

اثرات فنیل‌افرین، کلسیم، استیل‌کولین و دیازوکساید بر آئورت مجزای موش‌های صحرایی پری‌اکلامپتیک

چکیده:

مقدمه و هدف: پری‌اکلامپسی یکی از بیماری‌های شایع دوران حاملگی است که خطر مرگ و میر برای جنین و مادر را در پی دارد. تغییر در پاسخ‌دهی عروق به عوامل منقبض‌کننده و متسع‌کننده از جمله مواردی هستند که در بیماری‌زایی آن دخیل دانسته شده‌اند. هدف از مطالعه حاضر بررسی پاسخ آئورت موش‌های صحرایی پری‌اکلامپتیک به چند منقبض‌کننده و متسع‌کننده عروقی بود.

مواد و روش‌ها: این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸۷ در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد. ۳۰ سر موش صحرایی حامله به صورت تصادفی در دو گروه ۱۵ تقسیم شدند. گروه مورد، ان - نیتروال - آرژنین متیل‌استر را از روز یازدهم حاملگی به صورت خوراکی و از طریق آب آشامیدنی با دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم دریافت کردند. گروه شاهد دسترسی آزاد به آب آشامیدنی داشتند. در روز ۲۲ حاملگی، پس از بیهوشی و قربانی کردن حیوان، آئورت سینه‌ای با دقت جدا و به حلقه‌های ۳-۲ میلی‌متری تقسیم و به حمام بافت منتقل گردید. پس از آن آئورت جدا شده در مجاورت غلظت‌های تجمعی از فنیل‌افرین و کلسیم به صورت جداگانه قرار گرفت و پاسخ‌های انقباضی با ترانس‌دیوسر ایزومتریک ثبت گردید. جهت بررسی پاسخ آئورت به متسع‌کننده‌ها، یک قطعه از آئورت منقبض شده با فنیل‌افرین تحت تأثیر غلظت‌های تجمعی از استیل‌کولین و قطعه دیگر که با پتاسیم منقبض شده بود، در مجاورت غلظت‌های تجمعی دیازوکساید قرار گرفت و پاسخ‌های اتساعی حاصله ثبت شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری تی غیرجفتی تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: قدرت فنیل‌افرین در انقباض آئورت موش‌های صحرایی پری‌اکلامپتیک بیش از گروه شاهد بود ($p=0/01$)، ولی از لحاظ حداکثر کشش حاصله، بین دو گروه تفاوتی دیده نشد. قدرت و حداکثر اثر استیل‌کولین در اتساع آئورت گروه پری‌اکلامپتیک کمتر از گروه شاهد بود (ارزش پی به ترتیب برابر $p=0/03$ و $p=0/004$). پاسخ انقباضی آئورت به کلسیم و اتساعی آن به دیازوکساید در بین دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت.

نتیجه‌گیری: پری‌اکلامپسی تجربی موجب افزایش حساسیت آئورت به آگونیست‌های گیرنده‌های آلفا-آدرنرژیک و کاهش اتساع وابسته به آندوتلیوم می‌شود. به نظر می‌آید در این مدل در عملکرد کانال‌های کلسیم وابسته ولتاژ و کانال‌های پتاسیم وابسته به آدنوزین تری‌فسفات تغییری روی نمی‌دهد.

واژه‌های کلیدی: پری‌اکلامپسی، ان - نیتروال - آرژنین متیل‌استر، دیازوکساید، آئورت سینه‌ای، موش صحرایی.

دکتر محمدشریف طالبیان‌پور*

دکتر حسین میرخانی**

* دانشجوی دکترای فارماکولوژی، دانشگاه علوم

پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی،

گروه فارماکولوژی

** دکترای فارماکولوژی، دانشیار دانشگاه علوم

پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات شیمی دارویی،

دانشکده پزشکی، بخش فارماکولوژی

تاریخ وصول: ۱۳۸۸/۳/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۵/۲۰

مؤلف مسئول: دکتر حسین میرخانی

پست الکترونیک: mirkhanh@sums.ac.ir

مقدمه

فنیل‌افرین از طریق تحریک گیرنده‌های آلفا ۱

منجر به افزایش کلسیم داخل عروقی می‌شود. کلسیم با گذرازان کانال‌های کلسیمی غشایی وابسته به ولتاژ همین عمل را انجام می‌دهد. دیازوکساید گشاینده کانال‌های پتاسیمی وابسته به آدنوزین تری فسفات^(۲) است و از این طریق موجب اتساع عروق می‌شود^(۸). استیل‌کولین با تحریک گیرنده‌های M3 در سلول‌های آندوتلیال عروق موجب آزادی نیتریک اکسید و اتساع عضلات صاف عروق می‌گردد^(۹).

برای بررسی نقش هر یک از عوامل پیش گفته در پاسخ‌دهی عروق موش‌های صحرایی پری‌اکلامپتیک، در مطالعه حاضر پاسخ‌دهی آئورت به فنیل‌افرین، کلسیم، دیازوکساید و استیل‌کولین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸۷ در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد. ۳۰ سر موش صحرایی به صورت تصادفی به دو گروه ۱۵ تایی مورد و شاهد تقسیم شدند. گروه مورد، ان - نیترو آل - آرژنین متیل‌استر^(۳) را از روز یازدهم حاملگی به صورت خوراکی و از طریق آب آشامیدنی با دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم

حاملگی نرمال همراه با تغییرات زیادی مانند؛ کاهش فشارخون و کاهش مقاومت عروق محیطی و هم‌چنین کاهش واکنش‌پذیری عروق به منقبض کننده‌های عروقی و افزایش در سنتز نیتریک اکسید است^(۱). پری‌اکلامپسی یکی از بیماری‌های شایع (۶-۸ درصد حاملگی‌های اول) در خانم‌های حامله بعد از هفته ۲۰ حاملگی و علت اصلی کاهش رشد جنین، تولد زودرس و افزایش مرگ جنین و مادر در زمان زایمان است^(۲-۴). این بیماری همراه با انقباض عروق محیطی، آسیب آندوتلیال سلول‌های عروق، افزایش فشارخون و پروتئینوری است^(۵). در این بیماری کاهش وازودیلاتورهای نیتریک اکسید، پروستاگلندین و فاکتور هیپرپلازیه کننده وابسته به آندوتلیوم^(۱) و افزایش منقبض کننده‌های اندوتلین، ترومبوکسان A_۲ و آنژیوتانسین II مشاهده شده است. این منقبض کننده‌های عروقی، کلسیم داخل سلولی را افزایش می‌دهند. منبع این افزایش کلسیم ممکن است مربوط به ورود کلسیم خارج سلولی از طریق کانال‌های کلسیمی و یا آزادی بیشتر کلسیم از ذخایر کلسیم داخل سلولی باشد^(۶). فاکتور هیپرپلازیه کننده وابسته به آندوتلیوم از طریق گشایش کانال‌های پتاسیم باعث اتساع عروق می‌شود. ادعا شده است که در حاملگی طبیعی فاکتور هیپرپلازیه کننده وابسته به آندوتلیوم نقش مهم‌تری در اتساع عروق دارد و در بیماری پری‌اکلامپسی این نقش کاهش می‌یابد^(۷).

1-Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor(EDHF)

2-ATP

3-N(G)-Nitro-L- Arginine Methyl Ester (L-NAME)

دریافت کردند. گروه شاهد دسترسی آزاد به آب آشامیدنی داشتند.

پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید و در کمیته اخلاق دانشگاه به تصویب رسید.

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل؛ استیل‌کولین، فنیل‌افرین، ان - نیترو ال - آرژینین متیل استر و دیازوکساید بودند که همگی از شرکت سیگما تهیه گردیدند. موش‌های سفید صحرایی مورد استفاده از نژاد اسپراگ - دالی بودند و وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم داشتند و در شرایط یکسان از لحاظ آب، غذا، نور و دما نگهداری می‌شدند. حیوانات قبل از حاملگی و در طی هشت روز اول حاملگی در مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه نگهداری شده و سپس جهت عادت کردن با شرایط جدید و جلوگیری از وارد شدن استرس به لانه حیوانات بخش فارماکولوژی دانشکده پزشکی منتقل شدند. تغذیه حیوانات به وسیله مواد غذایی مخصوص حیوانات آزمایشگاهی که حاوی پروتئین، نشاسته، سلولز، چربی و ویتامین بود، انجام گرفت.

جهت حامله شدن موش‌های صحرایی، یک عدد موش نر و یک عدد موش ماده را در ساعت ۸ شب در کنار هم در یک قفس قرار داده تا جفت‌گیری انجام شود. اساس شروع حاملگی، مشاهده پلاک واژینال بود به گونه‌ای که روزی که پلاک واژینال دیده شد، به عنوان روز اول حاملگی در نظر گرفته شد.

در این مطالعه برای ایجاد مدل تجربی پری اکلامپسی، از ان - نیترو ال - آرژینین متیل استر استفاده شد که در بررسی‌های متعدد نشان داده شده که اثراتی مشابه با پری اکلامپسی در انسان را در حیوانات آزمایشگاهی ایجاد می‌کند (۱۱ و ۱۰، ۲). ان - نیترو ال - آرژینین متیل استر در آب آشامیدنی حل گردید و با دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از روز ۱۱ حاملگی به حیوانات تجویز شد. برای هر حیوان مقدار ان - نیترو ال - آرژینین متیل استر در ۲۴ ساعت محاسبه و در آب آشامیدنی آنها حل می‌شد. مقدار آب آشامیدنی به گونه‌ای در نظر گرفته می‌شد که حیوان در پایان ۲۴ ساعت تمام آب را مصرف کرده باشد (میانگین ۳۰ - ۲۵ سی‌سی در شبانه روز). جهت اطمینان از پری اکلامپتیک شدن حیوانات اندازه‌گیری فشارخون با روش غیرتهاجمی و با استفاده از کاف دمی^(۱) در روزهای ۱۰، ۱۳، ۱۵، ۱۸ و ۲۱ همچنین اندازه‌گیری پروتئین ادراری ۲۴ ساعته در روزهای ۱۰، ۱۵ و ۲۱ به روش برادفورد^(۲) انجام گردید (۱۲).

در روز ۲۲، حیوان در یک دسیکاتور حاوی پنبه آغشته به اتر در زیر هود روشن قرار داده شد و بعد از بیهوش شدن، کاروتید آن قطع و سینه حیوان باز شد و با احتیاط کامل آئورت سینه‌ای جدا و به ظرف محتوی محلول مغذی که از قبل اکسیژن‌دهی شده بود منتقل شد. حلقه‌های ۳-۲ میلی‌متری از

1-Tail-Cuff Method
2-Bradford Method

آئورت، جدا شده و در داخل محلول کربس (که به طور مداوم به داخل آن گاز کربوژن حاوی ۵ درصد دی اکسی کربن و ۹۵ درصد اکسیژن دمیده می شد) قرار داده شد. محلول حاوی کلرید سدیم (۱۱۸ میلی مولار)، کلرید پتاسیم (۴/۸ میلی مولار)، کلرید کلسیم (۲/۵ میلی مولار)، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (۱/۲ میلی مولار)، سولفات منیزیم (۱/۲ میلی مولار)، بی کربنات سدیم (۲۵ میلی مولار) و گلوکز (۱۱ میلی مولار) بود. دمای محلول ۳۷ درجه سانتی گراد و pH آن ۷/۴ بود.

حلقه های آئورت در بین گیره های مثلثی شکل از جنس فولاد زنگ نزن قرار گرفته و به داخل حمام بافت حاوی محلول مغذی که هر ۱۵ دقیقه تعویض می شد، قرار گرفت و به ترانس دیوسر ایزومتریک برای ثبت انقباضات متصل گردید. به منظور پایداری بافت، قطعات متصل شده به ترانس دیوسر ایزومتریک به مدت یک ساعت تحت کشش ثابت نیم گرم قرار گرفت. در مواقعی که نیاز بود رگ فاقد آندوتلیوم باشد، آندوتلیوم رگ با گردش سوزن نمره ۱۸ در لومن تخریب می گردید. در غیر این صورت نهایت دقت در کار با بافت جهت جلوگیری از تخریب آندوتلیوم صورت می گرفت.

جهت بررسی اثر فنیل افرین بر روی آئورت؛ به منظور اطمینان از پایداری بافت، قطعات آئورت بدون آندوتلیوم تحت تأثیر غلظت 10^{-6} مولار از فنیل افرین قرار گرفت. در صورتی که تفاوت پاسخ بافت در دو دفعه متوالی کمتر از ۲۰ درصد بود، بافت پایدار در

نظر گرفته شد و بقیه آزمایش ها بر روی آن انجام گردید. پس از این مرحله، فنیل افرین به صورت غلظت های تجمعی^(۱) به حمام بافت اضافه گردید و انقباضات با نرم افزار رایانه ای HSE-ACAD ثبت و غلظت مؤثر ۵۰ درصد^(۲) (غلظتی از دارو که ۵۰ درصد حداکثر پاسخ را ایجاد می کند) و حداکثر کشش حاصله در دو گروه مورد مطالعه محاسبه و مقایسه گردید.

جهت بررسی پاسخ دهی آئورت به استیل کولین؛ غلظت هایی از فنیل افرین که باعث ایجاد ۷۰ درصد حداکثر انقباض در آئورت آندوتلیوم دار دو گروه می شد، انتخاب گردید. این غلظت برای گروه تیمار شده با ان - نیترو ال - آرژینین متیل استر^۳ 10^{-7} مولار و برای گروه حامله سالم $10^{-7} \times 3/3$ مولار بود. پس از افزودن این غلظت ها به حمام بافت و حصول حداکثر انقباض ممکن، غلظت های تجمعی از استیل کولین به حمام بافت افزوده و اثر شل کنندگی آن ثبت گردید و غلظت مهاری ۵۰ درصد^(۳) (غلظتی از دارو که انقباض را به نصف مقدار اولیه کاهش می دهد) و حداکثر اتساع ممکن در دو گروه محاسبه و مقایسه شد.

جهت بررسی پاسخ دهی آئورت به کلسیم؛ حلقه آئورت بدون آندوتلیوم برای یک ساعت در مجاورت با محلول دارای پتاسیم با مقدار بالا (۱۰۰ میلی مولار) و فاقد کلسیم، قرار گرفت. این محلول

1-Cumulative concentration

2-Effective Concentration 50 (EC50)

3-Inhibitory Concentration 50 (IC50)

یافته‌ها

میزان فشارخون و پروتئین ادرار در گروه‌های مورد مطالعه قبل از تجویز ان - نیتروال - آرژینین متیل‌استر (در روز ۱۰ حاملگی) تفاوت قابل ملاحظه‌ای نداشت. مقایسه فشارخون در روزهای ۱۳، ۱۵، ۱۸ و ۲۱ (جدول ۱) و همچنین پروتئین ادرار در روزهای ۱۵ و ۲۰ در گروه تیمار شده با ان - نیتروال - آرژینین متیل‌استر در مقایسه با گروه کنترل سالم تفاوت بارزی داشت (جدول ۲). (به ترتیب $p < 0/001$ و $p < 0/05$).

نتایج حاصل از اثر غلظت‌های تجمعی فنیل‌افرین به صورت تجمعی نشان داد که پاسخ‌های انقباضی عروق به فنیل‌افرین در نبود آندوتلیوم در گروه دریافت کننده نیترو آرژینین متیل‌استر (پری اکلامپتیک) به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل سالم بود، به طوری که غلظت مؤثر ۵۰ درصد در دو گروه حامله سالم و همچنین مبتلا به پری اکلامپسی به ترتیب $10^{-8} \times (1/17 \pm) 5/49$ و $10^{-8} \times (1/28 \pm) 2/45$ گردید که از لحاظ آماری تفاوتی معنی‌دار می‌باشد ($p = 0/01$)، ولی در حداکثر پاسخ انقباضی، تفاوت بارزی مشاهده نگردید (نمودار ۱).

یافته‌های حاصل از اثر غلظت‌های تجمعی استیل‌کولین به دنبال انقباض با فنیل‌افرین نشان داد که تفاوت معنی‌داری هم در پاسخ شل‌کنندگی استیل‌کولین و هم در حداکثر پاسخ حاصله وجود

با حفظ مولاریته محلول اصلی و جایگزینی کلرید پتاسیم به جای کلرید سدیم، تهیه گردید. پس از گذشت یک ساعت، برای اطمینان از پایداری بافت، قطعات آئورت بدون آندوتلیوم در مجاورت کلسیم با غلظت 10^{-2} مولار کلرید کلسیم قرار گرفت. در صورتی که تفاوت پاسخ بافت در دو دفعه متوالی کمتر از ۲۰ درصد بود، بافت پایدار در نظر گرفته شد و بقیه آزمایش‌ها بر روی آن انجام گردید. پس از آن، پاسخ بافت به غلظت‌های تجمعی کلسیم را ثبت نموده و غلظت مؤثر ۵۰ درصد کلسیم و حداکثر پاسخ حاصل از آن در بین گروه‌های مختلف محاسبه و مقایسه گردید.

جهت بررسی اثر دیازوکساید بر روی آئورت؛ برای اطمینان از پایداری بافت، قطعات آئورت بدون آندوتلیوم در مجاورت پتاسیم با غلظت ۳۰ میلی‌مولار قرار گرفت. در صورتی که تفاوت پاسخ بافت در دو دفعه متوالی کمتر از ۲۰ درصد بود، بافت پایدار در نظر گرفته شد و بقیه آزمایش‌ها بر روی آن انجام گردید. پس از حصول حداکثر انقباض ممکن، غلظت‌های تجمعی از دیازوکساید که یک داروی گشاینده کانال‌های پتاسیم می‌باشد به محیط بافت افزوده شد و در نهایت غلظت مهار ۵۰ درصد این دارو و حداکثر اتساع حاصل از آن در دو گروه مورد آزمایش محاسبه و مقایسه گردید.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از

نرم‌افزار SPSS^(۱) و آزمون آماری تی غیر زوجی^(۲)

تجزیه و تحلیل گردید.

1-Statistical Package for Social Sciences
2-Unpaired T-Test

بحث و نتیجه‌گیری

پری‌اکلامپسی یکی از بیماری‌های شایع (۶۸ درصد حاملگی‌های اول) در طی دوران حاملگی است و خطر مرگ برای مادر و جنین را در پی دارد (۲). پری‌اکلامپسی یک سندرم سیستمیک شامل؛ افزایش فشارخون، پروتئینوری و علایم بالینی دیگر است (۵). در حیوان آزمایشگاهی بارداری، کاهش سنتز نیتریک اکسید می‌تواند تغییرات پاتولوژیکی مانند پری‌اکلامپسی انسانی ایجاد کند (۶). هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر پاره‌ای از منقبض‌کننده‌ها و متسع‌کننده‌های عروقی بر آئورت موش‌های صحرایی پری‌اکلامپتیک در مقایسه با موش‌های حامله سالم بود.

دارد، به طوری که غلظت مهاری ۵۰ درصد در گروه کنترل سالم $10^{-7} \times (1/44 \pm)$ و در گروه پری‌اکلامپتیک $10^{-6} \times (1/65 \pm)$ گردید ($p=0/03$) و همچنین حداکثر اثرات شل‌کنندگی حاصل از استیل‌کولین در گروه حامله سالم $2/79 \pm 86/5$ درصد و در گروه پری‌اکلامپتیک $5/01 \pm 67/5$ درصد بود که تفاوتی معنی‌دار می‌باشد ($p=0/04$) (نمودار ۲). انقباض حاصل از کلسیم، نه از نظر میزان غلظت مؤثر ۵۰ درصد و نه از نظر حداکثر پاسخ در بین دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت (نمودار ۳).

غلظت مهاری ۵۰ درصد دیازوکساید در شل کردن آئورت منقبض شده به وسیله پتاسیم در بین دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت. حداکثر پاسخ به دیازوکساید اگر چه در گروه پری‌اکلامپتیک کمتر بود (۹۷ درصد در مقابل ۸۷ درصد)، اما از نظر آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۴).

جدول ۱: مقایسه میانگین و انحراف معیار فشارخون سیستولیک (میلی‌متر جیوه) در گروه کنترل حامله سالم و تیمار شده با ان - نیترو آل -

آرژنین متیل‌استر (پری‌اکلامپتیک). مقادیر نمایانگر میانگین $\pm$ خطای معیار ۱۵ آزمایش است.

گروه	روز ۱۰	روز ۱۳	روز ۱۵	روز ۱۸	روز ۲۱
سالم	$121 \pm 1/63$	116 ± 2	$117 \pm 1/22$	$117 \pm 2/3$	$103 \pm 2/5$
پری‌اکلامپتیک	$120 \pm 1/8$	$122 \pm 2/8$	$135 \pm 2/6$	$144 \pm 2/9$	$116 \pm 2/6$
سطح معنی‌داری	NS*	<0/001	<0/001	<0/001	<0/001

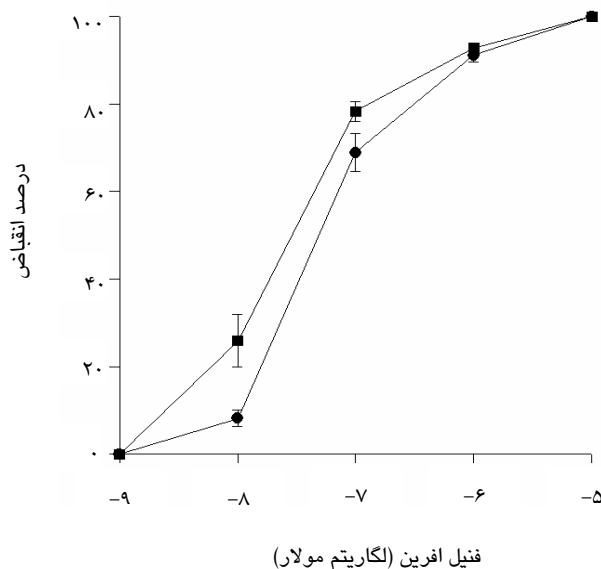
*NS: Not Significant

جدول ۲: مقایسه میانگین و انحراف معیار پروتئین ادراری ۲۴ ساعته (میلی گرم) در گروه کنترل حامله سالم و تیمار شده با ان - نیترو آل -

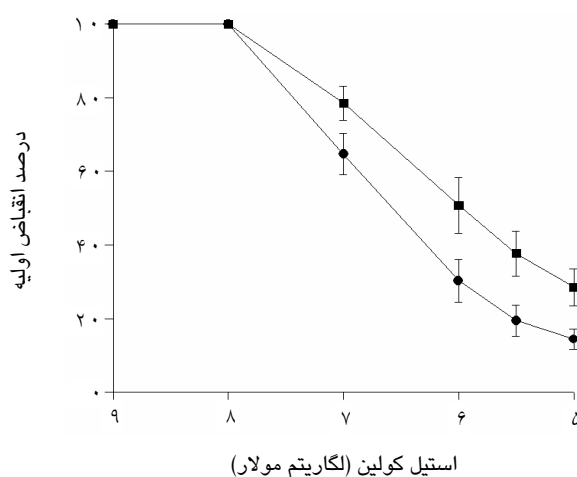
آرژنین متیل‌استر (پری‌اکلامپتیک). مقادیر نمایانگر میانگین $\pm$ خطای معیار ۱۵ آزمایش است.

گروه	روز ۱۰	روز ۱۵	روز ۲۰
سالم	$2/85 \pm 0/18$	$3/44 \pm 0/37$	$3/56 \pm 0/31$
پری‌اکلامپتیک	$3/17 \pm 0/22$	$5/07 \pm 0/37$	$5/05 \pm 0/56$
سطح معنی‌داری	NS*	<0/05	<0/05

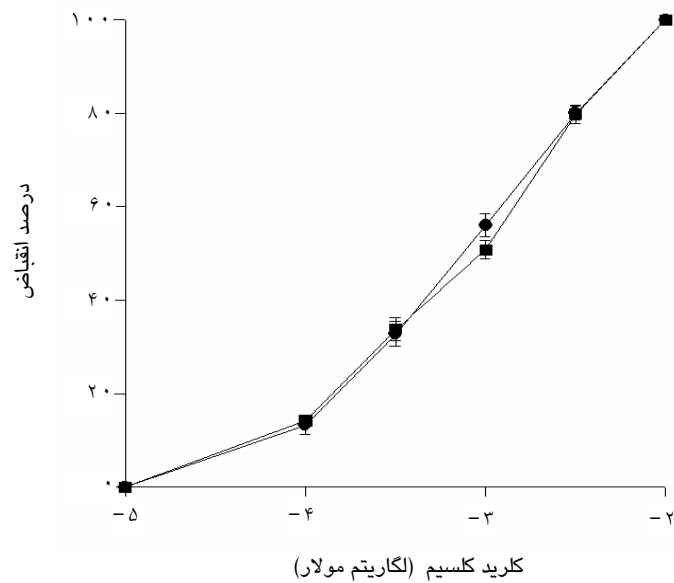
*NS: Not Significant



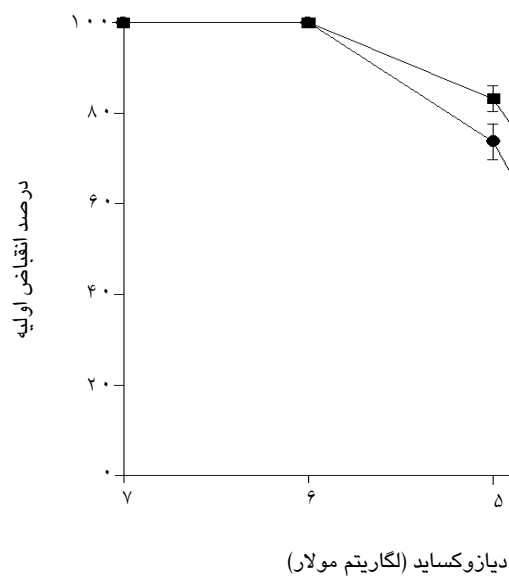
نمودار ۱: پاسخ‌های انقباضی آنورت سینه‌ای بدون آندوتلیوم به غلظت‌های تجمعی فنیل‌افرین در گروه حامله سالم (●) و تیمار شده با نیترو آرژینین متیل استر (■ پری‌اکلامپتیک). هر نقطه مبین میانگین $\pm$ خطای استاندارد برای ۱۰ موش سفید صحرایی در هر گروه است.



نمودار ۲: پاسخ‌های اتساعی آنورت سینه‌ای منقبض شده به وسیله فنیل‌افرین به غلظت‌های تجمعی استیل‌کولین در گروه حامله سالم (●) و تیمار شده با نیترو آرژینین متیل استر (■ پری‌اکلامپتیک). هر نقطه مبین میانگین $\pm$ خطای استاندارد برای ۱۰ موش در هر گروه است.



نمودار ۳: پاسخ‌های انقباضی آئورت سینه‌ای بدون آندوتلیوم به غلظت‌های تجمعی کلسیم در گروه حامله سالم (●) و تیمار شده با نیترو آرژینین متیل استر (■ پری اکلامپتیک). هر نقطه مبین میانگین $\pm$ خطای استاندارد برای ۶ موش در هر گروه است



نمودار ۴: پاسخ‌های اتساعی آئورت سینه‌ای منقبض شده به وسیله پتاسیم به غلظت‌های تجمعی دیازوکساید در گروه حامله سالم (●) و تیمار شده با نیترو آرژینین متیل استر (■ پری اکلامپتیک). هر نقطه مبین میانگین $\pm$ خطای استاندارد برای ۶ موش در هر گروه است

کلسیم وابسته به رسپتور و هم کانال‌های کلسیم وابسته به ولتاژ دخیل هستند (۱۸ و ۱۹). تشدید پاسخ‌دهی عروق حاصل از حیوانات پری‌اکلامپتیک به فنیل‌افرین ممکن است ناشی از تغییر در حساسیت رسپتورها و یا تغییرات بعد از تحریک رسپتور باشد. با توجه به این که حداکثر کشش در بین دو گروه تفاوتی را نشان نداد و پاسخ دو گروه به کلسیم نیز تفاوت بارزی نداشت، به نظر می‌آید نه حساسیت و میزان رشته‌های اکترین و میوزین و نه توانایی ورود کلسیم از کانال‌های کلسیم وابسته به ولتاژ در تفاوت پاسخ مشاهده شده به فنیل‌افرین در بین دو گروه نقش داشته باشد. علت تفاوت مشاهده شده در بین دو گروه نیاز به تحقیق بیشتر بر روی مکانیسم‌های احتمالی دیگری نظیر افزایش تمایل گیرنده‌های آلفا به فنیل‌افرین، افزایش ذخایر کلسیم داخل سلولی و یا افزایش ورود کلسیم از طریق کانال‌های کلسیم حساس به گیرنده در پری اکلامپسی دارد.

در مطالعه حاضر استیل‌کولین باعث شل شدن انقباضات آئورت ناشی از فنیل‌افرین در هر دو گروه گردید، اما هم قدرت آن و هم حداکثر اثر شل‌کنندگی آن بر روی آئورت حیوانات پری اکلامپتیک به شکل معنی دار کمتر از اثر آن بر حیوانات طبیعی بود. این نتایج با مطالعه مارتینز-اورگادو و همکاران^(۳) تقریباً همخوانی دارد (۲۰). برای قضاوت صحیح در مورد اثر استیل‌کولین، اثر این ماده بر روی انقباضات

در مطالعه حاضر، از تجویز خوراکی ان - نیترو ال - آرژنین متیل‌استر استفاده شد که سبب افزایش فشارخون و ایجاد پروتئینوری به طور قابل ملاحظه‌ای گردید. اثر ان - نیترو ال - آرژنین متیل‌استر در افزایش فشارخون و پروتئینوری را به دلیل مهار آنزیم نیتریک اکسید سنتاز^(۱) می‌دانند (۱۳). با این که استفاده از ان - نیترو ال - آرژنین متیل‌استر یک روش پذیرفته آزمایشگاهی برای ایجاد مدل تجربی پری اکلامپسی است، اما این مدل نقاط ضعفی مانند کاهش آندوتلین ۱ در بعضی موارد و عدم ایجاد استرس اکسیداتیو در جفت را داراست، در حالی که در نوع انسانی فقط افزایش آندوتلین ۱ و افزایش استرس اکسیداتیو در جفت دیده می‌شود (۱۴ و ۱۵).

در مطالعه حاضر فنیل‌افرین باعث انقباض آئورت شد. در مطالعه‌ای که به وسیله خلیل و همکاران^(۲) (۱۹۹۸) انجام شد، به دنبال غلظت‌های تجمعی از فنیل‌افرین نه در قدرت و نه در حداکثر کشش تفاوت معنی‌داری دیده نشده است که احتمالاً تفاوت مشاهده شده در مطالعه حاضر با مورد ذکر شده به علت تفاوت در دوز و زمان تجویز ان - نیترو ال - آرژنین متیل‌استر است (۱۰).

فنیل‌افرین به عنوان یک آلفا آگونیست با تحریک گیرنده‌های آلفا یک هم سبب افزایش ورود کلسیم از خارج سلول و هم افزایش آزادسازی کلسیم از ذخایر داخل سلولی می‌شود (۱۶ و ۱۷). در راستای افزایش ورود کلسیم به داخل سلول، هم کانال‌های

1-Nitric Oxide Synthase (NOS)

2-Khalil et al

3-Martinez-Orgado

یکسان حاصل از فنیل‌افرین اندازه‌گیری شد. برای این منظور غلظت‌هایی از فنیل‌افرین در نظر گرفته شد که باعث ۸۰-۷۰ درصد انقباض گردید که این غلظت برای گروه حامله سالم^{۷-۱۰} و برای گروه پری‌اکلامپتیک^{۷-۱۰×۳/۳} بود.

استیل‌کولین با تحریک گیرنده‌های موسکارینی^(۱) و افزایش ورود کلسیم به سلول‌های اندوتلیال عروق سبب آزادسازی نیتریک اکسید می‌شود^(۹). ان - نیترو ال - آرژنین موجب مهار سنتز نیتریک اکسید و اثر استیل‌کولین می‌شود. با توجه به کاهش اثر استیل‌کولین بر روی آئورت حیوانات گروه مورد، می‌توان نتیجه گرفت که دوز به کار رفته از ان - نیترو ال - آرژنین متیل استر (۵۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم) به طور مؤثر باعث مهار سنتز نیتریک اکسید شده و همین می‌تواند توجیه کننده افزایش فشارخون و پروتئینوری در حیوانات حامله باشد.

با توجه به فاصله زمانی طولانی از بیهوش کردن حیوان، کشتن حیوان و جداسازی آئورت تا انجام آزمایش‌های مربوطه بر روی آن و عدم حضور ان - نیترو ال - آرژنین متیل استر در طی این مدت، می‌توان نتیجه گرفت که اثر این مهارگر حداقل پس از حدود ۲-۳ ساعت از فقدان آن نیز بر روی بافت باقی است.

در مطالعه اخیر به بررسی اثر ورود یون‌های کلسیم از طریق کانال‌های کلسیم حساس به ولتاژ نیز پرداخته شد. برای باز کردن این کانال‌ها، آئورت با استفاده از غلظت بالای پتاسیم (۱۰۰ میلی‌مولار)

دپلاریزه شد. به دنبال این دپلاریزاسیون کانال‌های کلسیم وابسته به ولتاژ گشوده می‌شوند^(۲۱)، اما چون در محلول مغذی بافت، کلسیم حذف شده بود، انقباض صورت نگرفت. پس از آن با افزودن تدریجی کلسیم، انقباضات حاصل از افزایش تدریجی ورود کلسیم از طریق کانال‌های کلسیم وابسته به ولتاژ بررسی گردید.

پس از افزودن غلظت‌های تجمعی از کلسیم به محیط بافت، تفاوتی در غلظت مؤثر ۵۰ درصد و حداکثر پاسخ مشاهده نشد. به عبارت دیگر به نظر نمی‌آید عوارض حاصل از پری اکلامپسی، به دلیل تفاوت ورود کلسیم از طریق کانال‌های کلسیم حساس به ولتاژ باشد.

در مطالعه حاضر به بررسی گشایش کانال‌های پتاسیم حساس به آدنوزین تری‌فسفات در پاسخ‌دهی به دیازوکساید پرداخته شد. ظرفیت وازودیلاتوری آندوتلیوم عروق علاوه بر اثر نیتریک اکسید تحت تأثیر فاکتور هیپرپلاریزه کننده وابسته به آندوتلیوم نیز است و به نظر می‌رسد که فاکتور هیپرپلاریزه کننده وابسته به آندوتلیوم از طریق گشایش کانال‌های پتاسیم منجر به هیپرپلاریزاسیون سلول‌های عضلات صاف و اتساع عروق می‌شود^(۲۲). از آنجا که فاکتور هیپرپلاریزه کننده وابسته به آندوتلیوم در پری اکلامپسی نسبت به حاملگی طبیعی نقش کمتری در اتساع عروق دارد^(۷) در تحقیق حاضر

عوارض عروقی - کلیوی مترتب بر پری اکلامپسی تجربی نقشی داشته باشند.

در پایان پیشنهاد می‌گردد اولاً وضعیت گیرنده‌های آلفا و تغییر حساسیت آن به آگونیست‌های گیرنده در مدل تجربی پری اکلامپسی بررسی گردد. همچنین اثر منقبض کننده‌های عروقی درون‌زاد مانند؛ آنژیوتانسین II، اندوتلین و سروتونین و نیز متسع کننده‌هایی مانند فاکتور هیپرپلازیه کننده وابسته به آندوتلیوم و برادی کینین نیز در این مدل بررسی گردد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از زحمات و همکاری راضیه قلی پور و اعظم السادات باقری قدردانی کنند. بودجه این طرح بر اساس قرارداد شماره ۴۰۱۱-۸۷ از محل اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تأمین شده است.

باز شدن کانال‌های پتاسیم در پاسخ به دیازوکساید که یک باز کننده کانال پتاسیم حساس به آدنوزین تری فسفات است، بررسی شد.

برای ایجاد انقباض آئورت از پتاسیم با غلظت ۳۰ میلی مولار استفاده شد. این غلظت‌ها موجب دیپلاریزاسیون غشاء و گشوده شدن کانال‌های کلسیم حساس به ولتاژ می‌شود. دیازوکساید با گشودن کانال‌های پتاسیمی حساس به آدنوزین تری فسفات منجر به رپلاریزاسیون غشاء و شل شدن انقباض شد. قدرت دیازوکساید در شل کردن انقباض و حد اکثر اتساع حاصل از آن در بین دو گروه تفاوت بارزی نداشت. با این حال باید متذکر شد، شاید اگر حجم نمونه بیشتر می‌بود این تفاوت به سطح معنی‌داری می‌رسید. با توجه به نتایج فوق به نظر نمی‌آید که حساسیت کانال‌های پتاسیم وابسته به آدنوزین تری فسفات به گشاینده‌های کانال در زمینه پری اکلامپسی تغییری کرده باشد و نقش کمتر فاکتور هیپرپلازیه کننده وابسته به آندوتلیوم در حیوانات پری اکلامپتیک احتمالاً به دلیل کاهش تولید این ماده و نه کاهش اثر آن است.

در مجموع، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در پری اکلامپسی تجربی، قدرت آگونیست‌های گیرنده آلفا برای انقباض عروق، افزایش و توانایی آزاد کننده‌های نیتریک اکسید برای اتساع عروق کاهش می‌یابد. به نظر نمی‌آید وضعیت کانال‌های کلسیم حساس به ولتاژ و کانال‌های پتاسیمی حساس به آدنوزین تری فسفات در این مدل تغییر کند و در

Effects of Phenylephrine, Calcium, Acetylcholine and Diazoxide on Isolated Aorta of Preeclamptic Rats

Talebianpoor MS,*
Mirkhani H**.

* PhD Candidate of Pharmacology,
Department of Pharmacology, Faculty
of Medicine, Shiraz University of
Medical Sciences, Shiraz, Iran.

** Associate Professor of
Pharmacology, Department of
Pharmacology, Medicinal & Natural
Products Chemistry Research Center,
Faculty of Medicine, Shiraz University
of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 20/06/2009
Accepted: 11/08/2009

Corresponding Author Mirkhani H.
Email: mirkhanh@sums.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Preeclampsia, one of the most significant health problems in human pregnancy, is a leading cause of fetal mortality and maternal death. Alteration in vascular response to vasopressors and vasodilators is proposed as a major change in the context of preeclampsia. The aim of the present study was to investigate the responsiveness of preeclamptic rat aorta to some vasopressors and vasodilators.

Materials and methods: This experimental study was carried out in the pharmacology department of Shiraz University of Medical Sciences in 2008. Thirty pregnant rats were randomly divided into two groups (15 rats in each group): case group received L-NAME at a dose of 50 mg/kg through drinking water from day 11 of pregnancy. Control group received only tap water. On the 22nd gestational day, all rats were anesthetized and killed; thoracic aorta was isolated, cut into 2-3 mm rings and mounted in organ bath. The isolated aortic rings were then exposed to cumulative concentrations of phenylephrine (Ph) and calcium, separately and contractions were measured by isometric transducers. To study the relaxing responses of aortic segments to vasodilators, the effects of cumulative concentrations of acetylcholine (Ach) and diazoxide on aortic rings precontracted with Ph and potassium were recorded, respectively. SPSS software and unpaired T-Test were used for data analysis.

Results: Potency of phenylephrine to contract rat aorta was significantly higher in preeclamptic rats compared to normal pregnant group ($P=0.014$) but there was no significant difference in Ph-induced maximum contraction between two groups. Potency of Ach and its maximum relaxation effect was significantly lower in preeclamptic rats compared to controls. (p values were 0.026 and 0.004, respectively). There were no statistically significant differences in the contractile responses of calcium and relaxing effects of diazoxide between two groups.

Conclusion: Experimental preeclampsia increases the sensitivity of rat aorta to α -adrenergic receptor agonists and decreases the endothelium-dependent relaxation of it. It seems that the functions of voltage-operated calcium channels and ATP-dependent potassium channels do not change in experimental preeclampsia.

Keywords: Preeclampsia, L-NAME, Diazoxide, Thoracic aorta, Rat.

REFERENCES:

1. Vanwijck MJ, Kublickien K, Boer K, Vanbavel ED. Vascular function in preeclampsia. *Cacrdiovascular Research* 2000; 47: 38-48.
2. Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Human Reproduction Update* 1998; 4: 25-42.
3. Wight E, Kung CF, Moreau P, Takase H, Luscher TF. Effect on pregnancy outcome. *Journal of the Society Gynecologic Investigation* 1998; 5: 132-9.
4. National High Blood Pressure Education Program Working Group. Report on high blood pressure in pregnancy: consensus report. *American Journal of Obstetric Gynecoogy* 1990; 163: 1689-712.
5. Cabrera C, Bohr D. The role of nitric oxide in the central control of blood pressure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995; 206: 77-81.
6. Khalil RA, Granger GP. Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2002; 283: R29-R45.
7. Kenny LC, Baker PN, Kendall DA, Randall MD, Dunn WR. Differential mechanisms of endothelium-dependent vasodilator responses in human myometrial small arteries in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Clinical Science* 2002; 103: 67-73.
8. Richer C, Pratz J, Mulder P, Mondot S, Giudicelli JF, Cavero I. Cardiovascular and biological effects of K⁺ channel openers, a class of drugs with vasorelaxant and cardioprotective properties. *Life Sciences* 1990; 47: 1693-705.
9. Vanhoutte PM, Scott-Burden T. The endothelium in health and disease. *Texas Heart Institute Journal* 1994; 21: 62-7.
10. Khalil RA, Crews JK, Novak J, Kassab S, Grander JP. Enhanced vascular reactivity during inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats. *Hypertension* 1998; 31: 1065-9.
11. Ma C, Zhuang Y, Xu Y. The effect of inhibition of nitric oxide synthesis on vasoregulatory factors in pregnant rats. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 1999; 34: 521-4.
12. Bradford MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-54.
13. Podjarny E, Baylis C, Losonczy G. Animal models of preeclampsia. *Seminars in Perinatology* 1999; 23: 2-13.
14. Zhang Y, Kaufman S. Effect of nitric oxide synthase inhibition on cardiovascular and hormonal regulation during pregnancy in the rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2000; 78: 423-7.
15. Vanderlelie JJ, Perkins AV. Chronic nitric oxide synthase inhibition in pregnant rats does not result in placental oxidative stress. *Hypertension in Pregnancy* 2006; 25: 103-14.
16. Suematsu E, Hirata M, Hashimoto T, Kuriyama H. Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca²⁺ from intracellular storage sites in skinned single cells of porcine coronary artery. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984; 120: 481-5.
17. Khalil RA, Van Breemen C. Mechanisms of calcium mobilization and homeostasis in vascular smooth muscle and their relevance to hypertension. In: Laragh JH, Brenner BM (editors). *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis Management*. 2nd ed. New York: NY: Raven Press; 1995: 523-40.
18. Bolton TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiological Reviews* 1979; 59: 606-718.
19. Van Breemen C, Aaronson P, Loutzenhiser R. Na-Ca interactions in mammalian smooth muscle. *Pharmacological Reviews* 1979; 30: 167-208.
20. Martínez-Orgado J, González R, Tovar S, Marín J, Salaices M, Alonso MJ. Administration of N(omega)-L-arginine methyl ester (L-NAME) impairs endothelium-dependent relaxation in gravid but not nongravid rats. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 2003; 10: 74-81.
21. Roy B, Sicotte B, Brochu M, St-Louis J. Modulation of calcium mobilization in aortic rings of pregnant rats: contribution of extracellular calcium and of voltage-operated calcium channels. *Biology of Reproduction* 1999; 60: 979-88.
22. Leonid L, Henry N, Karolina K. The mechanism of EDHF-mediated responses in subcutaneous artery from healthy pregnant women. *American Journal of Physiology* 2004; 286: 1102-9.