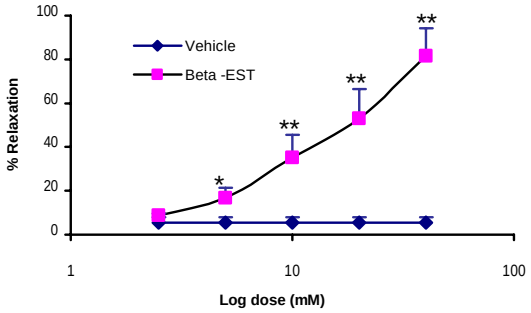
۳- نتايج

۳-۱: رسپانسهاي كنترل

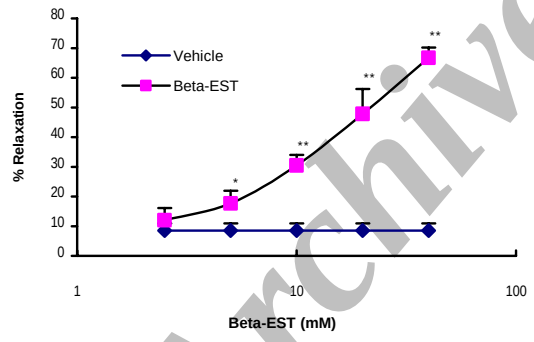
ابتدا منحني دوز- پاسخ به پروستاگلاندين $F_{2\alpha}$ و پتاسيم كلرايد در بافت ورید سافن انسان رسم و از روي منحني به ترتيب غلظتهاي ۱/۵ µM و ٦۰ mM بعنوان غلظت هاي استاندارد (Sub maximal) پروستاگلاندين $F_{2\alpha}$ و پتاسيم كلرايد براي ايجاد انقباض در مطالعات بعدي انتخاب شدند. بتااستراديول به صورت وابسته به دوز در غلظتهاي ۵ تا ۴۰ ميكرومول باعث ايجاد شلي در عروق منقبض شده گرديد (شكل هاي ۱ و۲). غلظت ۲۰ ميكرومول آن (باتوجه به اينكه در حوالي غلظت موثر ۵۰% قرار داشت) بعنوان دوز استاندار انتخاب ودر آزمايشات بعدي براي بررسي مكانيسم اثر مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۲: بـررسي نـقش آندوتليوم در اثر شلي نـاشي از ۱۷-بتا استراديول

آندوتليوم بطور عمده با توليد و آزادي تركيبات مختلف از جمله فاكتور شل كننده مشتق از اندوتليوم (نيتريک اكساید) و پروستاسايكلين و فاكتور هيپرپولاريزه كننده مشتق از آندوتليوم اثر شل كننده بر روي عضلات صاف عروق اعمال ميكند كه در اين مقاله بيشتر نقش نيتريک اكساید و پروستاسايكلين مورد توجه است. نقش اين مواد با بررسي تخريب آندوتليوم، مصرف اينـدومتاسين بـه عنوان مهار كننده سيكلواكسيژناز، L-NAME مهار كننده نيتريک اكساید سنتتاز، متيلن بلو مهار كننده آنزيم گوانيليل سيكلاز و KT5823 مهار كننده پروتئين كيناز G مورد مطالعه قرار گرفت. در بافت هاي با آندوتليوم سالم اغلب كارباكول و يا استيل كولين (۳ ميكرومول) در انقباض ناشي از فنيل افرين (۱ميكرومول) ۳۰ تا ٤۰ درصد اثر شل كنندگي دارد كه با مصرف مهار كننده نيتريک اكساید سنتتاز و يا با ساييدن قسمت داخلي حلقه هاي بافت اين رسپانس حذف مي شود.



شكل ۱: اثر شل كنندگي ۱۷ بتا- استراديول و حامل مربوطه در حلقه هاي ورید سافن انساني كه با پروستاگلاندين $F_{2\alpha}$ (۱/۵ ميكرومول) منقبض شده است. مقدار رسپانس شلي ۴۰ دقيقه بعد از افزودن استروژن به محيط بصورت درصدي از رسپانس انقباضي اوليه محاسبه و بصورت mean±sem نشان داده شده است.
* (P<0.05)، **(P<0.001)



شكل ۲: اثر شل كنندگي ۱۷ – بتا استراديول و حامل مربوطه در حلقه هاي ورید سافن كه با پتاسيم كلرايد (۶۰ ميلي مول) منقبض شده است. مقدار پاسخ شلي ۴۰ دقيقه بعد از افزودن استروژن به محيط بصورت در صدي از پاسخ انقباضي اوليه محاسبه و بصورت mean±sem نشان داده شده است.
(n=6) * (P<0.05) ، **(P<0.001)

۳-۳: اثر ايندومتاسين، L-NAME، متيلن بلو و KT5823 در شلي ناشي از ۱۷-بتااستراديول در ورید سافن انسان با آندوتليوم سالم

براي بررسي نقش پروستاگلاندينها عضلات صاف عروق بمدت ۲۰ دقيقه در حضور ايندومتاسين به غلظت ۱۰µM (۲۱) انكوبه شدند سپس توسط پروستاگلاندين $F_{2\alpha}$ منقبض و اثر شل كنندگي بتا استراديول (۵۸/۳±۱۰/۷) مورد بررسي قرار گرفت كه نسبت به حالت كنترل (٥٦/۰±۸/۰) تغيير معني داري در رسپانس شلي ايجاد نشد (جدول ۱).

جدول ۱: اثرات ايندوميتاسين (Ind,10 µM)، متيلن بلو (MB,10 µM)، L-NAME (200 µM)، KT5823(1 µM) ، سيكلوهگزاميد (Cyclo,100 mM) و پورومايسن (Puro,10 mM) بر روي رسپانس شلي۱۷- بتا استرادیول (B-EST 20 µM) در ورید سافن انساني با آندوتليوم سالم منقبض شده با پروستاگلاندين $F_{2\alpha}$ (1.5 µM).

داروها	در صد شلي	تعداد	تست آماري	نتيجه
B-EST+Vehicle	۵۸/۳ ± ۱۰/۷	٦	paired t-test	P>0.05
B-EST+Ind	۵٦/۰ ± ۸/۰	٦		
B-EST+Vehicle	٤۵/۰ ± ۷/۹	٦	paired t-test	P<0.05
B-EST+MB	۳٤/۰ ± ۷/۸	٦		
B-EST+Vehicle	۸٦/۳ ± ۹/۸	٦	paired t-test	P<0.05
B-EST+L-NAME	۳۵/٤ ± ۵/٤	٦		
B-EST+Vehicle	٦۲/۰ ± ۷/۰	۷	paired t-test	P>0.05
B-EST+KT5823	۵۵/۳ ± ۵/۸	۷		
B-EST+Vehicle	٦۸/۲ ± ۱۲/٦	٦	paired t-test	P>0.05
B-EST+Cyclo	۵٦/۹ ± ۱۱/۰	٦		
B-EST+Vehicle	۵۷/٦ ± ٦/۹	۷	paired t-test	P>0.05
B-EST+Puro	٦۰/۵ ± ۵/۸	۷		

جدول ۲: اثرات متيلن بلو (MB, 10 µM) و L-NAME (200 µM) بر روي رسپانس شلي بتا استرادیول (B-EST 20 µM) در ورید سافن انساني بدون آندوتليوم منقبض شده با پروستاگلاندين F2α (1.5 µM).

دارو	در صد شلي	تعداد	تست آماري	نتيجه
B-EST+Vehicle	٦۰/۹ ± ٤/۷٦	٦	t-test paired	P>0.05
B-EST+MB	۵٦/۱٤± ۷/۵٤	٦		
B-EST+Vehicle	٦۰/۰ ± ۸/۳	۷	t-test paired	P>0.05
B-EST+L-NAME	٦۳/٤ ± ۱۱/٦	۷		

انكوباسيون بافت ها در حضور متيلن بلو رسپانس شلي بتا استرادیول را از٤۵/۰±۷/۸ به ۳٤/۰±۷/۸ بطور معني داري كاهش داد (جدول۱). انكوباسيون بافت ها درحضور L-NAME (۲۰۰ ميكرومول) كه مهار كننده سنتز NO است (۲۲)، نيز رسپانس شلي ناشي از ۱۷بتا- استرادیول را از ۹/۸ ± ۸٦/۳ بطور معني دار به ۵/٤ ± ۳۵/٤ كاهش داد. KT5823 (۱ ميكرومول) مهار كننده پروتئين كيناز G (۲۳) بر روي رسپانس شلي بتا استرادیول (٦۲/۰±۷/۲) كاهش (۵۵/۳±۵/۸) معني داري نداشت (جدول ۱).

۳-۴: تاثير مهار كننده هاي سنتز پروتئين در اثر شلي ناشي از ۱۷-بتااسترادیول در ورید سافن انسان با آندوتليوم سالم

رسپانس شلي به ۱۷-بتا استرادیول در حضور پوروميسين از ۵۷/٦±٦/۹ به٦۰/۵±۷/۵ (P>0.05) ودر حضور سيكلو هگزاميد از ۵٦/۹±۱۱/۰ به٦۸/۲±۱۲/٦ تغيير يافت اين تغييرات از نظر آماري معني دار نبودند.

۳-۵: تاثير تخريب آندوتليوم بر روي اثرات مهار كننده سنتز نيتريک اكساید و متيلن بلو در اثر شلي ناشي از ۱۷-بتااسترادیول در ورید سافن انسان

در بافت با آندوتليوم تخريب شده كه با عدم رسپانس شلي به استيل كولين ويا كارباكول در انقباض ناشي از فنيل افرين مشخص ميشود، L-NAME (۲۰۰ ميكرومول) و متيلن بلو (۱۰ ميكرومول) تاثير معني داري در اثر شلي ناشي از بتا استرادیول نداشتد (جدول۲).

۴- بحث

از نظر تئوري مشخص شده است كه استروژنها اثرات محافظتي بر روي قلب و عروق دارند. مكانيسمهاي متفاوتي در اين مورد مطرح است. تغييرات مطلوب در تركيب ليپوپروتئين (۸) و اثر آنتي اكسيدانتي (۲۵-۲٤) يكي از اين مكانيسمها مي باشد. علاوه بر اين استروژنها اثرات گشاد كنندگي عروقي مستقيم دارند. اثرات مستقيم دارو بر روي عروق ممكن است بصورت حاد يا

مزمن باشد. در مورد اثرات حاد مكانيسمهاي متعددي مطرح است و مكانيسم اثر شلي بتا استراديول در بسترهاي عروقي متفاوت يكسان نيست (۲٦). دراين مطالعه اثر بتا استراديول بر روي ورید سافن بررسي و نشان داده شد كه بصورت وابسته به دوز اثر شل كنندگي دارد. اثر شل كنندگي آن تحت تاثير مهار كننده هاي سنتز پروتئين (سيكلوهگزاميد و پورومايسين) قرار نگرفت و از طرفي اين اثر بطور سريع ظاهر و همچنين قابل برگشت بود، پس بتا استراديول بر روي ورید سافن اثر شلي غير وابسته به ژنوم دارد. سلولهاي آندوتليال عروق فاكتورهاي گشاد كننده عروقي مختلف مانند نيتريك اكساید (۲۸)، پروستاگلاندينها (۲۷) و فاكتور هيپرپولاريزه كننده مشتق از آندوتليوم (۲۹) آزاد ميكنند. پروستاگلاندين ها در اثر شلي بتا استراديول در روي عروق نقش دارند. در بيشتر مطالعات نشان داده شده است كه اين اثر بطور عمده از طريق افزايش بيان سيكلو اكسيژناز و يك اثر مزمن است (۳۱-۳۰). البته در يك مطالعه ديگر گزارش شده است كه بتا استراديول ميزان بيان ژن آنزيم سيكلو اكسيژناز ۲ ناشي از اينترلوكين ۱ را در عروق خوني مغز رت كاهش ميدهد و از اين طريق شايد در بيماريهاي عروق مغزي تاثير گذار باشد (۳۲). در مطالعه حاضر ايندومتاسين با دوز ۱۰ ميكرومول بر روي شلي حاد ناشي از بتا استراديول در ورید سافن انساني تاثير نداشت. اثر شلي بتا استراديول در حضور متيلن بلو و L-NAME به ترتيب مهار كننده هاي گوانيليل سيكلاز و نيتريك اكساید سنتتاز بطور معني داري كاهش يافت. تخريب فيزيكي آندوتليوم اثر مهاري متيلن بلو و L-NAME را در شلي ناشي از بتا استراديول غير معني دار نمود. اين نتيجه مشخص مينمايد كه قسمتي از اثر شلي بتا استراديول وابسته به نيتريك اكساید است. در بستر هاي عروقي مختلف نشان داده شده است كه استروژنها بصورت وابسته به آندوتليوم اثر شل كنندگي دارند. ۱۷-بتا-استراديول بصورت حاد اثر شلي وابسته به آندوتليوم براديكاينين را افزايش ميدهد (۳۳). در تاييد اين مطالعه، در مطالعات ديگر نشان داده شده است كه۱۷بتا-استراديول فعاليت آنزيم نيتريك اكساید سنتتاز آندوتليالي را در سلولهاي آندوتليالي كشت شده افزايش ميدهد (۳۵-۳٤). شواهد متعددي وجود دارد كه اين اثرات از طريق گيرنده هاي سطحي استروژن و غير وابسته به مسير ژنوميك است (۱٦، ۳٦). در مطالعه ما مشخص شد كه KT5823، مهار كننده پروتئين كيناز G، با وجود اينكه پاسخ شلي بتا استراديول را در انقباض ناشي از $PGF_{2\alpha}$ در ورید سافن انسان كاهش داد ولي اين كاهش معني دار نبود. توجيه اين مطلب اين است كه احتمالاً اثر نيتريك اكساید در بافت ورید سافن انسان مستقل از گوانوزين مونوفسفات حلقوي است. از نتايج نيز مشخص ميشود كه اثر مهار متيلن بلو در مقايسه با L-NAME خيلي كمتر است دليل موضوع اين است كه مسير شل كنندگي در اثر نيتريك اكساید تنها از طريق افزايش فعاليت گوانيليل سيكلاز نيست. اخيراً در مطالعه اي كه توسط Lehen'Kyi و همكارانش (۳۷) انجام يافته نشان داده شده است كه نيتريك اكساید بصورت مستقل از PKG در شريان دمي رت اثر شل كنندگي دارد. اين محققين احتمال داده اند كه قسمتي از اين اثر از طريق فعال نمودن كانالهاي پتاسيمي فعال شونده با يون كلسيم است كه با عمل هيپرپولاريزاسيون و بطور ثانوي با كاهش كلسيم داخل سلولي همراه است. در مطالعات ديگري نيز نشان داده شده است تمام اثر نيتريك اكساید در بافتهاي مختلف به PKG وابسته نيست. Fouty و همكارانش (۳۸) نشان دادند كه تعديل تون عروقي شريان ريوي در حالت نورموتانسيو و هيپرتانسيو توسط NO به cGMP وابسته است ولي فعاليت PKG ضروري نيست. در اين مطالعه نيز اظهار نظر شده است كه cGMP ممكن است از طريق اثر مهاري بر روي بعضي از فسفودي استرازها و يا كانال هاي يوني مانند cyclic nucleotide-gated (CNG) و nonselective cation channels چنين اثري را بصورت مستقل از PKG اعمال ميكند ولي براي روشن شدن آن انجام مطالعات بيشتري پيشنهاد شده است. در مطالعه Pauvert و همكارانش (۳۹) مشخص گرديده كه نيتريك اكساید با منشاء خارجي، (سديم نيتروپروساید) در عضلات صاف شريان هاي ريوي بصورت مستقل ازPKG با تاثير بر روي كانالهاي اينوزيتول تري فسفات (بدون اثر بر روي كانالهاي ريانوديني) باعث كاهش يون كلسيم سيتوزولي ميشود. در مطالعه ما نيز كه نتيجه آن در اين مقاله گزارش نشده است مشخص گرديد كه بعضي از مهار كننده هاي كانالهای پتاسيم در اثر شلي بتا استراديول تاثير معني داري دارند و در ضمن بتا-استراديول بطور معني داري منحني دوز-پاسخ به يون كلسيم را در شرايط عاري از كلسيم و درحضور كلرايد پتاسيم به سمت راست هدايت مي دهد.

۵- نتيجه گيري

نتايج اين بررسي نشان مي دهد كه بتا استراديول در ورید سافن انسان اثر شلي وابسته به اندوتليوم و مستقل از مسير ژنوميک ايجاد مي كند كه قسمتي از آن از طريق نيتريك اكساید واسطه گری ميشود. حداقل قسمتی از اين پاسخ شلی ناشی از نيتريك اكساید در ورید سافن انسان احتمالا مستقل از مسير گوانوزين مونوفسفات حلقوي و PKG مي باشد.

۶- تشكر و قدرداني

از جراحان محترم قلب وعروق: آقايان دكتر رضايت پرويزي، دكتر عباس افراسيابي، دكتر احمدعلي خليلي، دكتر بابک نصيري و دكتر ناصر صفايي و كادر پرستاري اطاق عمل مركز قلب و عروق شهيد مدني تبريز به خاطر همكاري در تهيه بافت انساني صميمانه تشكر و قدرداني ميشود.

References:

1. Whelton P.K. Epidemiology of hypertension. Lancet, 1994, 344: 101-106.
2. Sudlow C.L.M., Warlow C.P. Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types. Stroke, 1997, 28: 491–499.
3. Manolio T.A., Kronmal R.A., Burke G.L., O'Leary D.H., Price T.R. Short-term predictors of incident stroke in older adults. The cardiovascular health study. Stroke, 1996, 27: 1479–1486.
4. Barrett-Connor E. Sex differences in coronary heart disease. Why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. Circulation, 1997, 95: 252 –264.
5. Affinito P., Palomba S., Bonifacio M., Fontana D., Izzo R., Trimarco B., Nappi C. Effects of hormonal replacement therapy in postmenopausal hypertensive patients. Maturitas, 2001, 40: 75–83.
6. Mericli M., Nadasy G.L., Szekeres M., Varbi S., Vajo Z., Matrai M., Acs N., Monos E., Szkacs B. Estrogen replacement therapy reverses changes in intramural coronary resistance arteries caused by female sex hormone depletion. Cardiovasc. Res., 2004, 61 (2): 317-324.
7. Whitcroft S.I., Crook D., Marsh M.S., Ellrington M.C., Whiteheada M.I., Stevenson J.C. Long-term effects of oral and transdermal hormone replacement therapies on serum lipid and lipoprotein concentrations. Obstet. Gyneco. 1994, 84: 222 –226.
8. Nanda S., Gupta N., Mehta H.C., Sangwan K. Effect of osterogen replacment therapy on serum lipid profile. Aust N Z J Obestet. Gynaecol., 2003, 43 (3): 213-216.
9. Barton M. Postmenopausal oestrogen replacment therapy and atherosclerosis: can current compounds provide cardiovascular protection. Exp. Opin. Invest. Drugs, 2001, 10 (5): 1-21.
10. Czarnecka D., Kawecka-Jaszcz K., Olszanecka A., Dembinska-Kiec A, Malczewska-Malec M, Zdzienicka A., Guevara I. The effect of hormone replacment therapy on endothelial function in postmenopausal women with hypertension. Med. Sci. Monit., 2004, 10(2): CR55-CR61.
11. Ghanam K., Ea-Kim L., Javellaud J., Oudart N. Involvement of potassium channels in the protective effect of 17 beta-estradiol on hypercholesterolemic rabbit carotid artery. Atherosclerosis, 2000, 152: 59 –67.
12. Yang S., Bae L., Zhang L. Estrogen increases eNOS and NOx release in human coronary artery endothelium. J Cardiovas. Pharmacol., 2000, 36: 242–247.
13. MacRitchie A.N., Jun S.S., Chen Z. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. Circ. Res., 1997, 81: 355–362.
14. Sumi D., Hayashi T., Jayachandran M., Iguchi A. Estrogen prevents destabilization of endothelial nitric oxide synthase mRNA induced by tumor necrosis factor alpha through estrogen receptor mediated system. Life. Sci., 2001, 69: 1651–1660.
15. Russell K.S., Haynes M.P., Sinha D., Clerisme E., Bender J.R. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97: 5930–5
16. Goetz R.M., Thatte H.S., Prabhakar P., Cho M.R., Michel T., Golan D.E. Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 1999, 96: 2788–93.
17. Jun S.S., Chen Z., Pace M.C., Shaul P.W. Estrogen upregulates cyclooxygenase-1 gene expression in bovine fetal pulmonary artery endothelium. J. Clin. Invest. 1998, 102: 176–83.
18. Sakuma I., Liu MY., Sato A., Hayashi T., Iguchi A., Kitabatake A., Hattori Y. Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of middle aged rats: Influence of oestrogen. Br J Pharmacol. 2002; 135, 48–54.
19. Murphy J.G., Khalil R.A. Gender-specific reduction in contractility and [Ca2+]i in vascular smooth muscle cells of female rat. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2000, 278: C834–C844.
20. Zhang F., Ram J.L., Standley P.R., Sowers J.R. 17 Beta-Estradiol attenuates voltage-dependent Ca2+ currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. Am. J. Physiol., 1994, 266: C975–80.
21. Rakici O., Kiziltepe U., Coskun B., Aslamaci S., Akar F. Effects of resveratrol tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery. International Journal of Cardiology, 2005, 105, 209-215
22. Sanz E., Monge L., Fernandez N., Angeles M., Martinez-Leon J.B., Dieguez G., Garcia-Villalon A.L. Relaxation by urocortin of human saphenous veins. Br. J. Pharmacol., 2002, 136: 90-94.
23. Keung W., Vanhoutte P.M., Man R.Y.K. Acute impairment of contractile responses by 17β-estradiol is cAMP and protein kinase G dependent in vascular smooth muscle cells of the porcine coronary arteries. . Br. J. Pharmacol., 2005, 144: 71–79
24. Kanda N., Watanabe S., 17beta-estradiol inhibits oxidative stress-induced in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. J. Invest. Dermatol., 2003, 121 (6) ; 1500-1509.
25. Kiray M., Uysal N., Sonmez A., Acikgoz O.,Gonenc S. Positive effects of deprenyl and estradiol on spatial memory and oxidant strees in aged female rat brains. Neurosci. Lett., 2004, 354 (3): 225-228.
26. Saetrum Opgaard O., Duckles S.P., Krause D.N. Regional differences in the effect of oestrogen on vascular tone in isolated rabbit arteries. Pharmacol. Toxicol., 2002, 91(2): 77-82.
27. Palmer R.M.J., Ashton D.S., Moncada S. Vascular endothelial cell synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature, 1988, 333: 664-666.
28. Beetens J.R., Hove C.V., Rampart N., Herman A.G. Acethylcholine stimulates the release of prostacyclin by rabbit aorta endothelium. J. Pharm. Pharmacol., 1983, 35: 251-252.
29. Chen G., Suzuki H., Weston A.H. Acethylcholine releases endothelium derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. Br. J. Pharmacol., 1998, 93: 512-524.
30. Jun S.S., Chen Z., Pace M.C., Shaul P.W. Estrogen upregulates cyclo-oxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium. J. Clin. Invest., 1998, 102: 176–83.
31. Ospina J.A,. Krause D.N., Duckles S.P. 17Beta-estradiol increases rat cerebrovascular prostacyclin synthesis by elevating cyclooxygenase-1 and prostacyclin synthase. Stroke, 2002, 33 (2): 600-605.
32. Ospina J.A., Brevig H.N., Krause D.N., Duckles S.P. Estrogen suppresses IL-1beta-mediated induction of COX-2 pathway in rat cerebral blood vessels. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 2004, 286(5): H2010-9.
33. Barton M., Cremer J., 17 Beta-Estradiol acutly improves endothelium-dependent relaxation to bradykinin in isolated human coronary arteries. European Journal of Pharmacology, 1998, 362: 73-76.
34. Shaul P.W. Rapid activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. Steroids, 1999, 64: 28-34.
35. Chen Z., Yuhanna I.S., Galcheva-Gargova Z., Karas R.H., Mendelsohn M.E., Shaul P.W. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial

nitric oxide synthase by estrogen. J. Clin. Invest., 1999, 103: 401-406.
36. Simoncini T., Hafezei-Moghadam E., Brazil D., Ley K., Chin W.W., Liao JK. Interaction of estrogens receptors with regulatory subunit of posphatidylinositol -3-OH kinase. Nature, 2000, 407: 538-541.
37. Lehen'kyi V.V., Zelensky S.N., Stefanov A.V. Ca^{2+}-sensitivity and cGMp-independent effects of NO in vascular smooth muscle. Nitric Oxide, 2005, 12: 105-113.
38. Fouty B., Komalavilas P., Muramatsu M., Cohen A., McMurtry I.F., Lincoln T.M., Rodman D.M. Protein kinase G is not essential to NO-cGMP modulation of basal tone in rat pulmonary circulation. Am. J. Physiol., 1998, 274 (2 Pt 2): H672-8.
39. Pauvert O., Marthan R., Savineau J. NO-induced modulation of calcium-oscillations in pulmonary vascular smooth muscle. Cell Calcium, 2000, 27 (6): 329-38.