Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۴، شماره ۲، پائیز و زمستان ۷۹

انبساط عضله صاف عروق ریوی از مسیرهای آدنوزین مونو فسفات حلقوی

مسعود کاولی حقیقی
پژوهشکده گیاهان دارویی و فرآورده‌های طبیعی جهاد دانشگاهی، گروه فارماکولوژی

چکیده

انبساط عضله صاف عروق ریوی از طریق مسیر آدنوزین ′۳، ′۵ مونو فسفات حلقوی، مکانیسم اصلی کنترل قطر عروق ریوی است. هدف از این تحقیق مقایسه قدرت و اثربخشی داروهایی است که از طریق اتصال با گیرنده و مسیرهای cAMP موجب انبساط عروق ریوی می‌شوند. آزمایشات بر روی حلقه شریان‌های اصلی ریه رت (rat) و با استفاده از داروهای منبسط کننده عروقی شامل ایزوپروترنول (آگونیست بتا آدرنوسپتور)، آدنوزین (آگونیست P_1 پورینوسپتور)، آدنوزین دی فسفات و آدنوزین تری فسفات (آگونیست‌های P_2 پورینوسپتور) و هیستامین (آگونیست H_2 هیستامین) انجام شد. این داروها موجب انبساط وابسته به غلظت حلقه شریان‌های ریوی رت از قبل منقبض شده با ۱۰۰ نانومول فنیل افرین (۷۵ درصد حداکثر اثر، EC_{75}) شدند. منحنی‌های پاسخ ـ غلظت حلقه شریان‌های ریوی رت که به ترانسدیوسرهای گراس (FTO3) متصل بودند بر روی پلی گراف گراس مدل ۷ ثبت و نشان داده شدند. ایزوپروترنول (ISO) از غلظت ۱۰۰ پیکومول تا ۱۰ میکرومول، آدنوزین (AD) از غلظت ۳۰ میکرومول تا ۱۰۰ میکرومول، آدنوزین دی فسفات (ADP) و آدنوزین تری فسفات (ATP) هر کدام از غلظت ۱۰ نانومول تا ۱۰ میکرومول و هیستامین (HIS) از غلظت ۱ میکرومول تا ۱۰۰ میکرومول موجب انبساط وابسته به غلظت حلقه شریان‌های ریوی شدند. غلظت حداکثر پاسخ انبساطی ایجاد شده در این حلقه شریان‌ها با هر یک از آگونیست‌های ISO، ADP، ATP، ۱۰ میکرومول، با AD، ۱۰۰ میکرومول و با HIS، ۱ میلی مول بودند. درصد حداکثر پاسخ انبساطی ایجاد شده در این حلقه شریان‌ها به ترتیب به ISO، ۹۳/۰۴±۱/۲۵٪، به ADP، ۷۴۸/۳۹±۲/۶۸٪، به ATP، ۸۰/۴۸±۱/۹۳٪، به AD، ۷۲/۲۲±۳٪ و به HIS، ۶۹/۵۲±۴/۰۲٪ بودند. متوسط غلظت مؤثر (EC_{50}) برای ISO، ۰/۰۱ میکرومول، برای ADP، ۰/۵ میکرومول، برای ATP، ۰/۶ میکرومول، برای AD، ۷۰ میکرومول و برای HIS، ۱۰۰ میکرومول بودند. این آزمایشات نشان می‌دهند اگر چه تمام این آگونیست‌ها از طریق پیوند با گیرنده‌های خاص خود و فعال نمودن آنزیم AC و افزایش cAMP موجب انبساط این حلقه شریان‌ها می‌شوند ولیکن از نظر Potency و Efficacy تفاوت معنی‌داری دارند.

واژه‌های کلیدی : ایزوپروترنول، هیستامین، عروق ریوی، وازودیلاتاسیون، cAMP.

مقدمه

مکانیسم‌های اصلی انبساط عضله صاف عروق ریوی نهایتاً یا از طریق آدنوزین ′۳، ′۵ مونو فسفات حلقوی و یا از طریق گوانوزین ′۳، ′۵ مونو فسفات حلقوی فراهم می‌شوند [۸، ٤]. انبساط عضله صاف عروق

www.SID.ir

Archive of SID

ریوی از طریق cAMP به دنبال فعالیت تعداد محدودی از گیرنده‌های مختلف ایجاد می‌شود. این گیرنده‌ها ممکن است روی غشاء سلول صاف عروق و یا روی سلول آندوتلیال عروق ریوی یافت شوند. گیرنده‌های غشاء سلول عضله صاف عروق شامل گیرنده‌های بتا -۲ آدرنرژیک، گیرنده‌های آدنوزین نوع ۲ (A2) و گیرنده‌های هیستامین نوع ۲ (H2) می‌باشند. گیرنده‌های پورینرژیک نوع ۲ (P2) بر سلول‌های آندوتلیال عروق ریوی یافت می‌شوند. با فعال شدن این گیرنده‌ها آنزیم آدنیلات سیکلاز (AC) فعال می‌شود و این نیز به نوبه خود موجب افزایش تولید cAMP می‌شود. با افزایش تولید cAMP، پروتئین کیناز آ (PKA) فعال می‌شود [۱۵]. با وجود اینکه cAMP در ایجاد انبساط عروق ریوی نقش دارد. موادی که اثرات انبساط عروقی خود را از طریق فعال نمودن آنزیم AC و افزایش cAMP اعمال می‌کنند شامل آدنوزین [۲]، هیستامین [۲۳]، بتا - آدرنوسپتور آگونیست‌ها [۱۳، ۱]، آدنوزین دی و تری فسفات [۵]، پروستاگلاندین‌ها [۱]، فورسکولین [۲۲] و پپتیدوازواکتیو روده‌ای (VIP) [۱۲] می‌باشند. مطالعات فیزیولوژیکی نشان می‌دهند که بتا آدرنوسپتورها موجب گشاد شدن عروق ریوی و بسترهای عروق سیستمیک می‌شوند [۱۴]. انبساط عضله صاف عروق با بتا آدرنوسپتورها از طریق پیوند با گیرنده‌های خاص خود و فعال نمودن آنزیم AC و افزایش تولید cAMP ایجاد می‌شود [۲۱]. اثرات انبساط عروق ریوی به آدنوزین از طریق گیرنده‌های A2 [۱۹، ۳] و به ADP و ATP از طریق فعال شدن گیرنده P2 [۵] و افزایش cAMP داخل سلولی ایجاد می‌شوند. اثرات عروقی هیستامین در گونه‌های مختلف حیوانی و در انواع عروق خونی بررسی شده‌اند. دو نوع گیرنده هیستامینی H_1 و H_2 در کنترل تون عضله صاف عروق شناخته شده‌اند [۱۶]. عموماً اثر هیستامین در دستگاه گردش خون ریوی انقباض عروق ریوی است ولی هنگامی که تون عروق ریوی بطور غیر عادی افزایش یابد، این ماده موجب انبساط عروق ریوی می‌شود [۲۳]. اثر انبساط عروق ریوی هیستامین از طریق پیوند با گیرنده H_2 هیستامین و فعال شدن آنزیم AC و افزایش تولید cAMP ایجاد می‌شود [۵]. قدرت اثر (ED_{50}، غلظتی از آگونیست که نصف حداکثر پاسخ را ایجاد کند) و اثر بخشی (اندازه حداکثر پاسخ تولید شده با آگونیست) داروهایی که از طریق مسیرهای cAMP موجب انبساط عروق می‌شوند، مقایسه شده‌اند [۲۰]. در بررسی حاضر با وجود اینکه هر یک از این مسیرهای اتصال دارو ـ گیرنده نهایتاً موجب تولید cAMP می‌شوند ولی نتایج این بررسی نشان می‌دهد که تفاوت‌های معنی‌داری در قدرت اثر و اثر بخشی داروهای مورد آزمایش شده وجود ندارد.

مواد و روش‌ها

تحقیق به روش in vitro با استفاده از رت نر نژاد Wistar با وزن تقریبی ۳۰۰-۲۵۰ گرم انجام شد. رت‌ها در حیوانخانه تحت ۲۲-۱۸ درجه سانتی‌گراد حرارت و ۱۲ ساعت روشنایی (از ساعت ۶/۳۰ صبح تا ۱۸/۳۰ بعد از ظهر) و ۱۲ ساعت تاریکی و بدون هیچگونه محدودیت آب و غذا کنترل و نگهداری شدند. به هنگام آزمایشات رت‌ها از طریق ضربه‌ای بر سرشان بیهوش شدند و سپس سر آنها به وسیله چاقوی جراحی بریده شد. به منظور شکافتن ناحیه سینه و رویت و جداسازی قلب و ریه، رت‌ها از پشت بر روی تخت‌های چوب پنبه‌ای قرار داده شدند و به وسیله سوزن فرفره به شکل صلیب ثابت شدند. سپس با ایجاد شکاف در ناحیه سینه، ریه و قلب به همراه هم جدا شدند و در مایع کربس قرار گرفتند و

www.SID.ir

Archive of SID

بلافاصله شریان‌های ریه از بافت‌های چسبیده پاک شدند و به حلقه‌های ٤-٣ میلیمتری برش داده شدند. سپس هر یک از حلقه شریان‌ها بر روی دو قلاب استیل زنگ نزن به قطر ٠/٢ میلیمتر سوار شدند و پس از آن در حمام‌های بافتی ٢٥ میلی‌لیتری حاوی کربس ـ هنسلیت بافر ٣٧ درجه سانتیگراد که با مخلوطی از گازهای اکسیژن ٩٥٪ و انیدرید کربنیک ٥٪ هوا داده می‌شدند، قرار گرفتند. به منظور توازن در کشش، حلقه شریان‌ها به مقدار یک گرم و برای مدت یک ساعت تحت کشش قرار گرفتند. سپس آزمایشات با آگونیست‌های مورد نظر صورت گرفت. پاسخ‌های کششی به وسیله ترانسدیوسرهای گراس FTO3 که روی پلی گراف گراس مدل ٧ نشان داده می‌شد، ثبت شدند.

تحلیل آماری ـ پاسخ‌های انبساطی وابسته به غلظت این حلقه‌ها به صورت درصدی از حداکثر انقباض ایجاد شده با ١٠٠ نانومول فنیل افرین (غلظت ٧٥٪ حداکثر اثر) در یک جدول آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مقایسه شدند. سپس برای تعیین اختلاف پاسخ‌ها در هر نقطه از غلظت داروی خاص در گروه‌های مختلف از آزمون Tukey-Kramer Multiple Comparison استفاده شد. نتایج به صورت Mean ± SEM و با درنظر گرفتن P<٠/٠٥ به عنوان مرز اختلاف معنی دار بیان شدند.

نتایج

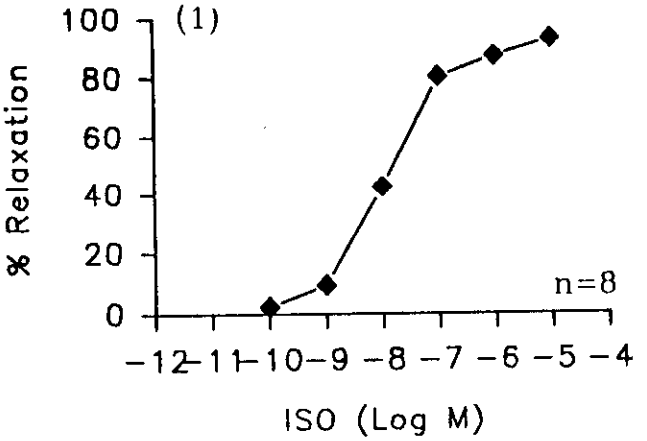
ایزوپروترنول، آدنوزین، آدنورین دی فسفات، آدنوزین تری فسفات و هیستامین موجب انبساط وابسته به غلظت حلقه شریان‌های ریوی رت شدند(اشکال ٥-١). حداکثر پاسخ انبساطی حلقه شریان‌های ریوی به ١٠ میکرومول ISO، ٩٣/٠٤±١/٢٥ درصد، به ١٠٠ میکرومول AD، ٧٢/٢٢±٣ درصد، به ١٠ میکرومول ADP و ATP، به ترتیب ٧٨/٣٩±٢/٦٨ درصد و ٨٠/٤٨±١/٩٣ درصد و به ١ میلی مول HIS، ٦٩/٥٢±٤/٠٢ درصد بودند. متوسط دوز مؤثر (EC_{50}) برای ISO، ٠/٠١ میکرومول، برای ADP، ٠/٥ میکرومول، برای ATP، ٠/٦ میکرومول، برای AD، ٧٠ میکرومول و برای HIS، ١٠٠ میکرومول بودند (شکل ٦). این نتایج نشان دادند که ED_{50} برای ISO، کمتر از ED_{50} برای سایر آگونیست‌های مورد آزمایش بود ولی از نظر آماری تنها با AD و HIS اختلاف معنی‌دار داشت (P<٠/٠٠١، شکل ٦). همچنین این نتایج نشان داد که ISO، (محرک گیرنده بتا آدرنرژیک) قوی‌ترین آگونیست در بین سایر آگونیست‌های آزمایش شده بود.

بحث

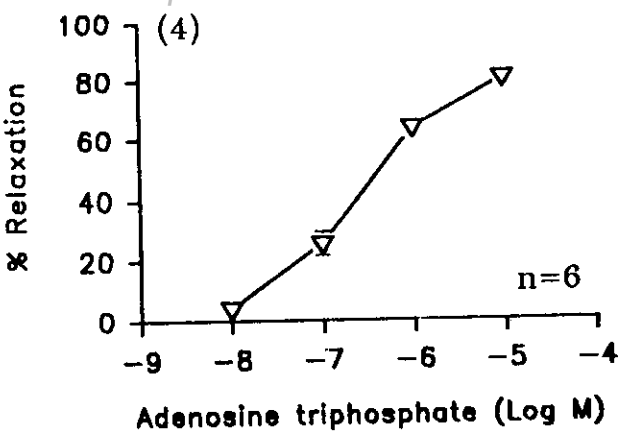
مکانیسم اصلی کنترل وازوموتور ریوی، انبساط عضله صاف عروق ریوی از طریق مسیر cAMP است. بررسی حاضر به منظور مقایسه قدرت و اثر بخشی داروهای منبسط کننده عروقی است که با اتصال به گیرنده و از طریق مسیر cAMP موجب انبساط عروق ریوی می‌شوند. در این بررسی آگونیست بتا آدرنرژیک (ISO) در ایجاد پاسخ انبساط عروقی مؤثرتر از دیگر آگونیست‌ها بود (P<٠/٠٠١، شکل ٦). همچنین از نظر قدرت اثر نیز قوی‌تر از AD و HIS، بود (P<٠/٠٠١، شکل ٦) ولی تفاوتی با ADP و ATP نداشت. هر یک از این مسیرهای اتصال آگونیست ـ گیرنده سبب تحریک پروتئین‌های G تحریکی (Gs) و فعال شدن آنزیم AC و تولید cAMP می‌شوند [١١]. اینکه آیا فعالیت آنزیم AC با هر یک از این مسیرها از طریق پروتئین‌های G تحریکی مشابه و یا از طریق پروتئین‌های G تحریکی متفاوت ایجاد می‌شود، هنوز مشخص نشده است. به دنبال

www.SID.ir

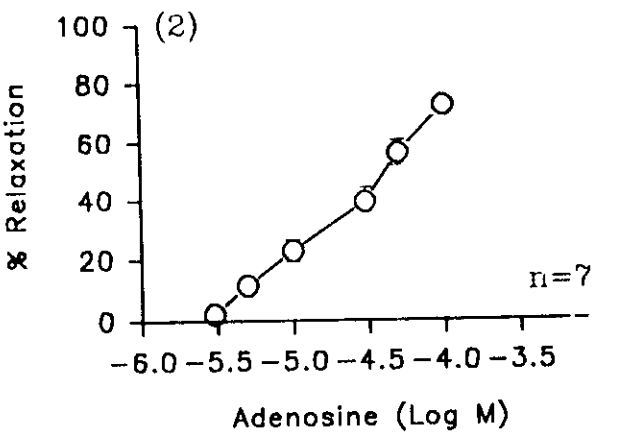
Archive of SID



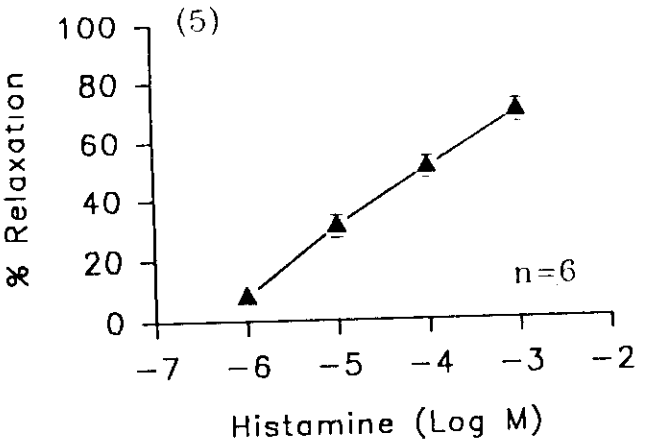
شکل ۱- درصد انبساط حلقه شریان‌های ریوی به ایزوپروترنول که با ۱۰۰نانومول فنیل‌افرین منقبض شده بودند. (n=۸ تعداد حلقه شریان‌ها).



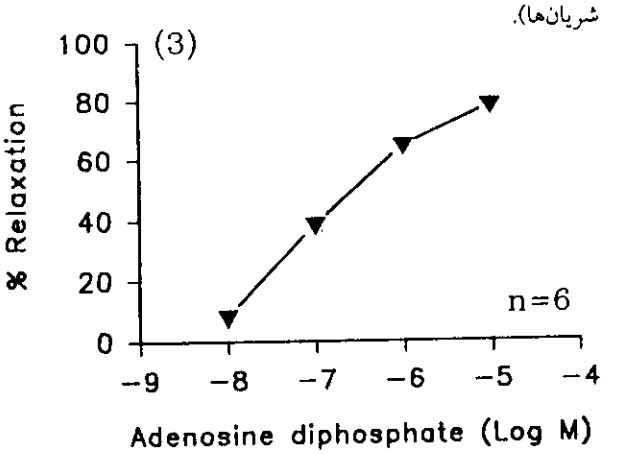
شکل ٤- درصد انبساط حلقه شریان‌های ریوی به آدنوزین تری فسفات که با ۱۰۰ نانومول فنیل‌افرین منقبض شده بودند. (n=٦ تعداد حلقه شریان‌ها).



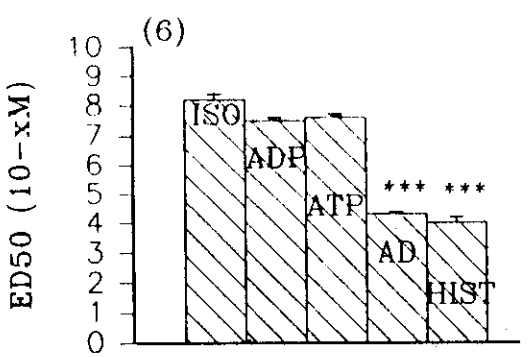
شکل ۲- درصد انبساط حلقه شریان‌های ریوی به آدنوزین که با ۱۰۰ نانومول فنیل‌افرین منقبض شده بودند. (n=۷ تعدادحلقه شریان‌ها).



شکل ٥- درصد انبساط حلقه شریان‌های ریوی به هیستامین که با ۱۰۰ نانومول فنیل‌افرین منقبض شده بودند.(n=٦ تعداد حلقه شریان‌ها).



شکل ۳- درصد انبساط حلقه شریان‌های ریوی به ادنوزین دی‌فسفات که با ۱۰۰ نانومول فنیل افرین منقبض شده بودند. (n=٦ تعداد حلقه شریان‌ها).



شکل ٦- مقایسه ED_{50} (نصف حداکثر پاسخ انبساط عروقی) آگونیست‌های ISO، AD، ADP، ATP و HIS.
P<۰/۰۰۱ *** اختلاف معنی‌دار بین ایزوپروترنول با سایر آگونیست‌های آزمایش شده را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت آنزیم AC، سرین کینازی به نام پروتئین کیناز وابسته cAMP (PKA) فعال می شود [۱۵]. PKA نیز موجب فسفوریلاسیون پروتئین(هایی) می‌شود که هنوز شناخته نشده‌اند و نهایتاً موجب انبساط عضله صاف عروق می‌شوند. مکانیسم‌های واقعی انبساط عضله صاف عروق که از مسیر cAMP صورت می‌گیرند، هنوز ناشناخته‌اند. با وجودیکه مسیرهای مورد آزمایش در این بررسی به یک مسیر نهایی مشترک در سطح Gs یا AC ختم می شوند ولی تفاوت‌هایی بین قدرت اثر و اثربخشی داروهایی که از این مسیرها موجب انبساط عضله صاف عروق ریوی می‌شوند وجود دارند. علت این اختلافات مشخص نیست ولی با وجود اینکه مواد انتقالی در عضله صاف عروق در ایجاد اثر انبساطی یکسان هستند ولی تفاوت‌هایی در تداخل عمل آگونیست ـ گیرنده نشان می‌دهند. شاید یکی از عللی که بتوان برای این تفاوت‌ها بیان کرد، تفاوت بین غلظت گیرنده‌های مختلف در غشاء سلول عضلانی در این مسیرها باشد. چون این بررسی بر روی قدرت اثر و اثربخشی داروها متمرکز شده بود، غلظت این گیرنده‌ها در شریان‌های ریوی مشخص نگردید. احتمال دیگری که می‌توان مطرح نمود، تفاوت میان مسیرهای مربوط به تداخل آگونیست ـ گیرنده یا مسیرهای تحریک Gs پس از پیوند آگونیست ـ گیرنده باشد.

بطور خلاصه فعالیت گیرنده بتا -۲ آدرنرژیک با ISO که موجب انبساط حلقه شریان‌های ریوی از طریق مسیر cAMP می‌شود، نسبت به سایر آگونیست‌های آزمایش شده با غلظت کمتری موجب پاسخ انبساط عروقی گردید. از طرف دیگر قدرت اثر ISO بیشتر از هر یک از آگونیست‌های AD، ADP، HIS و ATP بود ولی از نظر آماری تنها با ADP و ATP اختلاف معنی‌دار داشت. شاید یکی از علل این باشد که آگونیست‌هایی که گیرنده های خاص آنها در سطح غشاء سلول عضلانی عروق قرار دارند و از طریق مسیر cAMP موجب اثر انبساط عروقی می‌شوند، نسبت به آگونیست‌هایی که گیرنده‌های خاص آنها در سطح سلول‌های آندوتلیال عروق هستند، در ایجاد پاسخ انبساط عروقی فعال‌تر باشند. اگر چه در این بررسی فعالیت گیرنده بتا -۲ آدرنرژیک مؤثرتر از سایر آگونیست‌هایی بود که از طریق مسیر cAMP موجب انبساط حلقه شریان‌های ریوی شد ولی این مسیر خاص و نیز مسیر cAMP که موجب انبساط عروق ریوی می‌شوند. در بعضی از موارد مثل آسیب حاد ریوی [۱۰، ۹، ۷، ٦] و هایپوکسی [۱۸، ۱۷] آسیب می‌بینند. آسیب مکانیسم‌های درونی عضله صاف عروق ریوی نه تنها به تعدیل تون عضله صاف عروق ریوی به سمت انقباض کمک می‌نمایند بلکه ممکن است که تفاوت پاسخ به داروهای منبسط کننده عروق ریوی در آسیب حاد ریوی را بیان کنند [۱۸، ۱۷]. اینکه آیا عمل انبساط عروقی سایر مسیرهای cAMP در آسیب حاد ریوی آسیب می‌بینند و یا اینکه اختصاصاً فقط اثر انبساط عروقی بتا -۲ آدرنرژیک آسیب می‌بیند موضوعی است که به آزمایشات بیشتری نیاز می‌باشد. اگر در آسیب حاد ریوی عمل انبساط عروقی دیگر مسیرهای cAMP که موجب انبساط عروق می‌شوند حفظ گردند، این می‌تواند ارزش دارو درمانی در کنترل هایپرتانسیون ریوی در آسیب حاد ریوی را پیشنهاد دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

[1] Bolton, T. B., Mechanisms of action of transmiters and other substances on smooth muscle, ***Physiol. Rev.,*** 59 (1979) 606-718.

[2] Burmstock, G. and Kennedy, C., Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? ***Gen. Pharmacol. Rev.,*** 59 (1985) 433-440.

[3] Collis, M. G. and Brown, C. M., Adenosine relaxes the aorta by interacting with an A2 receptor and an intracellular site. ***Eur. J. Pharmacol.,*** 96 (1983) 61-69.

[4] Fishman, A. P., Pulmonary Circulation. In: A. P. Fishman (Ed.) ***Handbook of physiology, The Respiratory System,*** Vol. 1, Chapter3, Bethesda, MD: American Physiological Society, (1985) 93-165.

[5] Fullerton, D. A., Agrafojo, J. and mclntyre, R. C., Pulmonary vascular smooth muscle relaxation by cAMP-mediated pathways, ***J. Surg. Res.,*** 61 (1996) 444-448.

[6] Fullerton, D. A., mclntyre, R. C., Jr., Hahn, A. R., et al. Dysfunction of cGMP-mediated pulmonary vasorelaxation in endotoxin-induced acute lung injury, ***Am. J. Physiol.,*** 268 (1995) 1029.

[7] Fullerton, D. A., Mitchell, M. B., mclntyre, R. C., Jr., Campbell, D. N., and Grover, F. L., Lung transplantation using cardiopulmonary bypass exagerates pulmonary vasomotor dysfunction in the transplanted lung. ***J. Thorac. Cardiovas. Surg.,*** 109 (1995) 212.

[8] Fullerton, A. D., Hahn, A. R., Banerjee, A. and Harken, A. H., Pulmonary vascular smooth muscle relaxation by cGMP-versus cAMP-mediated mechanisms, ***J. Surg. Res.,*** 57 (1994) 259.

[9] Fullerton, D. A., Hahn, A. R., Koike, K., Banerjee, A. and Harken, A. H., Intracellular mechanisms of pulmonary vasomotor dysfuntion in acute lung injury caused by mesentric ischemia-reperfusion, ***Surgery,*** 114 (1993) 360.

[10] Fullerton, D, A, Mitchell, M. B., Mclntyre, R. C. Jr., et al. Cold ischemia and reperfusion each produce pulmonary vasomotor dysfunction in the transplanted lung, ***J. Thorac. Cardiovas. Surg.,*** 106 (1993) 1213.

[11] Gilman, A. G., G proteins and regulation of adenylyl cyclase, ***JAMA,*** 262 (1989) 1819.

[12] Hand., J. M., Larvavuso, R. B. and Will, J. A., Relation of isolated guinea-pig trachea, bronchi and pulmonary arteries produced by vasoactive intestinal peptid (VIP). ***Eur. J. Pharmacol.,*** 98 (1984) 279-284.

[13] Hardman, J. G., Cyclic nucleotides and smooth contraction: some conceptual and experimental consideration. In ***Smooth Muscle:*** an assessment of current knowledge. E. Bulbring, A. F., Brading, A. W. Jones, and T. Tomita (Eds.) Edward Arnold. (1981) 249-262.

[14] Hyman, A. L. and Kadowitz, P. J., Enhancement of alpha- and beta-adrenoceptor responses by elevations in vascular tone in pulmonary circulation. ***Am. J. Physiol.,*** 250 (1986) 1109-1116.

[15] Krebs, E. G., Role of the cyclic AMP-dependent protein kinase in signal transduction, ***JAMA,*** 262 (1989) 1815.

[16] Levie, R., Owen, D. A. A. and Trezchiakowski, J., Action of histamine on the heart and vasculature. In: ***Pharmacology of histamine receptor,*** C. R. Ganellin and M. E. Parson (Eds.), Wright PGS, London, (1982), 236.

[17] Mclntyre, R. C., Jr., Banerjee, A., Hahn, A. R., Agrafojo, J. and Fullerton, D. A., Selective inhibition of cAMP-mediated pulmonary vasodilation by acute hypoxia, ***Surgery,*** 174 (1995) 314.

[18] Mclntyre, R. C., Jr., Moore, F. A., Moore, E. E., Piedalue, F., Hoenel, J. S. and Fullerton, D. A., Inhaled nitric oxide variably improves oxygenation and pulmonary hypertention in patients with acute respiratory distress syndrome, ***J. Trauma,*** 39 (1995) 418.

[19] Ramagopal, M. V., Chitwood, R. W. and Mustafa, S. J., Evidence for an A_2 adenosine receptor in human coronary arteries. ***Eur. J. Pharmacol.,*** 151 (1988) 483-486.

www.SID.ir

Archive of SID

[20] Ross, E. M. Pharmacodynamics, mechanisms of drugs action and the relationship between drug concentration and effect. In: A. G. Hardman, A. G. Goodman, J. G. Hardman (Eds.), ***Goodman and Gilman's The Pharmacologics Basis of Therapeutics,*** 9th edition, (1996) 29-41.

[21] Scheid, C. R., Honeyaman, T. W. and Fay, F. S., Mechanism of beta-adrenergic relaxation of smooth muscle. ***Nature,*** 277 (1979) 32-36.

[22] Seamon, K. B. and Daly, J. W., Forskolin: its biological and chemical properties. ***Adv. Cyclic Nucl. Res.,*** 20 (1986) 1-150.

[23] Tucker, A., Weir, E. K., Reeves, J. T. and Grover, R. F., Histamine H1- and H2-receptors in pulmonary and systemic vasculature of the dog. ***Am. J. Physiol.,*** 229 (1975) 1008-1013.

www.SID.ir