نقش كانالهاي پتاسيمي و فاكتور هيپرپولاريزه كننده مشتق از آندوتليوم در اثر شل كنندگي ۱۷بتا-استراديول در وريد سافن انساني

حسين بابايي*، يداله آذرمي

مركزتحقيقات كاربردي دارويي، دانشكده داروسازي، دانشگاه علوم پزشكي تبريز

تاريخ دريافت: ۸۶/۹/۱۸ ، تاريخ پذيرش: ۸۶/۱۰/۱۳

Effect of Potassium Channels and Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor on Vasorelaxant Effect of 17β-Estradiol in Human Saphenous Vein

*Babaei H., Azarmi Y.

Drug Applied Research Center, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences

Received: 2007/12/9, Accepted: 2008/1/3

Objectives: The vasorelaxant effect of estrogens on blood vessels is one of the important cardiovascular protective mechanisms of estrogen. The present experiments were designed to study the mechanisms of vasorelaxant effect of 17β-estradiol (E2) in human saphenous veins (HSV). **Methods:** HSV were obtained from patients undergoing coronary artery bypass graft surgery in Tabriz Madani Heart Center. The role of K^+ channels and endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF) in the effects of E2 were studied by incubating tissues with K^+ channels blockers: glibenclamid (3μM), 4-aminopyridin (1mm), tetraethyl ammonium (TEA, at lower and higher concentration: 1mm and 10mM), $BaCl_2$ (30μM) and combination of charybdotoxin and apamin. In order to assess the role of endothelium in the inhibitory effect of TEA (10mM) on the relaxant effect of E2, responses were elicited in endothelium denuded vein rings. **Results:** TEA at 1mm, (selective inhibitor of large-conductance, BK_{Ca}, Ca^{2+} activated K^+ channels), 4-aminopyridin (selective inhibitor of voltage dependent K^+ channels) and glibenclamid (selective inhibitor of ATP dependent K^+ channels) did not affect the vasorelaxant effects of E2 on $PGF_{2\alpha}$-induced contractions. TEA at higher concentration, an inhibitor of small-conductance (SK_{Ca}) and intermediate-conductance (IK_{Ca}) Ca^{2+} activated K^+ channels, significantly inhibited E2-induced vasorelaxation. This inhibitory effect was endothelium-dependent and abolished by endothelium denuding. In intact tissues, pretreatment either with a combination of charybdotoxin and apamin (inhibitors of EDHF), or $BaCl_2$, significantly reduced the relaxation produced by E2. **Conclusion:** The data suggest that vasorelaxant effect of E2 in HSV maybe mediated by EDHF which involves apamin/charybdotoxin-sensitive K^+-channels and K^+.

Key Words: *Potassium channels, Endothelium derived hyperpolarizing Factor, Estradiol, Human Saphenous Vein.*

زمينه و هدف: يكي از مكانيسمهاي مهم حفاظتي استروژن در قلب و عروق اثر گشاد كنندگي استروژنها در عروق خوني است. اين تحقيق براي بررسي مكانيسم اثر شل كنندگي ۱۷بتا-استراديول در وريد سافن انساني طراحي گرديد. **روشها:** وريد سافن انساني از اتاق عمل مركز قلب شهيد مدني تبريز تهيه شد. نقش كانالهاي پتاسيمي و فاكتور هيپرپولاريزه كننده مشتق از آندوتليوم، در اثر شل كنندگي استراديول با انكوباسيون حلقه هاي وريد در حضور بلوكه كننده هاي كانالهاي پتاسيمي: گلي بنكلاميد، ۴-آمينوپيريدين، تترااتيل آمونيوم (در غلظتهاي پايين 1mM و بالا 10mM) باريم كلرايد و مصرف همزمان كاريبدوتوكسين و آپامين مطالعه شد. براي ارزيابي نقش آندوتليوم در اثر مهاري تترا اتيل آمونيوم (10 mM) در اثر شلي استراديول آزمايش در بافتهاي فاقد آندوتليوم تكرار گرديد. **يافته ها:** تترا اتيل آمونيوم، ۴-آمينوپيريدين و گلي بنكلاميد در اثر شل كنندگي استراديول در انقباض ناشي از $PGF_{2\alpha}$ تاثيري نداشتند. تترااتيل آمونيوم كه در غلظتهای بالاتر بعنوان مهار كننده كانالهای پتاسيم با هدايت كم (SK_{Ca}) و كانالهای پتاسيم با هدايت متوسط (IK_{Ca}) تحريک شونده با كلسيم، عمل ميكند بطور معنی داری اثر شل كنندگی استراديول را مهار كرد. اين اثر مهاری وابسته به اندوتليوم بود و با تخريب اندوتليوم از بين رفت. در بافتهای اندوتليوم دار مصرف همزمان كاريبدوتوكسين و آپامين يا باريم اثر شل كنندگی عروقی استروژن را بطور معنی داری مهار كرد.

نتيجه گيري: اين يافته ها نشان ميدهد كه آزادي فاكتور هيپرپولاريزه كننده مشتق از آندوتليوم كه با شركت كانالهاي پتاسيمي حساس به كاريبدوتوكسين و آپامين و يون پتاسيم انجام ميشود در اثر شل كنندگي ۱۷ بتا-استراديول در وريد سافن انساني نقش دارد .

واژه های كليدي: كانال پتاسيم ـ فاكتور هيپرپلاريزه كننده مشتق از آندوتليوم - استراديول ـ وريد سافن انساني.

Corresponding Author: Dr Hossein Babaei, Associate Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tel: 0411-3363311, Fax: 0411-3363231, babaeih@tbzmed.ac.ir

* نويسنده مسئول: دكتر حسين بابائی، دانشيار فارماكولوژی، مركز تحقيقات كاربردی داروئی، تلفن: ۳۳۶۳۳۱۱-۰۴۱۱ ، نمابر ۳۳۶۳۲۳۱-۰۴۱۱

١- مقدمه

در اغلب كشورها بيماريهاي قلبي- عروقي علت عمده مرگ و مير زودرس بوده و بيش از ۳۰% کلیه مرگ ومیرهای گروه سنی ٦٤-٣۵ ساله را شامل میشود (٣-١). مطالعات متعدد نشان داده است كه خانمها در سنين قبل از يائسگي در مقايسه با مردان هم سن در معرض خطر كمتري در رابطه با ايجاد ازدياد فشار خون و بيماريهاي عروق كرونر و مغزي قرار دارند و با قطع عملكرد تخمدان ها خطر اين بيماري ها افزايش مي يابد (٤). مصرف استروژن در دوران يائسگي ميزان خطر بيماريهاي فوق را كاهش ميدهد (۵). مكانيسمهاي متعددي در مورد اثرات محافظتي استروژنها بر روي قلب و عروق مطرح است. يكي از اثرات مهم محافظتي استروژنها در سيستم قلبي- عروقي اثر گشادكنندگي آنها بر روي عروق خوني است (٦). مكانيسم اين اثر گشاد كنندگي هنوز بطور دقيق مشخص نشده است. باز شدن كانالهاي پتاسيم و يا ترشح فاكتور هيپرپلاريزه كننده از آندوتليوم از مكانيسمهاي دخيل در شل شدن عضلات صاف عروق خوني مي باشد. بيشتر مطالعات انجام يافته در مورد بررسی مكانيسم اثر استروژن در روي عروق حيواني است و مطالعه چنداني در رابطه با تاثير استروژنها بر روي عروق انساني وجود ندارد. از طرفي در اكثر مطالعات شريانها مورد بررسي قرار گرفته است. وريد ها بعنوان عروق ظرفيت و عاملی مهم در كنترل پيش بار قلب در بيماريهاي نارسايي قلب و عروق كرونر بسيار حائز اهميت می باشند.

مطالعه بر روي وريد سافن انساني كه در عمل جراحي عروق كرونر قلب (Coronary Artery Bypass Graft, CABG) بعنوان بيشترين بافت مورد استفاده در پيوند عروقي قلب كاربرد دارد (٧)، از اهميت شايان توجهی برخوردار است. براي پي بردن به مكانيسم اثر شل كنندگي استروژنها در عروق خوني، در اين مطالعه نقش كانالهاي پتاسيمي و فاكتور هيپرپولاريزه كننده مشتق از آندوتليوم در اثر شل كنندگي ١٧ بتا-استراديول در وريد سافن انساني مورد بررسي قرار گرفته است.

٢- مواد و روشها

٢-١: داروها و مواد مصرفی

١٧بتا-استراديول، استيل كولين، پروستاگلاندين $F_{2\alpha}$، گلي بنكلاميد، ۴-آمينوپيريدين، ترا اتيل آمونيوم، باريم كلرايد، كاريبدوتوكسين وآپامين همگی از شركت Sigma تهيه شدند.

محلول كربس شامل (ميلي مول) : سديم كلرايد (١١٨)، پتاسيم كلرايد (٤/٧) سولفات منيزيم (١/٢)، فسفات مونوپتاس (١/٢)، كلسيم كلرايد (١/٢۵)، بيكربنات سديم (٢۵) و گلوكوز (١١) است (٨) .همه تركيبات شيميايي مورد استفاده در تهيه محلول كربس از شركت Merck بودند. از محلول كربس جهت انتقال وريد سافنوس انساني در دماي ٤ درجه سانتيگراد از بيمارستان به آزمايشگاه استفاده شد.

٢-٢: آماده كردن وريد سافنوس انساني و پاسخهاي كنترل وريد سافن انساني از اطاق عمل بيمارستان شهيد مدني تبريز از بيماراني كه تحت عمل جراحي باي پس عروق كرونري قرار مي گرفتند، تهيه و در محلول كربس كاربوژنه شده در دماي ٤ درجه سانتيگراد به آزمايشگاه انتقال داده شد. نمونه هاي تهيه شده از هر دو جنس بودند و تفاوت معني داري در پاسخ شلي به بتا استراديول در بين دو جنس وجود نداشت. براي حذف تغييرات فردي در پاسخ در بررسي مكانيسم اثر پاسخ شلي به بتا استراديول در حضور تركيب تاثير گذار و حامل (كنترل و تست) در بافت يكساني صورت گرفته است. جهت آزمايش بعد از تميز نمودن و جدا كردن قسمتهاي آسيب ديده، بافتها را بصورت حلقه هاي ۵-٣ ميلي متري در آورده و بين دو قلاب مثلثي شكل از جنس فولاد زنگ نزن قرار داديم، بطوريكه قلاب پائيني در داخل حمام عضو (Organ Bath) ثابت و قلاب بالائي توسط يك تكه نخ به ترانسديوسر ايزومتريك RI-202P, 0-25Gr, Germany و HUGO Isometeric وصل شد تا پاسخ هاي عروقي را براي ثبت به دستگاه Lab Power ADInstrument, Recordr: 4Sp, Amplifier: QUAD Brige منتقل كند. دستگاه مزبور نيز جهت ثبت و ذخيره داده ها به كامپيوتر متصل بود. تحت شرايط فوق بافتها در داخل محلول كربس در دماي ٣٧

درجه سانتيگراد تحت كشش اوليه ۳ گرم كه با بررسيهاي اوليه بعنوان كشش بهينه (optimum) تعيين شده بود، قرار گرفتند. تنفس بافتي با گاز كاربوژن (۹۵% O_2 + ۵% CO_2) 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 كشش پايه تنظيم و عمل شستشو انجام مي گرفت. قبل از هر آزمايش عملكرد آندوتليوم بافت با پاسخ شلي مناسب به استيل كولين و يا كارباكول بررسي مي شد. زماني بافت براي آزمايش مناسب بود كه پاسخ انقباضي به دوز يكساني از كلرايد پتاسيم در دو مرحله متوالي يكسان ميشد. ابتدا منحني دوز پاسخ به پتاسيم كلرايد و پروستاگلاندين $F_{2\alpha}$ بصورت تجمعي رسم شد و از روي اين منحني ها مقدار زير حداكثـــــــــر (sub maximal) (تقريباً EC_{80}) از پروستاگلاندين $F_{2\alpha}$ و پتاسيم كلرايد تعيين و براي ايجاد انقباض پايدار در آزمايشات مختلف استفاده گرديد. نسبت به اثر شل كنندگي بتا استراديول منحني دوز پاسخ به شكل غير تجمعي رسم گرديد و از روي آن غلظت مناسب براي مطالعات بعدي مشخص شد. در بررسي مكانيسم اثر دارو بافت بمدت ۲۰ دقيقه درحضور حامل و يا تركيب تاثير گذار انكوبه 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 پاسخ انقباضي ناشي از ماده منقبض كننده محاسبه گرديد. تخريب بافت اندوتليوم عروق با سايبدن قسمت داخلي حلقه هاي رگي بوسيله نخ مناسب بدون تاثير مهم بر خواص انقباضي ناشي از آگونيست ها در اين مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

نقش كانالهاي پتاسيمي و فاكتور هيپرپولاريزه كننده مشتق از آندوتليوم (Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor, EDHF) در اثر شل كنندگي استراديول با انكوباسيـــون حـــلقه هاي وريد در حضور بلوكه كننده هاي مختلف كانالهاي پتاسيمي شامل: گلي بنكلاميد، ۴-آمينوپيريدين، تترا اتيل آمونيوم (در غلظتهاي پايين ۱ mM و بالا ۱۰mM) باريم كلرايد و مصرف همزمان كاريبدوتوكسين و آپامين مطالعه شد. براي ارزيابي نقش آندوتليوم در اثر مهاري تترا اتيل آمونيوم (mM ۱۰) در اثر شلي استراديول آزمايش در بافتهاي فاقد آندوتليوم تكرار گرديد.

۳-۲: روشهاي آماري

تمام نتايج بصورت mean ± sem نشان داده شده اند. پاسخ شلي ايجاد شده توسط استروژن٤٠ دقيقه بعد از افزودن آن به محيط، اندازه گيري و بر اساس درصد شلي انقباض ناشي از منقبض كننده ها در وريد سافن انسان بيان شده است. با توجه به اينكه داده هاي مربوط به گروههاي كنترل و تست بر روي بافت يكساني انجام مي گرفت، براي آناليز نـــتايج از t-test مزدوج استفاده شده است. مقادير P كمتر از ۰/۰۵ معني دار در نظر گرفته شده است. n تعداد نـــمونه هاي مورد آزمايش را نشان ميدهد.

۳- نتايج

۱-۳: اثر ٤- آمينوپيريدين برروي شلي عروقي ناشي از ۱۷بتا-استراديول

٤- آمينوپيريدين در غلظت ۱mM بطور انتخابي كانالهاي پتاسيمي وابسته به ولتاژ (K_V) را در عضلات صاف عروق مهار ميكند (۹). اين كانالها در تونيسيته رگها نقش مهمي دارند ولي نقش آنها در آندوتليوم مشخص نشده است. انكوبه كردن بافت وريد سافن انسان بمدت ۲۰ دقيقه در حضور ٤-آمينوپيريدين (۱µM) بر روي اثر شلي B-EST (۲۰µM) در انقباض ناشي از $PGF_{2\alpha}$ (۱/۵ µM) تاثـــير معني داري ايجاد نكرد.

۲-۳: اثر تترا اتيل آمونيوم برروي شلي عروقي ناشي از ۱۷بتا-استراديول

تترا اتيل آمونيوم (TEA) بصورت وابسته به دوز عمل ميكند، بطوريكه در غلظتهاي پايين در محدوده ۱ ميلي مول كانالهاي پتاسيمي فعال شونده با يون كلسيم با هدايت بالا (BK_{Ca}) را مهار ميكند و در دوزهاي ۱۰ ميلي مول انواع

ديگري از كانالهاي پتاسيم فعال شونده با كلسيم يعني با هدايت آهسته (SK_{Ca}) وبا هدايت متوسط (IK_{Ca}) را مهار مينمايد (۹). در حضور TEA با غلظت ۱ميلي مول، اثر شلي B-EST (۲۰μM) در انقباض ناشي از $PGF_{2\alpha}$ (۱/۵ μM) تغيير معني دار نيافت (شكلA۱). ولي با افزايش غلظت TEA به ۱۰ ميل مول، اثر شلي بتا استراديول بطور معني داري كاهش يافت (شكلB۱). با تخريب بافت آندوتليوم وريد سافن كاهش معني دار اثر شل كنندگي ناشي از TEA با غلظت ۱۰ميلي مول حذف شد (شكل۲).

۳-۳: اثر گلي بنكلاميد بر روي شلي نـــــاشي از ۱۷بتا-استراديول

گلي بنكلاميد بطور انتخابي كانالهاي پتاسيم وابسته به ATP را با اتصال به گيرندهاي خود در روي سلولهاي عضلات صاف عروق مهار ميكند (۱۰). اثر شلي بتا استراديول در وريد سافن انسان (۸۲/۸۰±۹/۳۹) با گلي بنكلاميد (۳μM) (۸٦/٤۹±۳/۸۳) تحت تاثير قرار نگرفت (شكل۳).

٤-۳- اثر Charybdotoxin و Apamin بر روي شلي ناشي از ۱۷بتا-استراديول

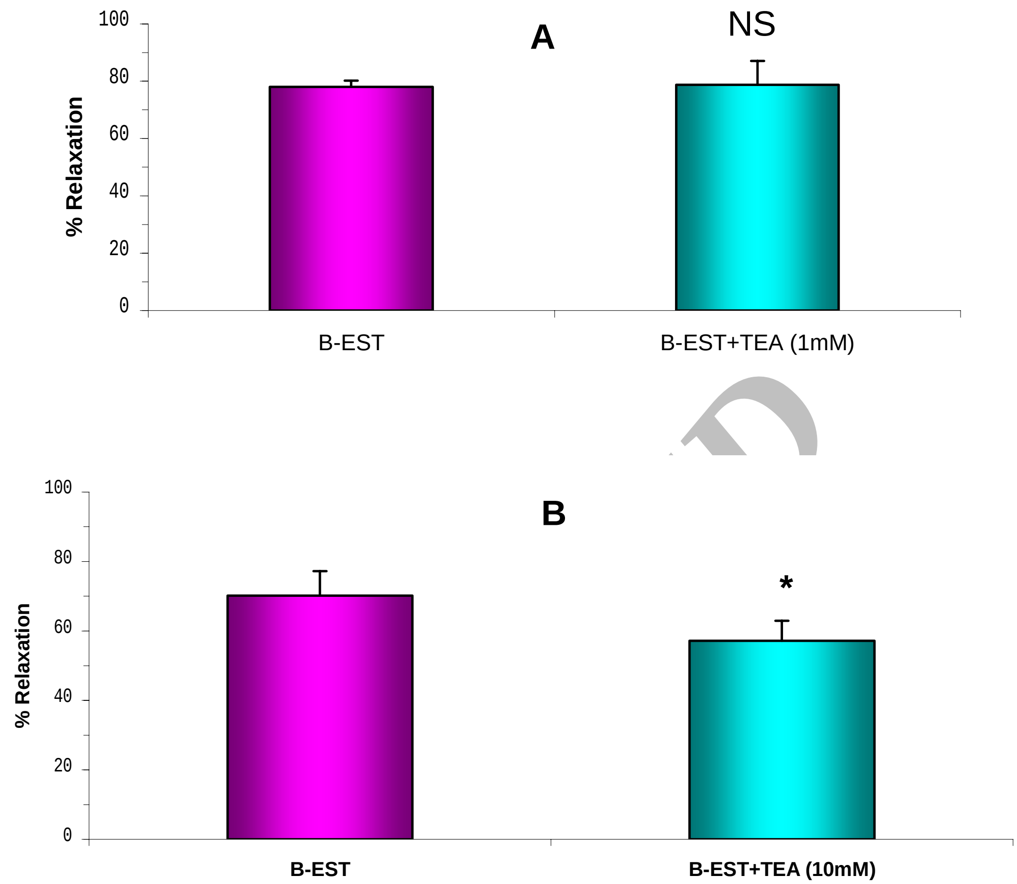
كاريبدوتوكسين و آپامين بطور توام در مطالعات بافت عروقي بعنوان مهار كننده EDHF استفاده ميشوند در اين مطالعه نيز اثر توام كاريبدوتوكسين (۱۰۰ nM) و آپامين (۳۰۰ nM) بر روي اثر شل كنندگي بتا استراديول در انقبـــــاض ناشي از $PGF_{2\alpha}$ (۱/۵ μM) بررسي شد. نتايج نشان ميدهد كه مصرف توام اين دو تركيب، اثر شل كنندگي بتا استراديول را در وريد سافن انساني بطور معني داري ($P<۰/۰۱$) كاهش ميدهد (شكل های ۵-٤).

۵-۳- اثر باريم كلرايد برروي شلي نـــــــاشي از ۱۷بتا-استراديول

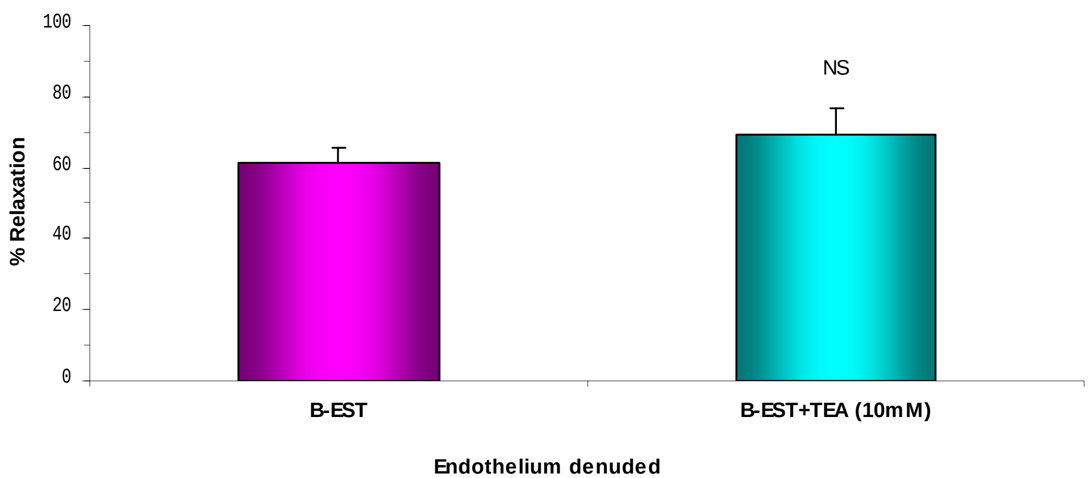
باريم كلرايد بعنوان مهار كننده كانالهاي پتاسيمي از نوع Inward Rectifying (K_{IR}) عمل مي كند. با عنايت به اينكه باريم كلرايد در مطالعات قبلي در دوزهاي مختلفي بين ۱۰ تا ۱۰۰ ميلي مول مورد استفاده قرار گرفته بود (۱۱)، در اين مطالعه از دوز ۱۰ و ۳۰ ميكرومول اين تركيب استفاده گرديد. باريم كلرايد با دوز ۱۰ ميكرومول بر روي اثر شلي بتا استراديول تاثير معني داري نداشت (شكل ۶ A) ولي در دوز بالا (۳۰μM) اثر شلي بتا استراديول را بطور معني داري($P<۰/۰۱$) كاهش داد (شكل B۶).

٦-۳- اثر كلرايـــــــد پتاسيم برروي شلي ناشي از ۱۷بتا-استراديول

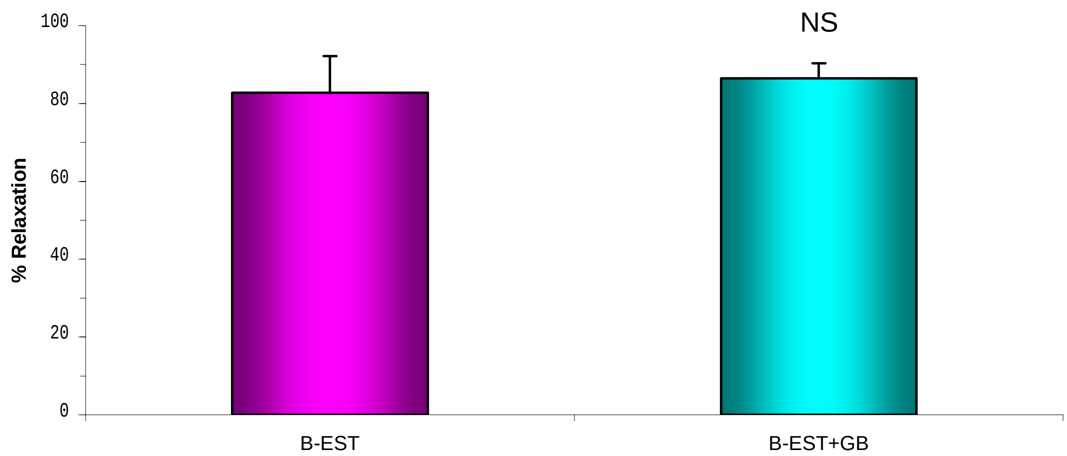
پروتوكول معمول براي تعيين دخالت فاكتور هيپرپولاريزه كننده مشتق از آندوتليوم در شلي عضلات صاف عروق عبارت است از اضافه نمودن پتاسيم كلرايد، به مقدار لازم براي دپولاريزاسيون (۳۰-٦۰mM)، در روي بافت منقبض شده با ساير مواد فعال عروقي و سپس بررسي اثر تركيب شل كننده در اين حالت است (۹). نمونه اي از روش آزمايش بررسي تاثير كلرايد پتاسيم در اثر شلي بتا-استراديول بر روي انقباض ناشي از $PGF_{2\alpha}$ در وريد سافن انسان در شكل ۷ نشان داده شده است. كلرايد پتـــاسيم (۳۰ mM) پاسخ شلي به بتا-استراديول را بطور متوسط حدود ٤۰% ($P<۰/۰۱$) كاهش داد (شكل ۸).



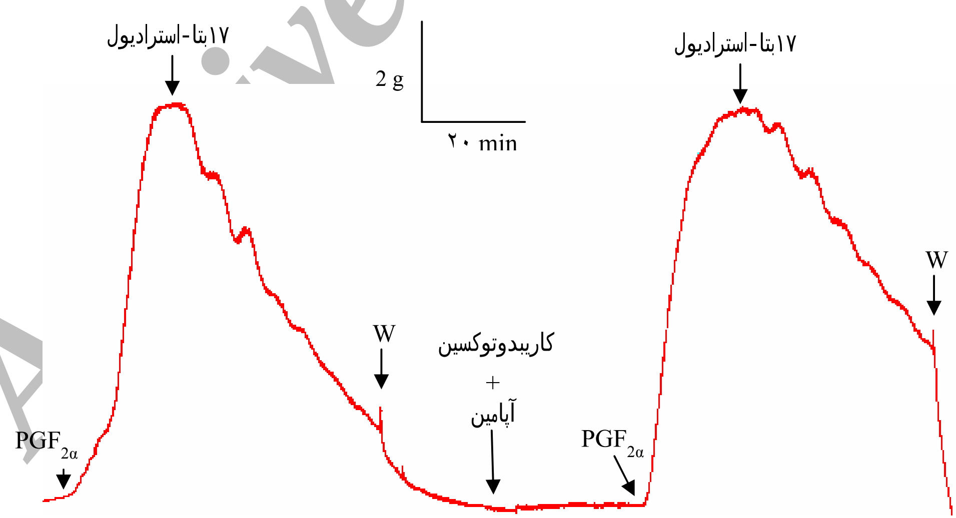
شكل ۱: اثر شلي B-EST (۲۰µM) بر روي انقباض ناشي از PGF2α (۱/۵ µM) در وريد سافن انساني با آندوتليوم سالم در حضور و عدم حضور تترااتيل آمونيوم (TEA) (A) (۱mM) و (B) (۱۰ mM). داده ها (mean±sem) بصورت درصدي از شلي نسبت به انقباض اوليه توسط $PGF_{2\alpha}$ بيان شده است، NS: تفاوت معني داري با گروه كنترل ندارد (n=٦ ، P >۰/۰۵)، *: تفاوت معني داري با گروه كنترل دارد (n=٦ ، P<۰/۰۵).



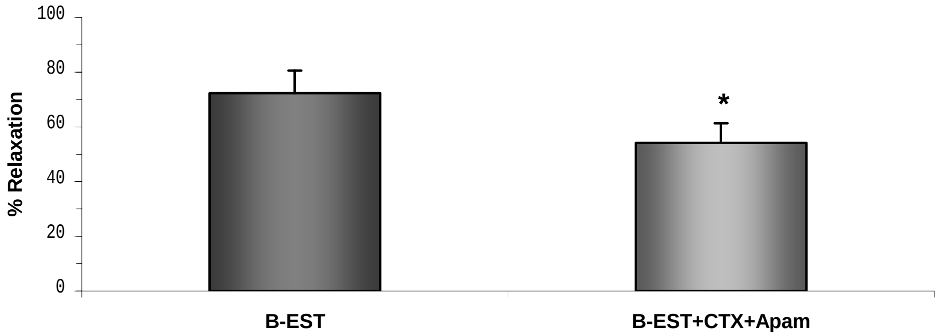
شكل ۲: اثر شلي B-EST (۲۰µM) بر روي انقباض ناشي از PGF2α (۱/۵µM) در وريد سافن انساني با آندوتليوم تخريب شده در حضور و عدم حضور تترااتيل آمونيوم (TEA ،۱۰mM). داده ها (mean±sem) بصورت درصدي از شلي نسبت به انقباض اوليه توسط PGF2α بيان شده است، NS: تفاوت معني داري با گروه كنترل ندارد، (n=٦ ،P</۰۵).



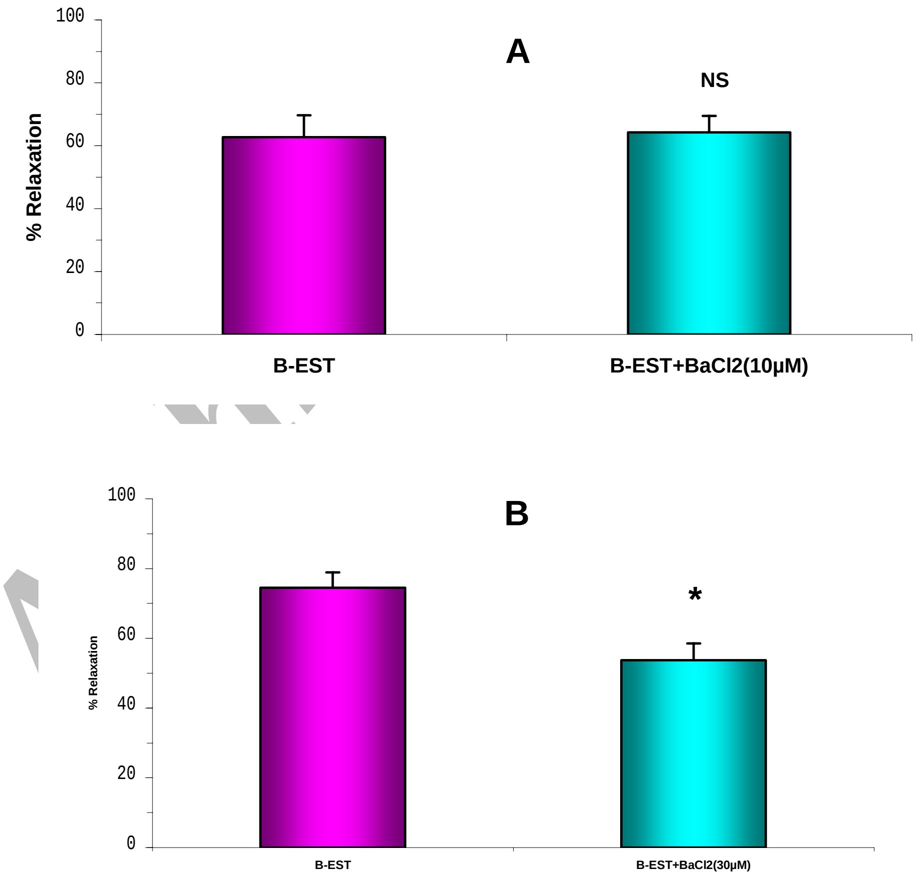
شكل ۳: اثر شليB-EST (۲۰ µM) بر روي انقباض ناشي از PGF2α (۱/۵ µM) در وريد سافن انساني با آندوتليوم سالم در حضور و عدم حضور گلي بنكلاميد (۳ µM ،GB). داده ها (mean±sem) بصورت درصدي از شلي نسبت به انقباض اوليه توسط PGF2α بيان شده است. NS: تفاوت معني داري با گروه كنترل ندارد (n=٦ ، P>۰/۰۵).



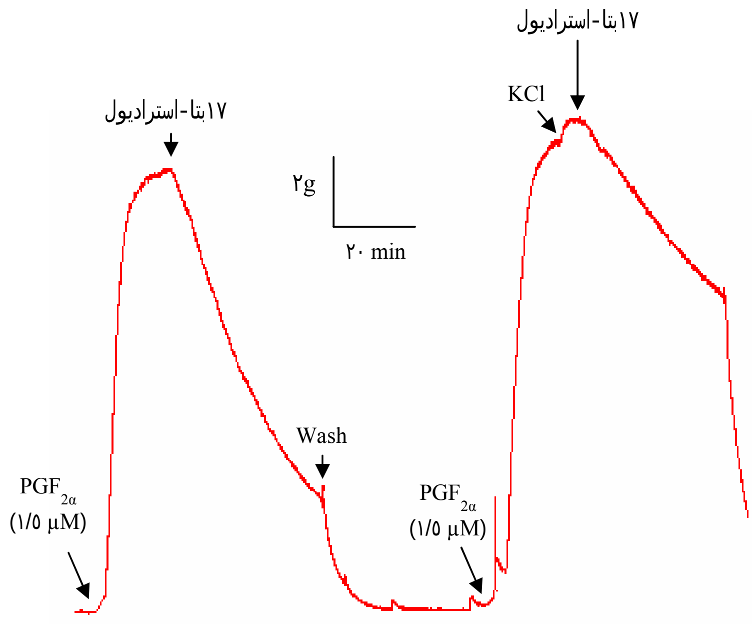
شكل٤: نمونه اي از آزمايش بررسي تاثير كاريبدوتوكسين و آپامين بر روي اثر شلي ۱۷بتا-استراديول در انقباض ناشي از $PGF_{2\alpha}$ در وريد سافن انساني (W= Wash).



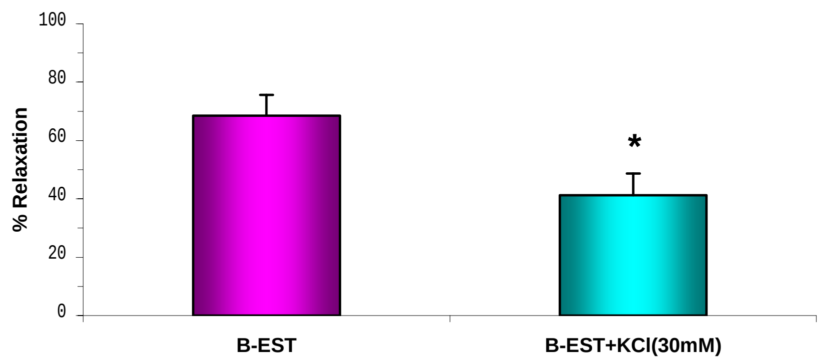
شكل ۵: تاثير توام كاريبدوتوكسين (CTX، ۱۰۰ nM) و آپامين (Apam، ۳۰۰ nM) بر روي اثر شليB-EST (۲۰ µM) در انقباض ناشي از $PGF_{2\alpha}$ (۱/۵ µM) در وريد سافن انساني با آندوتليوم سالم. داده ها (mean±sem) بصورت درصدي از شلي نسبت به انقباض اوليه توسط $PGF_{2\alpha}$ بيان شده است، *: تفاوت معني داري با گروه كنترل دارد (n=٦ ، P<۰/۰۵).



شكل ٦: اثر شليB-EST (۲۰ µM) بر روي انقباض ناشي از در وريد سافن انساني با آندوتليوم سالم در حضور باريم كلرايد (A) ۱۰ ميلي مول ($BaCl_2$ ،۱۰ mM) و (B) ۳۰ ميلي مول ($BaCl_2$ ،۳۰ mM). داده ها (mean±sem) بصورت درصدي از شلي نسبت به انقباض اوليه توسط $PGF_{2\alpha}$ بيان شده است، NS: تفاوت معني داري با گروه كنترل ندارد، (n=٦، P >۰/۰۵)، *: تفاوت معني داري با گروه كنترل دارد (n=٦ ، P<۰/۰۱).



شكل ۷: نمونه اي از روش آزمايش تاثير كلرايد پتاسيم (۳۰ mM) در اثر شلي ۱۷بتا-استراديول در وريد سافن انساني در انقباض ناشي از $PGF_{2\alpha}$



شكل ۸: اثر شليB-EST (۲۰ μM) بر روي انقباض ناشي از PGF2α (۱/۵ μM) در وريد سافن انساني با آندوتليوم سالم در حضور كلرايد پتاسيم (KCl، ۳۰ mM). داده ها (mean±sem) بصورت درصدي از شلي نسبت به انقباض اوليه توسط PGF2α بيان شده است، *: تفاوت معني داري با گروه كنترل دارد (n=۵ ، P<۰/۰۱).

٤- بحث

چهار نوع از كانالهاي پتاسيمي در عملكرد فيزيولوژيک و پاسخ داروئي عروق (عضلات صاف و سلولهاي آندوتليال) مهم است كه عبارتند از : ۱- كانالهاي پتاسيم فعال شونده با يون كلسيم كه بسته به هدايت يوني به زير نوع هاي پايين (SK_{Ca})، متوسط(IK_{Ca}) و زياد (BK_{Ca}) تقسيم مي شوند. ۲- كانالهاي پتاسيمي فعال شونده با ولتاژ (K_V) كه در عضلات صاف عروق با دپولاريزاسيون غشاء در محدوده فيزيولوژيك (۳۵- تا ۵۵- ميلي ولت) فعال مي شوند. ۳- كانالهاي پتاسيمي حساس به ATP (K_{ATP}) كه با ATP داخل سلولي مهار مي شوند. ٤- كانالهاي پتاسيمي با جريان

ترجيحي رو به داخل (Inward Rectifier) (١٢). در مطالعه حاضر با استفاده از ابزار هاي فارماكولوژيك كه بطور انتخابي اين كانالها را مهار ميكنند، نقش كانالها را در اثر شلي ١٧بتا-استراديول در وريد سافن انسان مورد مطالعه قرار داديم. بررسي تحقيقات انجام شده نشان ميدهد كه استروژن در بعضي از بسترهاي عروقي حيوانات و حتي در قلب با تاثير بر كانالهاي پتاسيمي اثر محافظتي اعمـــــال مي كند. در مطالعه اي كه توسط Darkow و همكارانش صورت گرفت نشان داده شد كه ١٧بتا-استراديول كانالهاي پتاسيمي با هدايت بالا و فعال شونده با يون كلسيم (BK_{Ca}) را در ميوسيت هاي كرونر فعال مي كند. در تاييد اين يافته، در مطالعه ديگري مشخص گرديد كه ١٧بتا-استراديول جريان خون شريان رحم گوسفند را حدود ١٠ برابر افزايش ميدهد كه اين افزايش با تركيب ترا اتيل آمونيوم (١mM) مـــهار مي شود (١٣). ترا اتيل آمونيوم با غلظت ١ ميلي مول بطور انتخابي كانالهاي پتاسيمي با هدايت بالاي فعال شونده با يون كلسيم را مهار مي كند (١٤-١٣ و ٩). در مطالعه حاضر، انكوباسيون بافت وريد سافن انسان بمدت ٢٠ دقيقه در حضور ترا اتيل آمونيوم با دوز ١ ميلي مول در اثر شلي ناشي از بتا-استراديول نسبت به حالت كنترل تاثير معني داري ايجاد نكرد (شكل ٢A). اين نتيجه مشخـــص مي كند كه بر خلاف مطالعات بالا، كانالهاي پتاسيم BK_{Ca} در اثر شلي بتا-استراديول در وريد سافن انسان نقشي ندارند. ترا اتيل آمونيوم در غلظتهاي بيشتر (١٠mM) علاوه بر كانالهاي BK_{Ca}، كانالهاي پتاسيمي با هدايت پايين (SK_{Ca}) و متوسط (IK_{Ca}) فعال شونده با يون كلسيم را نيز مـــــهار مي نمايد (١٤-١٣ و ٩). انكوباسيون بافت بمدت ٢٠ دقيقه در حضور ترا اتيل آمونيوم، (١٠mM) اثر شلي بتا-استراديول را در وريد سافن انساني با آندوتليوم سالم را بطور معني داري كاهش داد (شكل B٢، P<٠/٠٥). با حذف آندوتليوم اثر مهاري ترا اتيل آمونيوم (١٠mM) بر روي شلي بتا-استراديول از بين رفت (شكل٣). با توجه به اين نتايج مي توان احتمال داد كه حداقل قسمتي از اثر شلي بتا-استراديول در وريد سافن انسان از طريق فاكتور هيپرپولاريزه كننده مشتق از آندوتليوم (EDHF) صورت ميگيرد. در ادامه مطالعه براي تاييد اين استنتاج، اثر تركيبات كاريبدوتوكسين و آپامين در اثر شلي بتا-استراديول مورد بررسي قرار گرفت. سم آپامين مهار كننده انتخابي كانالهاي پتاسيمي SK_{Ca} است و كاريبدوتوكسين بصورت غير انتخابي كانالهاي پتاسيمي BK_{Ca} و IK_{Ca} و بعضي از كانالهاي پتاسيمي وابسته به ولتاژ را مهار ميكند (١٥). در اكثر عروق كانالهاي SK_{Ca} و IK_{Ca} در سلولهاي آندوتليال عروق قرار دارند و با افزايش يون كلسيم داخل سلولي فعال مي شوند (١٦). كاريبدوتوكسين و آپامين بصورت توام بعنوان مهاركننده فاكتور هيپر پولاريزه كننده مشتق از آندوتليوم در مطالعات مختلف استفاده شده است (١٧). در مطالعه حاضر انكوباسيون بافت وريد سافن انساني با آندوتليوم سالم در حضور آپـــامين (٣٠٠ nM) و كاريبدوتوكسين (١٠٠nM) پاسخ شلي بـــه بتا-استراديول را بطور معني داري نسبت به حالت كنترل كاهش داد (شكل ٥، P<٠/٠١). اين نتيجه نيز تاييد مي نمايد كه احتمالاً قسمتي از اثر شلي بتا-استراديول در وريد سافن انسان از طريق EDHF واسطه گري مي شود. در مطالعات ديگر بر روي بافتهاي عروقي مختلف از جمله در عروق مزانتر رت مشاهده شده است (١٨). بدنبال توصيف EDHF در حيوانات، در بافت هاي انساني پاسخ واسطه گري شده با EDHF در عروق كرونر (١٩)، سينه اي داخلي (٢٠)، شريانچه هاي مغزي (٢١) و عروق مقاومتي قسمتهاي مختلف (٢٢) گزارش گرديد. نامزدهاي مختلفي كه براي توجيه پاسخ واسطه گري شده با EDHF در عروق حيواني پيشنهاد شده است احتمالاً در عروق انساني نيز نقش دارند. اين نامزدها شامل: ١- اپوكسي ايكوزا ترا انوئيك اسيد مشتق از سيتوكروم P450 اكسيداز در شريانهاي كرونري، سينه اي داخلي و زيرجلدي، ٢- شكافهاي ارتباطي ميوآندوتليال (Myoendothelial Gap Junctions) در عروق زيرجلدي، ٣- يون پتاسيم در شريانهاي بين لوبولي كليوي و ٤- پراكسيد هيدروژن در شريانهاي كرونري و مزانتريك است. در حالت in vivo ارزيابي نقش EDHF در پاسخ شلي عروق مشكل است و مطالعات كمتري طراحي شده است با وجود اين در عروق بازو (forearm)، افزايش جريان خون ناشي ازبرادي كينين و ماده P با مكانيسم

مستقل از پروستانوئيد و نيتريك اكسايد و وابسته به فعاليت كانالهاي پتاسيمي نشان داده شده است. با عنايت به اينكه تترا اتيل آمونيوم در دوزهاي پايين كانالهاي BK_{Ca} را مهار مي كند و در مطالعه ما بر روي اثر شلي بتا-استراديول بي تاثير بود، بنابراين بتا-استراديول از طريق كانالهاي مزبور در هيپرپولاريزاسيون و شلي وريد سافن نقش ندارد، يا به عبارتي ديگر در وريد سافن انسان فاكتور هيپرپولاريزه كننده مشتق از آندوتليوم، اپوكسي ايكوزا تترانوئيك اسيد نيست. همانطوريكه اشاره شد يكي از نامزدهاي مطرح در مورد EDHF يون پتاسيم است (۲۳). با تحريك گيرنده هاي آندوتليال كانالهاي پتاسيمي فعال شونده با كلسيم (K_{Ca}) باز مي شوند و يون پتاسيم از داخل سلوهاي آندوتليال خارج مي شود كه در نتيجه آن غلظت يون پتاسيم در فضاي خارج سلولي، بين سلولهاي آندوتليال و عضلات صاف عروق (از ۳mM/L تا ۱۲mM/L) افزايش ميیابد. افزايش يون پتاسيم به نوبه خود فعاليت كانالهاي پتاسيمي با جريان ترجيحي رو به داخل (K_{IR}) و يا پمپ Na+/K+ را در سلولهاي عضلات صاف افزايش ميدهد كه در نتيجه منجر به هيپرپولاريزاسيون و گشادي عروق مي شود (۲۴-۲۳). باريم كلرايد با دوزهاي مختلف به عنوان مهار كننده K_{IR} در مطالعات مختلف استفاده شده است.

در دوز پايين اين تركيب بر روي اثر شلي ناشي از بتا-استراديول در وريد سافن بي تاثير بود (شكل ٦A، $P>0/05$) ولي غلظت بالاي آن (۳۰ ميلي مول) ميزان شلي بتا-استراديول را در وريد سافن كاهش داد (شكل ٦B، $P<0/05$). اين يافته مشخص مي نمايد كه قسمتي از اثر شلي بتا-استراديول در وريد سافن انسان ازطريق كانالهاي مزبور واسطه گري مي شود. يك پروتوكول معمول براي تعيين دخالت فاكتور هيپرپولاريزه كننده مشتق از آندوتليوم در شلي عضلات صاف عروق عبارت است از اضافه نمودن پتاسيم كلرايد، به مقدار لازم براي دپولاريزاسيون (۳۰mM)، در روي بافت منقبض شده با ساير مواد فعال عروقي و سپس بررسي اثر تركيب شل كننده است (۹). كلرايد پتاسيم در غلظت ۲۰ تا ۳۰ ميلي مول با دپولاريزاسيون غشا عملكرد كانالهاي K_{IR} را تحت پوشش قرار ميدهد و مانع هيپرپولاريزاسيون مي شود. در اين مطالعه نيز اضافه نمودن كلرايد پتاسيم (۳۰mM) در روي انقباض ناشي از $PGF_{2\alpha}$ اثر شلي بتا-استراديول را در وريد سافن انساني با آندوتليوم سالم ۳۹/۷% كاهش داد. كه اين كاهش از نظر آماري معني دار است (شكل۹، $P<0/05$).

اين موضوع نيز تاييد مي نمايد كه قسمتي از اثر شلي بتا-استراديول در وريد سافن انساني از طريق EDHF است و فاكتور EDHF در اين بافت يون پتاسيم است كه احتمالاً از طريق زير نوعهاي SK_{Ca} و IK_{Ca} كانالهاي پتاسيـــمي فعال شونده با يون كلسيم از سلولهاي آندوتليال آزاد و بـــا فعال نمودن كانالهاي K_{IR} در سلولهاي عضلات صاف وريد سافن انسان باعث هيپرپولاريزاسيون و شلي مي شود.

براي پاسخ به اين سوال كه آيا كانالهاي پتاسيم ديگري در اثر شلي بتا-استراديول در وريد سافن انسان نقش دارد يا نه ؟ اثرات شلي بتا-استراديول در اين بافت در حضور ٤-آمينوپيريدين و گلي بنگلاميد بررسي گرديد. ٤- آمينوپيريدين در غلظت ۱mM بطور انتخابي كانالهاي پتاسيمي وابسته به ولتاژ (K_V) (۹) و گلي بنكلاميد بطو انتخابي كانالهاي پتاسيم وابسته به ATP را با اتصال بـــه گيرنده هاي خود در روي سلولهاي عضلات صاف عروق مــــهار مي كنند (۱۰).

هيچ يك از اين دو تركيب بر اثر شلي بتا-استراديول تاثير معني داري نداشتند كه نشان ميدهد كانالهاي پتاسيمي وابسته به ولتاژ و ATP در اثر شلي بتا-استراديول در وريد سافن نقش ندارند. H_2O_2 يكي از نامزدهاي مطرح بعنوان EDHF است. H_2O_2 بـا مكانيسم هاي مختلف توليد مي شود و يكي از مكانيسمهاي مهم، توليد سوپراكسايد توسط سلولهاي آندوتليال است كه توسط آنزيم سوپر اكسايد ديسموتاز به H_2O_2 تبديل مي شود. H_2O_2 توليد شده با تحريك كانالهاي پتاسيمي وابسته به ATP، BK_{Ca} و K_V در سلولهاي عضلات صاف باعث هيپرپلاريزاسيـــــون مي شود (۱۹). چون مهار كننده هاي كانالهاي پتاسيمي فوق بـــــر اثر شلي بتا-استراديول در وريد سافن انسان بي تاثير هستند بنابراين H_2O_2 در اثر شلي بـــتا-

استراديول نقش ندارد و احتمالاً H_2O_2 در وريد سافن انسان فاكتور هيپرپولاريزه كننده مشتق از آندوتليوم نيست. براساس يافته هاي فوق مي توان نتيجه گيري كرد كه آزادي فاكتور هيپرپولاريزه كننده مشتق از آندوتليوم كه با شركت كانالهاي پتاسيمي حساس به كاريبدوتوكسين و آپامين و يون پتاسيم انجام مي شود، در اثر شل كنندگي بتا- استراديول در وريد سافن انساني نقش دارد.

۵- تقدير وتشكر

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 و همچنين كادر آزمايشگاه فارماكولوژی مرکز تحقیقات کاربردی داروئی خانم دكتر افسانه قره باقری و خانم دکتر طاهره اعتراف اسکوئی بخاطر همکاری شايسته در طول اجرای پروژه صميمانه تشكر و قدرداني ميشود.

7- References:

1- World Health Organization. The World Health Report 2000. Geneva: World Health Organization: 2000. http://www.who.int/whr/2000/en/index.html (last accessed 7 December 2007).

2- The Principal Investigators of the MONICA Project. WHOMONICA Project: geographic variation in mortality from cardiovascular diseases — baseline data on selected population characteristics and cardiovascular mortality. World Health Stat Q 1987, 40: 171-84.

3- Greenland P, Knoll MD, Stamler J, Neaton JD, Dyer AR, Garside DB, Wilson PW. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. JAMA, 2003, 290: 891–897.

4- Maturana, MA, Irigoyen, MC, Spritzer, PM Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. Clinics, 2007, 62(1): 77-86.

5- 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.

6- Dursun N, Arifoglu C, Süer C. Relaxation effect of estradiol on different vasoconstrictor-induced responses in rat thoracal artery. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2006, 17(4): 289-94.

7- Raja SG, Haider Z, Ahmad M, Zaman. Saphenous Vein Grafts: To Use or Not to Use? Heart, Lung and Circulation, 2004, 13(4): 403-409

8- Viaro F, Carlotti CG, Rodrigues AJ, Vicente WV, Bassetto S, Reis GS, Junior LA, Evora PR, Endothelium dysfunction caused by acute pressure distension of human saphenous vein used for myocardial revascularization, Braz J Cardiovasc Surg. 2007; 22(2): 169-175.

9- McGuire JJ, Hollenberg MD, Andrade-Gordon P, Triggle CR. Multiple mechanisms of vascular smooth muscle relaxation by the activation of proteinase-activated receptor 2 in mouse mesenteric arterioles. Br J Pharmacol, 2002,135(1):155-69.

10- van Ginneken EE, Meijer P, Verkaik N, Smits P, Rongen GA. ATP-induced vasodilation in human skeletal muscle. Br J Pharmacol., 2004, 141(5): 842-50.

11- Leung FP, Yao X, Lau CW, Ko WH, Lu L, Huang Y. Raloxifene relaxes rat intrarenal arteries by inhibiting Ca^{2+} influx. : Am J Physiol Renal Physiol., 2005, 289(1): 137-44.

12- Jackson WF. Ion Channels and Vascular Tone. Hypertension, 2000, 35, 173-178

13- Rosenfeld CR, Cornfield DN, Roy T. Ca^{2+}-activated K^+ channels modulate basal and E(2)beta-induced rises in uterine blood flow in ovine pregnancy. Am J Physiol Heart Circ Physiol., 2001, 281(1): H422-31.

14- White RE, Han G, Maunz M, Dimitropoulou C, El-Mowafy AM, Barlow RS, Catravas JD, Snead C, Carrier GO, Zhu S, Yu X. Endothelium-independent effect of estrogen on $Ca^{(2+)}$-activated $K^{(+)}$ channels in human coronary artery smooth muscle cells. Cardiovasc Res., 2002, 53(3): 650-61.

15- Edwards G, Thollon C, Gardener MJ, Feletou M, Vilaine J, Vanhoutte PM, Weston AH. Role of gap junctions and EETs in endothelium-dependent hyperpolarization of porcine coronary artery. Br J Pharmacol., 2000, 129(6): 1145-54.

16- Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: Bringing the concepts together. Trends Pharmacol. Sci., 2002, 23: 374–80.

17- Gluais P, Edwards G, Weston AH, Falck JR, Vanhoutte PM, Feletou M. Role of $SK_{(Ca)}$ and $IK_{(Ca)}$ in endothelium-dependent hyperpolarizations of the guinea-pig isolated

carotid artery. Br J Pharmacol., 2005,144(4): 477-85.
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- Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. Circ Res., 2003, 92: 31-40.
20- Archer SL, Gragasin FS, Wu X, Wang S, McMurthry S, Kim DH Platonov M, Koshal A, Hashimoto K, Campbell WB, Falck JR, Michelakis ED. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxieicosatrienoic acid and causes relaxation by activating $BK_{(Ca)}$ channels. Circulation, 2003, 107(5): 769-76.
21- Petersson J, Zygmunt PM, Högestätt ED. Characterization potassium channels involved in EDHF-mediated relaxation in cerebral arteries. Br J Pharmacol., 1997, 20: 1344–50.
22- Halcox JP, Narayanan S, Cramer-Joyce L, Mincemoyer R, Quyyumi AA. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation. Am J Physiol, 2001, 280: H2470–77.
23-Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. Nature. 1998, 396:269-72.
24- Edwards G, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor-a critical appraisal. Prog Drug Res. 1998, 50:107-33.