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

Downloaded from ppj.phypha.ir at 1:14 +0330 on Thursday March 4th 2021

کاهش پاسخ‌دهی عروق زانوی موش صحرایی به تحریک گیرنده‌های آلفا ـ۱ آدرنرژیک در شرایط التهاب مزمن : نقش نیتریک اوکساید

محمد بدوی[۱] ، علی خوش باطن[۲] ، سهراب حاجی زاده[۱] ، فرزانه نظری[۳]
۱- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، بخش فیزیولوژی
۲- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، دانشکده پزشکی، بخش فیزیولوژی و بیوفیزیک
۳- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، دانشکده پزشکی، بخش آسیب شناسی

چکیده

اثر التهاب مزمن ناشی از تزریق فروند آجووانت کامل (Complete Freund's Adjuvant, CFA) بر تغییرات قطر مفصل و پاسخ‌دهی عروق کپسول قدامی زانوی موش صحرایی به فنیل افرین (آگونیست انتخابی گیرنده های آلفا -۱) مورد بررسی قرار گرفت. تزریق CFA به داخل فضای قدامی کپسول زانوی راست باعث افزایش شدید قطر زانوی تزریق شده در تمام روزهای آزمایش گردید که در روز سوم پس از تزریق به حداکثر مقدار خود رسید (۲±۴۹/۷ درصد، P<۰/۰۰۱)، سپس به تدریج کاهش یافت ولی هرگز به مقدار اولیه قبل از تزریق بازنگشت. تغییرات جریان خون در پاسخ به فنیل افرین در زانوی دریافت کننده CFA و زانوی مقابل با استفاده از جریان سنج لیزری اندازه‌گیری و با پاسخ‌های مشابه در حیوانات سالم مقایسه شد. در حیوانات شاهد، تجویز موضعی فنیل افرین (10^{-7}-10^{-13} mole) روی کپسول مفصل زانو باعث کاهش وابسته به مقدار جریان خون شد (۴/۵±۵۸/۲ تا ۴/۴±۱۱/۱ درصد، P<۰/۰۰۱). از طرف دیگر التهاب ناشی از تزریق CFA، باعث کاهش پاسخ‌دهی عروق زانو به فنیل افرین هم در زانوی تزریق شده و هم در زانوی مقابل شد (به ترتیب ۶/۱±۴۸/۳ تا ۱/۶±۵/۲ درصد و ۵/۶±۴۵/۳ تا ۲/۲±۱/۹ درصد، P<۰/۰۵). با وجود این، پاسخ‌دهی زانوی تزریق شده پس از ۲۱ روز و زانوی مقابل پس از ۳۰ روز به مقدار طبیعی خود بازگشت. برای بررسی نقش نیتریک اوکساید در افزایش قطر و تغییرات پاسخ‌دهی عروق زانو، در گروه دیگری از موش‌های صحرایی که CFA دریافت کرده‌اند روزانه ۱۲۰ mg/kg آمینوگوانیدین (مهار کنندهٔ برگشت ناپذیر iNOS) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید.

تزریق آمینوگوانیدین باعث کاهش نسبی در افزایش قطر و بازگشت پاسخ‌دهی عروق به فنیل افرین در هر دو زانوی تزریق شده و مقابل در روزهای هفتم، چهاردهم و بیست و یکم به مقدار طبیعی شد (P<۰/۰۰۱). نتایج این تحقیق نشان داد که التهاب مزمن باعث کاهش پاسخ‌دهی عروق زانو به فنیل افرین می‌شود و تولید بیش از حد نیتریک اوکساید در این شرایط، در واکنش‌های التهابی و کاهش پاسخ‌دهی عروق نقش اساسی دارد.

واژه‌های کلیدی : مفصل زانو، التهاب، گیرنده‌های آلفا -۱ آدرنرژیک، نیتریک اوکساید، آمینوگوانیدین، جریان خون.

مقدمه

تغییر مکانیسم‌های طبیعی تنظیم کننده جریان خون بافت سینوویال به وسیله بیماری‌های التهابی مفاصل

Downloaded from ppj.phypha.ir at 1:14 +0330 on Thursday March 4th 2021

می‌تواند در روند تخریب بافت سینوویال دخالت داشته باشد. بیماری‌های التهابی مانند آرتریت روماتوئید باعث افزایش جریان خون در مفصل مبتلا می‌شوند ولی مکانیسم‌های مسئول آن هنوز به طور کامل و واضح شناخته نشده‌اند. در حیواناتی که دچار التهاب حاد شده‌اند دیده شده است که پاسخ گیرنده‌های آلفا -۱ آدرنرژیک به نورآدرنالین و فنیل افرین [۹] و همچنین پاسخ انقباضی عروق زانو به تحریک الکتریکی عصب [۱۷] کاهش می‌یابد. علاوه بر این، مشاهده شده است که در شرایط التهاب مزمن ایجاد شده به وسیله فروند آجووانت کامل (CFA)، پاسخ انقباضی عروق زانو به تحریک الکتریکی عصب سمپاتیک کاهش می‌یابد [۲۲، ۲۱] ولی مکانیسم این کاهش پاسخ نیز مشخص نشده است. در سال‌های اخیر به خوبی مشخص شده است که تولید نیتریک اوکساید (NO) به وسیله آندوتلیوم عروق، ماکروفاژها و یاخته‌های دیگر بدن نقش مهمی در روند فیزیولوژیک و پاتولوژیک دارد [۲٤، ۲۰]. NO توسط یک خانواده آنزیمی به نام نیتریک اوکساید سینتاز (NOSs) از اسید آمینه L- آرژینین ساخته می‌شود [۲۷، ۲٤]. در یاخته‌های آندوتلیال عروق در پاسخ به محرک‌های شیمیایی و فیزیکی توسط آنزیم نیتریک اوکساید سینتاز آندوتلیال (eNOS) ساخته می‌شود و در نگهداری تون عروق و تنظیم فشار و جریان خون نقش دارد [۲۷، ۲٤]. در سیستم عصبی، NO توسط نوع عصبی نیتریک اوکساید سینتاز (nNOS) ساخته می‌شود و به عنوان یک میانجی عصبی عمل می‌کند [۲۸، ۱۰]. علاوه بر این، طی واکنش‌های التهابی مقدار زیادی NO توسط ماکروفاژهای فعال شده تولید و رها می شود که در این شرایط آنزیم نیتریک اوکساید القاء شونده (iNOS) نقش اساسی را بر عهده دارد [۲٤]. این آنزیم در اثر پاسخ‌های دفاعی میزبان یا واکنش‌های التهابی تولید می‌شود و برای مدت طولانی به مقدار زیاد NO تولید می‌کند [۲۸، ۱۰]. فعالیت آنزیم iNOS غیر وابسته به مقادیر کلسیم است و تولید زیاد NO از این طریق می‌تواند اثرات سیتوتوکسیک علیه میکروب‌ها، یاخته‌های سرطانی، ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها داشته باشد [۲۵، ۲٤]. از طرف دیگر، مشاهده شده است که در مایع سینوویال و سرم بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید میزان NO افزایش می‌یابد [۱۳]. علاوه بر این، در موش‌های صحرایی که به آنها قطعات دیواره سلولی استرپتوکوک تزریق شده است، میزان mRNA آنزیم iNOS و نیتریت افزایش می‌یابد و تجویز N- مونومتیل -L- آرژینین (L-NMMA، مهار کننده NOS) به طور قابل توجهی شدت التهاب و تخریب بافت سینوویال را کاهش می‌دهد [۲۰]. در یک مطالعه دیگر دیده شده است که NO درون‌زا در محل التهاب تولید می‌شود و پیدایش خیز را تعدیل می‌کند [۱۱].

وجود گیرنده های آلفا -۱ آدرنرژیک روی ماهیچه صاف عروق در بسیاری از گونه‌ها به اثبات رسیده [۲۲، ۱۹، ۱۸، ۱۵، ٦، ٥، ٤] و پیشنهاد شده است که پاسخ عروق به نورآدرنالین رها شده از پایانه‌های عصبی عمدتا به وسیله این گیرنده‌ها انجام می‌شود [۳۰]. از طرف دیگر به خوبی مشخص شده است که پاسخ عضله صاف عروق به آگونیست‌های گیرنده‌های آلفا آدرنرژیک تحت تأثیر عوامل رها شده از آندوتلیوم قرار می‌گیرد [۳، ۲]. بعد از مدتی مشخص شد که اثر مهاری آندوتلیوم بر پاسخ انقباضی ناشی از تحریک عصب سمپاتیک توسط NO انجام می‌شود [۱۸]. بر اساس این اطلاعات، اولین هدف ما در این تحقیق این بود که بررسی کنیم آیا پاسخ عروق زانو به فنیل افرین به عنوان آگونیست گیرنده های آلفا -۱ در شرایط التهاب مزمن با حیوانات سالم متفاوت است یا

Downloaded from ppj.phypha.ir at 1:14 +0330 on Thursday March 4th 2021

خیر. علاوه بر این، مطالعات گذشته نشان داده است که التهاب یک زانو می‌تواند به التهاب [١٤] و افزایش محتوای نوروپپتیدهای التهاب‌زا در مایع سینوویال زانوی مقابل [۱] منجر شود. بنابراین، هدف دیگر این مطالعه بررسی پاسخ زانوی مقابل به تحریک گیرنده‌های آلفا -۱ بود. همچنین با توجه به این که معلوم شده است در شرایط التهاب مزمن به طور کلی میزان تولید NO افزایش می‌یابد، بررسی نقش NO در شدت التهاب و تغییرات پاسخ‌دهی عروق زانو به تحریک گیرنده‌های آلفا -۱، حائز اهمیت بود و هدف بعدی ما را تشکیل می‌داد.

مواد و روش‌ها

مواد ـ در این تحقیق از مواد و داروهای زیر استفاده شد : فروند آجووانت کامل (Complete Freund's Adjuvant, CFA) فنیل افرین هیدروکلراید (آگونیست گیرنده آلفا - ۱)، یوهمبین هیدروکلراید (آنتاگونیست گیرنده آلفا -۲)، آمینوگوانیدین (مهار کننده برگشت ناپذیر آنزیم iNOS) (همگی از سیگما، انگلستان). علاوه بر این، از اورتان و دی اتیل اتر (هر دو از مرک، آلمان) به عنوان ماده بیهوشی استفاده شد.

گروه بندی حیوانات ـ آزمایش‌ها روی موش‌های صحرایی سفید نر بالغ از نژاد Wistar (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) به وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. آزمایش‌ها در سه گروه و چندین زیر گروه که هر کدام حداقل شامل ۸ سر حیوان بوده است به شرح زیر انجام شد :

گروه اول ـ آزمایش‌های مربوط به تغییرات قطر مفصل- این گروه خود شامل چهار زیر گروه است :

۱- حیواناتی که CFA دریافت کرده‌اند و گروه التهابی را تشکیل می‌دادند.

۲- حیواناتی که سالین به تنهایی دریافت کرده‌اند و گروه شاهد را برای گروه ۱ تشکیل می‌دادند.

۳- حیواناتی که در اثر تزریق CFA دچار التهاب مزمن زانو شده‌اند و روزانه ۱۲۰ mg/kg آمینوگوانیدین به صورت داخل صفاقی دریافت می‌کردند.

٤- حیواناتی که آمینوگوانیدین به تنهایی دریافت می‌کردند و گروه شاهد را برای زیر گروه ۳ تشکیل می‌دادند.

گروه دوم ـ آزمایش‌های مربوط به اندازه‌گیری تغییرات جریان خون ـ در این گروه نیز چهار زیر گروه قرار می‌گیرند :

۱- گروه التهابی شامل حیواناتی است که CFA به تنهایی دریافت کرده‌اند.

۲- گروه شاهد متشکل از حیوانات سالم.

۳- گروهی که CFA دریافت کرده‌اند و روزانه ۱۲۰ mg/kg آمینوگوانیدین به صورت داخل صفاقی به آنها تزریق می‌شد.

٤- گروهی که روزانه فقط ۱۲۰ mg/kg آمینوگوانیدین به صورت داخل صفاقی دریافت می‌کردند و به عنوان شاهد برای گروه ۳ در نظر گرفته شده‌اند.

گروه سوم ـ ارزیابی مهار گیرنده‌های آلفا ـ با وجود اینکه فنیل افرین آگونیست انتخابی آلفا -۱ است، در غلظت‌های زیاد می‌تواند اثرات آگونیستی روی گیرنده‌های آلفا -۲ هم بگذرد [۸، ۷]. لذا برای مهار اثرات گیرنده‌های آلفا -۲، حدود ۳۰ دقیقه قبل از تجویز فنیل افرین، از یوهمبین (آنتاگونیست گیرنده‌های آلفا -۲) به میزان ۰/۵ mg/kg به صورت داخل صفاقی استفاده شد. علاوه بر این، برای اطمینان از مهار گیرنده آلفا -۲ در اثر تزریق داخل صفاقی ۰/۵ mg/kg یوهمبین، در گروه

Downloaded from ppj.phypha.ir at 1:14 +0330 on Thursday March 4th 2021

دیگری از حیوانات پاسخ‌دهی عروق زانو به مقادیر مختلف کلونیدین (آگونیست گیرنده‌های آلفا -۲) در حضور و غیاب یوهمبین مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، برای اینکه مطمئن شویم اثر انقباضی فنیل افرین بر عروق زانو از طریق تحریک گیرنده‌های آلفا -۱ انجام می‌شود. در گروه دیگری از حیوانات، اثر فنیل افرین را در حضور و غیاب ۰/۱ mg/kg پرازوسین به عنوان آنتاگونیست گیرنده آلفا -۱ بررسی کردیم.

روش ایجاد التهاب مزمن ـ برای ایجاد التهاب مزمن ابتدا حیوانات را با استفاده از اتر بیهوش کردیم. سپس توسط سرنگ انسولینی شماره ۲۶ به اندازه ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول CFA به داخل فضای قدامی مفصل زانوی راسمت تزریق کردیم. استفاده از این روش یک مدل پذیرفته شده برای ایجاد التهاب مزمن است که واکنش‌های التهابی شبیه آرتریت روماتوئید ایجاد می‌کند [۲۲، ۲۱، ۱۲].

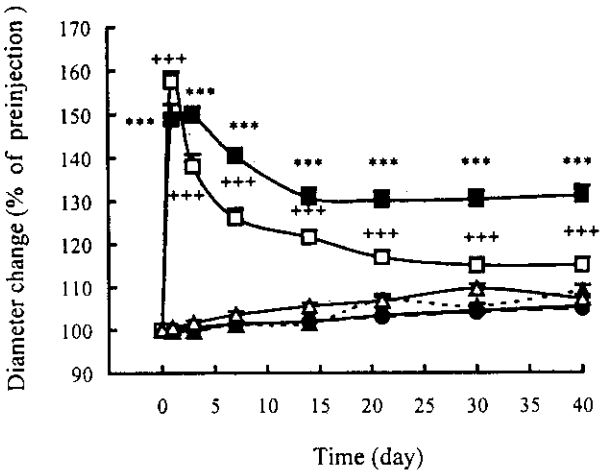
اندازه گیری تغییرات قطر مفصل ـ اندازه گیری تغییرات قطر داخلی ـ جانبی مفصل زانو یکی از معیارهای پذیرفته شده برای ارزیابی شدت التهاب است [۲۲، ۲۱، ۱۲]. برای این کار از یک کولیس با دقت ۰/۱ mm (Rabone، سوییس) استفاده شد. با استفاده از این کولیس قطر داخلی ـ جانبی مفصل زانو در زمان‌های بلافاصله قبل از تزریق، ۱، ۳، ۱۴، ۱۵، ۲۱، ۳۰ و ۴۰ روز پس از تزریق در گروه‌های مختلف اندازه‌گیری شد. سپس تغییرات قطر زانوی تزریق شده و زانوی مقابل آن با مقدار قبل از تزریق مقایسه گردید.

اندازه‌گیری تغییرات جریان خون ـ برای اندازه‌گیری تغییرات جریان خون در پاسخ به تجویز مواد مختلف، حیوانات توسط تزریق داخل صفاقی اورتان به میزان ۱/۵ g/kg بیهوش شدند. پس از اطمینان از بیهوشی عمیق حیوان که از طریق از بین رفتن بازتاب عقب کشیدن اندام خلفی در پاسخ به وارد آمدن محرک دردناک به پنجه حاصل می‌شد، یک قسمت بیضوی ناحیه قدامی ـ داخلی زانو با قیچی برداشته می‌شد تا این ناحیه از مفصل زانو ظاهر شود. برای اندازه‌گیری تغییرات جریان خون از دستگاه جریان سنج لیزری دو کاناله مدل MBF3D (Moor instrument، انگلستان) استفاده شد. مطالعات گذشته استفاده از این روش را در اندازه‌گیری تغییرات جریان خون مفصل زانو در گربه، خرگوش [۶] و موش صحرایی [۱۶] مورد تأیید قرار داده‌اند. پروب دستگاه درست در بالای سطح قدامی ـ داخلی کپسول زانو قرار داده شد. مطالعات گذشته نشان داده است که در این محل می‌توان تغییرات جریان خون بافت سینوویال مفصل زانو را اندازه‌گیری نمود [۲۶، ۲۲، ۱۲]. تغییرات جریان خون هر دو زانوی چپ و راست در پاسخ به مقادیر مختلف فنیل افرین (10^{-7} mole-10^{-13}) در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱، ۳۰ و ۴۰ پس از تزریق CFA با استفاده از جریان سنج لیزری اندازه‌گیری و با مقادیر حاصل از پاسخ‌دهی حیوانات سالم مقایسه گردید. مقادیر مختلف فنیل افرین به طور تصادفی و به صورت موضعی روی ناحیه برهنه مفصل زانو در حجمی معادل ۰/۱ ml تجویز شد. برای اجتناب از تداخل گیرنده‌های آلفا -۲، حدود ۳۰ دقیقه قبل از تجویز فنیل افرین، از یوهمبین به مقدار ۰/۵ mg/kg به صورت داخل صفاقی استفاده شد. در نهایت پس از خاتمه آزمایش‌ها، حیوانات توسط تزریق بیش از حد داروی بیهوشی (اورتان) کشته شدند و صفر زیستی آنها اندازه‌گیری و قبل از محاسبه درصد تغییرات، از مقدار جریان خون پایه قبل از تجویز فنیل افرین کم شد. صفر زیستی در واقع مقدار عددی است که از انعکاس و تغییر فرکانس نور در اثر برخورد با بافت‌های دیگر غیر از خون

Downloaded from ppj.phypha.ir at 1:14 +0330 on Thursday March 4th 2021

بدست می‌آید و دستگاه حتی در شرایط مرگ حیوان و قطع جریان خون نشان می‌دهد و برای محاسبه دقیق‌تر تغییرات، باید از مقدار جریان خون پایه کاسته شود. ضمناً برای اینکه از تغییرات فشار خون در هنگام تجویز داروها مطلع شویم، فشار خون حیوانات با کانول‌گذاری در شریان کاروتید چپ و ثبت فشار خون در هنگام آزمایش، اندازه‌گیری شد و نشان داده شد که تغییرات آن در هنگام تجویز موضعی داروها معنی‌دار نیست.

روش‌های آماری ـ نتایج حاصل به صورت میانگین درصد تغییرات ± خطای معیار ارائه گردیده است. برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از Kolmogrov-Smirnov goodness of fit test استفاده شد. برای یافتن اختلاف بین گروه‌های مختلف از روش ANOVA یک طرفه و دو طرفه و به دنبال آن از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) استفاده گردید. در همه این آزمون‌ها سطح معنی‌دار اختلاف‌ها P<٠/٠٥ در نظر گرفته شده است.



شکل ١- تغییرات قطر مفصل زانو (میانگین درصد تغییرات ± خطای معیار ٢٨-١٠=n) طی یک دوره چهل روزه در گروه شاهد □ ، گروه التهابی (زانوی دریافت کننده CFA ■ و زانوی مقابل ▲)، گروه شاهد دریافت کنندهٔ آمینوگوانیدین ● و گروه التهابی دریافت کنندهٔ آمینوگوانیدین (زانوی دریافت کننده CFA □ و زانوی مقابل△). زمان صفر، اندازه قطر قبل از تزریق را نشان می‌دهد. قطر زانوی دریافت کننده CFA در تمام طول دورهٔ چهل روزه نسبت به مقدار قبل از تزریق و گروه شاهد افزایش معنی‌دار نشان می‌دهد (*** نشان دهنده P<٠/٠٠١). گروه التهابی دریافت کننده آمینوگوانیدین از روز سوم به بعد به طور معنی‌دار کمتر از گروهی که CFA به تنهایی دریافت کرده است، افزایش قطر نشان می‌دهد (+++ نشان دهنده P<٠/٠٠١).

نتایج

تغییرات قطر مفصل ـ تزریق CFA به داخل مفصل زانوی راست باعث افزایش معنی‌دار قطر این زانو در تمام روزهای آزمایش پس از تزریق شد (ANOVA یک طرفه، P<٠/٠٠١) (شکل ١). در روز سوم پس از تزریق قطر زانوی تزریق شده به حداکثر افزایش خود (٤٩/٧ ± ٢٪) می‌رسد، سپس به تدریج در روزهای بعد کاهش می‌یابد ولی هرگز به مقدار اولیه خود یا به اندازهٔ زانوی مقابل یا گروه شاهد نمی‌رسد (یعنی در روز ١، ٤٨/٨ ± ٣/٥٪، در روز ٧، ٤٠/٣ ± ١/٩٪، در روز ١٤، ٣٠/٦ ± ٢/٣٪، در روز ٢١، ٣٠ ± ٢/١٪، در روز ٣٠، ٣٠/٢ ± ٢٪ و در روز ٤٠، ٣١ ± ٢/٣٪ افزایش قطر نشان می‌دهند). با این وجود این، قطر زانوی مقابل با گروه شاهد، تفاوت معنی‌دار نشان نداد. از طرف دیگر، تجویز روزانه آمینوگوانیدین به صورت داخل صفاقی به مقدار ١٢٠ mg/kg در گروه دیگر دریافت کننده CFA باعث شد که از روز سوم به بعد قطر زانوی تزریق شده در این گروه نسبت به گروهی که CFA به تنهایی دریافت کرده‌اند، بطور معنی‌دار کاهش یابد (ANOVA دو طرفه، P<٠/٠٠١) (یعنی در روز ١، ٥٧/٧ ± ٢/٣٪، در روز ٣، ٣٨ ± ٢/٨٪، در روز ٧، ٢٦ ± ٢/٣٪، در روز ١٤، ٢١ ± ١/٧٪، در روز ٢١، ١٦/٨ ± ١/٦٪، در روز ٣٠، ١/٨٪

Downloaded from ppj.phypha.ir at 1:14 +0330 on Thursday March 4th 2021

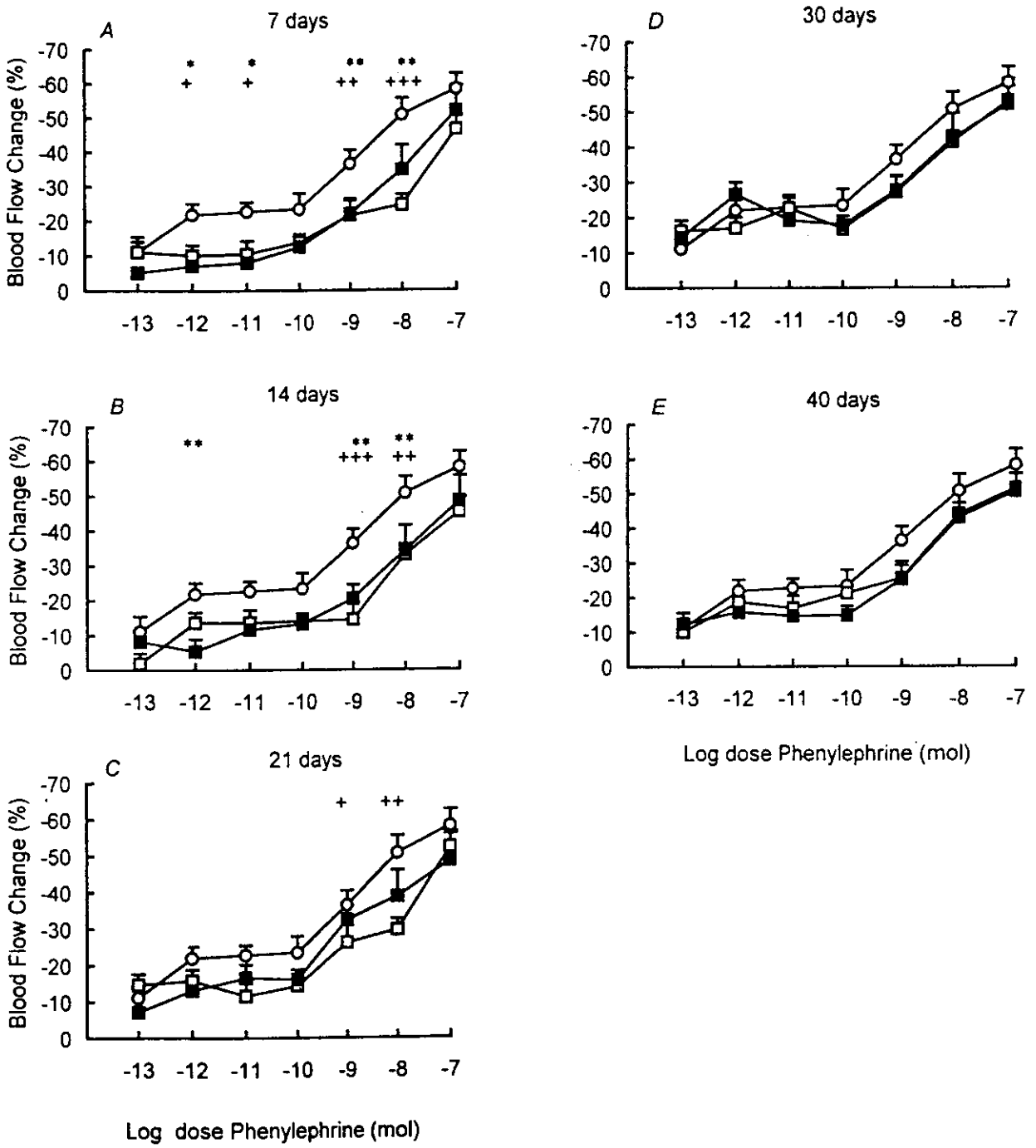
± ۱۴/۹ و در روز ۴۰، ۱/۸٪ ± ۱۴/۹ افزایش قطر نشان دادند). با وجود این، علی‌رغم کاهش نسبی، قطر زانوی این گروه نسبت به مقدار قبل از تزریق و گروه شاهد افزایش معنی‌دار نشان می‌دهد (ANOVA دو طرفه، P<۰/۰۰۱).

تغییرات جریان خون در پاسخ به فنیل افرین ـ برای ارزیابی بهتر پاسخ‌دهی عروق به فنیل افرین به عنوان آگونیست گیرنده‌های آلفا -۱ لازم بود که اول گیرنده‌های آلفا -۲ مسدود شوند. به همین دلیل به منظور مهار گیرنده‌های آلفا -۲، حدود ۳۰ دقیقه قبل از تجویز فنیل افرین، از تزریق داخل صفاقی یوهمبین به میزان ۰/۵ mg/kg استفاده شد. سپس مقادیر مختلف فنیل افرین (10^{-7}-10^{-13} mole) به طور تصادفی و در حجم‌های ۰/۱ ml به صورت موضعی روی قسمت برهنه مفصل زانو تجویز گردید. فنیل افرین، به صورت وابسته به مقدار باعث کاهش معنی‌دار جریان خون بافت سینوویال مفصل قدامی زانو گردید (به ترتیب ۴/۵٪ ± ۵۸/۲ تا ۴/۴٪ ± ۱۱/۱، ANOVA یک طرفه، P<۰/۰۰۱) (شکل ۲). با وجود این، اثرات انقباضی فنیل افرین روی عروق که به صورت کاهش جریان خون مشاهده می‌شود، در روزهای ۷ و ۱۴ پس از تزریق CFA، هم در زانوی دریافت کننده CFA و هم در زانوی مقابل نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌دار کمتر است (به ترتیب ۶/۱٪ ± ۴۸/۳ تا ۱/۶٪ ± ۵/۲ و ۵/۶٪ ± ۴۵/۳ تا ۲/۲٪ ± ۱/۹، ANOVA دو طرفه، P<۰/۰۰۱) (شکل ۲ A و B). با وجود این، در روز ۲۱، پاسخ‌دهی زانوی دریافت کننده CFA به مقدار طبیعی بر می‌گردد و با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار ندارد ولی پاسخ زانوی مقابل هنوز هم نسبت به گروه شاهد کمتر است (ANOVA دو طرفه، P<۰/۰۰۱) (شکل ۲ C). در روزهای ۳۰ و ۴۰ تفاوت معنی‌داری بین پاسخ‌دهی گروه التهابی (هر دو زانو) و گروه شاهد وجود نداشت (شکل ۲ D و E).

مهار گیرنده‌های آلفا ـ برای بررسی توانایی یوهمبین به میزان ۰/۵ mg/kg در مهار مؤثر گیرنده‌های آلفا -۲، پاسخ عروق به مقادیر مختلف تجویز موضعی کلونیدین (10^{-7}-10^{-10} mole) در حضور و غیاب یوهمبین بررسی شد. همان طور که در شکل ۳A دیده می‌شود، با این مقدار یوهمبین، گیرنده‌های آلفا -۲ به طور موثر مهار شدند (ANOVA دو طرفه، P<۰/۰۰۱). از طرف دیگر، تجویز داخل صفاقی پرازوسین (آنتاگونیست آلفا -۱) به میزان ۰/۱ mg/kg به طور مؤثر پاسخ‌دهی عروق به فنیل افرین را مهار کرد (ANOVA دو طرفه، P<۰/۰۰۱) (شکل ۳B)که نشان می‌دهد اثر انقباضی فنیل افرین روی عروق از طریق گیرنده‌های آلفا -۱ اعمال می‌شود.

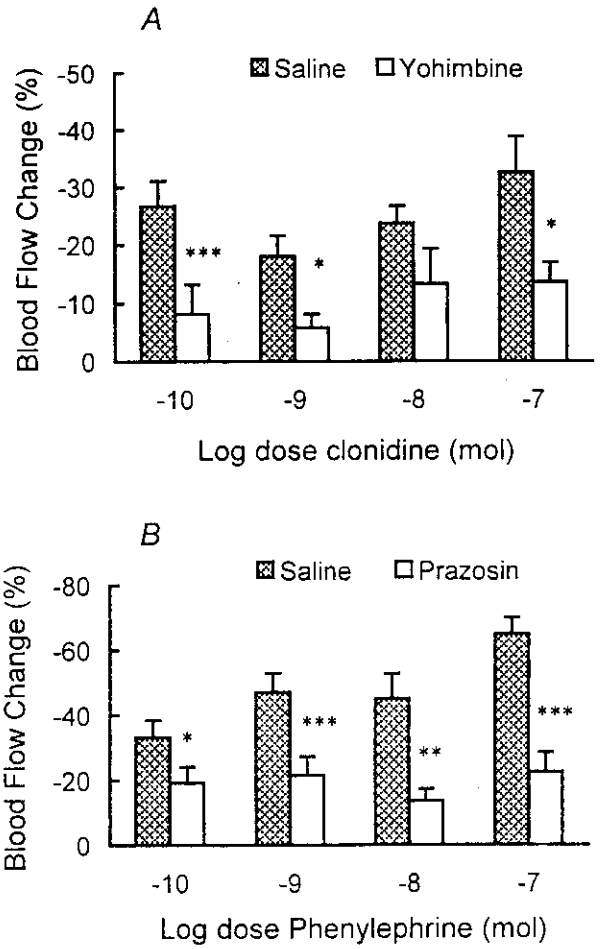
اثر مهار آنزیم نیتریک اوکساید سینتاز بر پاسخ‌دهی عروق ـ همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود پاسخ‌دهی عروق به فنیل افرین در شرایط التهاب مزمن حداقل تا سه هفته بعد از تزریق CFA نسبت به حیوانات سالم کاهش نشان می‌دهد. برای بررسی نقش NO در این کاهش پاسخ‌دهی، در گروه‌های التهابی دیگر، روزی یک بار آمینوگوانیدین به مقدار ۱۲۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی تزریق گردید و در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از تزریق CFA پاسخ‌دهی عروق به فنیل افرین (10^{-7}-10^{-10} mole) بررسی گردید. مجددا مانند آزمایش‌های قبلی، برای مهار گیرنده‌های آلفا -۲ از یوهمبین استفاده شد. تجویز روزانه آمینوگوانیدین باعث شد پاسخ‌دهی عروق به فنیل افرین هم در زانوی دریافت‌کننده CFA و هم در زانوی مقابل در روز هفتم پس از تزریق تقویت شود و به مقدار طبیعی برگردد به طوری که با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت (شکل

Downloaded from ppj.phypha.ir at 1:14 +0330 on Thursday March 4th 2021



شکل ٢- درصد تغییرات جریان خون در پاسخ به تجویز موضعی فنیل افرین در گروه شاهد O و گروه التهابی (زانوی دریافت کننده CFA ■ و زانوی مقابل □) در روزهای ٧، (A)، ١٤، (B)، ٢١، (C)، ٣٠، (D) و ٤٠، (E) پس از تزریق CFA (میانگین درصد تغییرات ± خطای معیار، n=٨-١٢). * نشان دهنده P<٠/٠٥ و ** نشان دهنده P<٠/٠١ تفاوت معنی‌دار بین زانوی دریافت کننده CFA و گروه شاهد. + نشان دهنده P<٠/٠٥ و ++ نشان دهنده P<٠/٠١ تفاوت معنی‌دار بین زانوی مقابل و گروه شاهد

Downloaded from ppj.phypha.ir at 1:14 +0330 on Thursday March 4th 2021



شکل ۳- درصد تغییرات جریان خون (میانگین درصد تغییرات ± خطای معیار، ۱۰-۸=n) در پاسخ به تجویز موضعی کلونیدین در حضور و غیاب ۰/۵ mg/kg یوهمبین (A) و در پاسخ به تجویز موضعی فنیل افرین در حضور و غیاب ۰/۱ mg/kg پرازوسین (B). (* نشان دهنده P<۰/۰۵ ، ** نشان دهنده P<۰/۰۱ و *** نشان دهنده P<۰/۰۰۱).

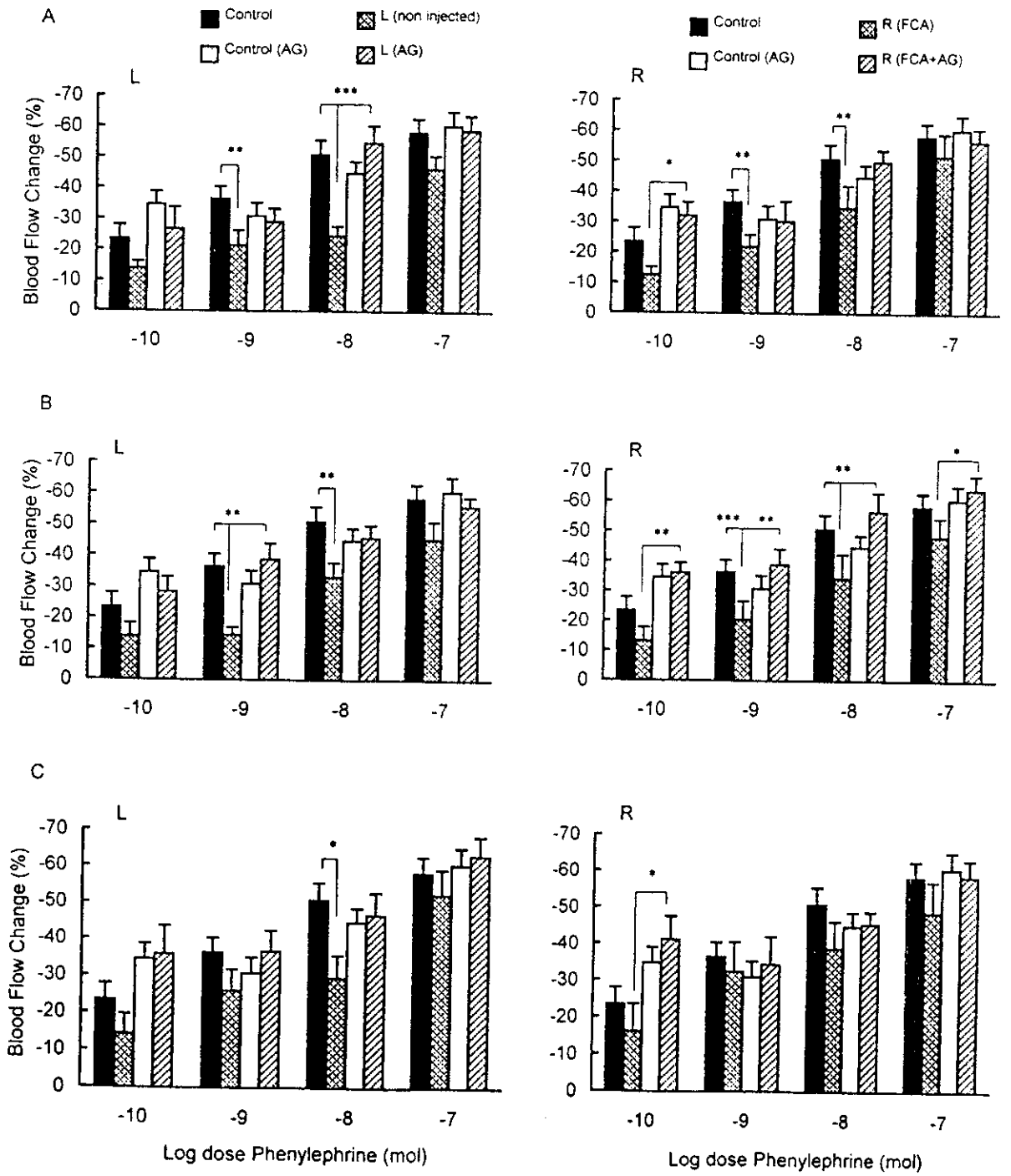
۴A). به همین ترتیب، در روزهای ۱۴ و ۲۱ نیز تجویز روزانه آمینوگوانیدین باعث تقویت پاسخ‌دهی عروق به فنیل افرین هم در زانوی دریافت کننده CFA و هم در زانوی مقابل شد (شکل ۴B و ۴C) به طوری که پاسخ‌دهی آنها با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

بحث

در مطالعات گذشته مشاهده شده است که تزریق CFA به داخل زانوی موش صحرایی باعث افزایش قابل توجه قطر زانو می‌شود و این افزایش قطر به عنوان معیاری برای پاسخ التهابی در نظر گرفته شده است [۲۲]. در این مطالعه نیز مشاهده شد که تجویز CFA باعث افزایش قطر زانوی تزریق شده در تمام طول دورهٔ آزمایش گردید و با مطالعات گذشته همخوانی دارد [۲۲، ۲۱]. با وجود این، قطر زانوی مقابل و نیز گروه شاهد افزایش قابل توجهی نشان نمی‌دهد و با گروه سالم تفاوت معنی‌دار ندارد. از طرف دیگر برای بررسی نقش NO در این واکنش‌های التهابی و تغییرات قطر مفصل در گروه دیگری از حیوانات آنزیم iNOS به وسیلهٔ تزریق روزانه آمینوگوانیدین مهار گردید. همان گونه که مشاهده شد (شکل ۱) افزایش قطر زانو در گروهی که CFA به علاوه آمینوگوانیدین دریافت کرده‌اند به طور معنی‌دار کمتر از افزایش قطر در گروه التهابی است که CFA به تنهایی دریافت کرده‌اند. این نتیجه نیز با نتایج بدست آمده از تحقیقات دیگران علی رغم تفاوت در مدل التهابی مورد استفاده، همخوانی دارد و نتایج آنها را تأیید می‌کند [۲۰]. مشاهده شده است که در آرتریت تجربی ایجاد شده به وسیله تزریق قطعات دیواره یاخته‌ای استرپتوکوک در موش‌های صحرایی، بیان ژن iNOS افزایش می‌یابد و تجویز L-NMMA به طور قابل توجهی تورم مفصل و تخریب غضروف را کاهش می‌دهد [۲۰] که نتایج حاصل از این تحقیق نیز در همین راستا می‌باشد.

در آزمایش‌های مربوطه به تغییرات جریان خون مشاهده شد که پاسخ‌دهی عروق زانو هم در زانوی دریافت کننده

Downloaded from ppj.phypha.ir at 1:14 +0330 on Thursday March 4th 2021



شکل ٤- درصد تغییرات جریان خون در پاسخ به تجویز موضعی فنیل افرین (میانگین درصد تغییرات ± خطای معیار، ١٠-٨=n) هفت روز (A) ، چهارده روز (B) و بیست و یک روز (C) پس از تزریق CFA و آمینوگوانیدین. R- تغییرات جریان خون در گروه شاهد و زانوی دریافت کننده CFA (بدون آمینوگوانیدین و بعد از تزریق روزانه mg/kg ١٢٠ آمینوگوانیدین). L- تغییرات جریان خون در گروه شاهد و زانوی مقابل (بدون آمینوگوانیدین و بعد از تزریق روزانه mg/kg ١٢٠ آمینوگوانیدین). نتایج نشان می‌دهد که تجویز آمینوگوانیدین باعث تقویت پاسخ به فنیل افرین و بازگشت آن به مقدار طبیعی می‌شود (* نشان دهنده P<٠/٠٥ ** نشان دهنده P<٠/٠١ و *** نشان دهنده P<٠/٠٠١).

Downloaded from ppj.phypha.ir at 1:14 +0330 on Thursday March 4th 2021

CFA و هم در زانوی مقابل در گروه التهابی حداقل تا سه هفته پس از تزریق CFA نسبت به حیوانات سالم به طور معنی‌دار کمتر است. با وجود این در زانوی دریافت کننده CFA پاسخ انقباضی عروق به فنیل افرین در روز ۲۱ و در زانوی مقابل در روز سی‌ام به مقدار طبیعی بر می‌گردد. در مطالعات گذشته مشخص شده بود که در التهاب حاد [۱۷] و مزمن [۲۲] در زانوی موش صحرایی پاسخ انقباضی به تحریک عصب سمپاتیک زانو کاهش می‌یابد و در مورد التهاب مزمن این کاهش پاسخ‌دهی حداقل تا سه هفته باقی می‌ماند. در این جا نیز نتایج بدست آمده با نتایج دیگران مشابهت و همخوانی دارد. در آن مطالعات پیشنهاد شده بود که با پیشرفت التهاب مزمن، پاسخ‌دهی عروق به تحریک عصب احتمالاً در اثر تخلیهٔ پیک‌های عصبی، تغییرات گیرنده‌های پس سیناپسی یا تخریب خود عصب کاهش می‌یابد [۲۲، ۱۷]. احتمال دیگری که وجود دارد این است که طی التهاب مزمن یک ماده متسع کننده عروق مانند NO در محل التهاب تولید و ترشح می‌شود و به علت اثر اتساعی که روی عروق می‌گذارد، باعث می‌شود اثرات انقباضی فنیل افرین کمتر مشاهده شود که این احتمال در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت.

شواهدی وجود دارد که میزان تولید NO در بیماری‌های التهابی افزایش می‌یابد و در تخریب مفصل نقش دارد [۱۳]. همچنین مشاهده شده است که پاسخ ماهیچه صاف عروق به آگونیست‌های گیرنده‌های آلفا تحت تأثیر عوامل رها شده از آندوتلیوم عروق قرار می‌گیرد [۳، ۲]. بر این اساس، در این تحقیق برای بررسی این احتمال که آیا افزایش تولید NO در هنگام التهاب مزمن می‌تواند در کاهش پاسخ‌دهی عروق زانو به تحریک گیرنده‌های آلفا -۱ آدرنرژیک نقش داشته باشد یا خیر، در گروه‌های دیگری از موش‌های صحرایی از آمینوگوانیدین به عنوان مهار کننده برگشت ناپذیر iNOS استفاده شد. آمینوگوانیدین یک هیدرازین نوکلئوفیل است که به صورت برگشت ناپذیر باعث مهار آنزیم iNOS می‌شود [۲۹]. همان گونه که مشاهده شد، تجویز روزانه آمینوگوانیدین باعث شد که هم افزایش قطر و شدت التهاب کمتر شود و هم پاسخ انقباضی عروق به فنیل افرین به مقدار طبیعی برگردد به طوری که در گروه التهابی پاسخ‌دهی هر دو زانوی دریافت کننده CFA و مقابل در روزهای هفتم، چهاردهم و بیست و یکم با مقدار طبیعی تفاوت معنی‌دار ندارد.

بنابراین بر اساس این نتایج می‌توان استنباط نمود که به احتمال قوی یکی از عوامل کاهش پاسخ‌دهی عروق به فنیل افرین تولید و رهایش مقدار زیاد NO در اثر واکنش‌های التهابی است. همچنین علی رغم این که زانوی مقابل افزایش قطر نشان نمی‌دهد، نمی‌توان از آن به عنوان شاهد داخلی استفاده کرد. در مطالعات پیشین دیده شده بود که التهاب یک زانو می‌تواند به التهاب زانوی مقابل [۱٤] و افزایش محتوای نوروپپتیدهای التهاب‌زا در مایع مفصلی منجر شود [۱] که این امر می‌تواند باعث تغییر جریان خون پایه و تغییر پاسخ‌دهی عروق زانوی مقابل شود. در این مطالعه مشاهده شد که پاسخ‌دهی عروق زانوی مقابل حداقل تا سه هفته پس از تزریق، به طور قابل توجهی نسبت به پاسخ گروه شاهد کاهش می‌یابد. بدین ترتیب، دلیل قوی و مستقیم دیگری فراهم می‌شود که نمی‌توان از زانوی مقابل به عنوان شاهد استفاده نمود.

بنابراین به طور خلاصه می‌توان گفت که : پاسخ انقباضی عروق زانو در موش‌های صحرایی به فنیل افرین در شرایط التهاب مزمن در مقایسه با حیوانات سالم کاهش می‌یابد و این کاهش پاسخ‌دهی حداقل تا سه هفته پس از

تزریق CFA باقی می‌ماند. علاوه بر این، افزایش تولید و ترشح NO در شرایط التهاب مزمن، از یک طرف در تشدید واکنش‌های التهابی و از طرف دیگر به عنوان یک ماده متسع کننده عروق در کاهش پاسخ‌دهی عروق زانو به فنیل افرین می‌تواند نقش کلیدی داشته باشد

منابع

[1] Bilevicuite, I., Lundeberg, T., Ekblom, A., and Theodorsson, E., Bilateral changes of substance P-, neurokinin A-, calcitonin gene-related peptide and neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat knee joint synovial fluid during acute monoarthritis, ***Neuroscience Letters,*** 153 (1993) 37-40.

[2] Cocks, T. M., and Angus, J.A., Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin, ***Nature,*** 305 (1983) 627-630.

[3] Egleme, C., Godfraind, T., and Miller, R. C., Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of the endothelial cells, ***Br. J. Pharmacol.,*** 81 (1984) 16-18.

[4] Ferrell, W. R., and Khoshbaten, A., Adrenoceptor profile of blood vessels in the knee joint of the rabbit, ***J. Physiol.,*** 414 (1990) 377-383.

[5]. Ferrell, W. R. and Khoshbaten, A., Responses of blood vessels in the rabbit knee to electrical stimulation of the joint capsule, ***J. Physiol.,*** 423 (1990) 569-578.

[6] Ferrell, W. R., Khoshbaten, A., and Angerson, W. J., Responses of bone and joint blood vessels in cats and rabbits to electrical stimulation of nerves supplying the knee, ***J. Physiol.,*** 431 (1990) 677-687.

[7] Flavahan, N. A. & mcGrath, J. C., Demonstration of simultaneous alpha-1, alpha-2-, beta-1- and beta-2-adrenoceptor-mediated effects of phenylephrine in the cardiovascular system of the pithed rat, ***Br. J. Pharmacol.,*** 72 (1981) 585.

[8] Flavahan, N. A. & McGrath, J. C., Alpha-1 adrenoceptor activation can increase heart rate directly or decrease it indirectly through parasympathetic activation, ***Br. J. Pharmacol.,*** 77 (1982) 319-328.

[9] Gray, E., and Ferrell, W. R., Acute joint inflammation alters the adrenoceptor profile of synovial blood vessels in the knee joints of rabbits, ***Ann. Rheum. Dis.,*** 51 (1992) 1129-1133.

[10] Gerstberger, R., Nitric oxide and body temperature control, ***News in Physiological Sciences,*** 14 (1999) 30-36.

[11] Ialenti, A., Ianaro, A., Moncada, S., and Di Rosa, M., Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide, ***Eur. J. Pharmacol.,*** 211 (1992) 177-182.

[12] Karimian, S. M., McDougall, J. J., and Ferrel, W. R., Neuropeptidergic and autonomic control of the vasculature of the vasculature of the rat knee joint revealed by laser doppler perfusion imaging, ***Exp. Physiol.,*** 80 (1995) 341-348.

[13] Kaur, H., and Halliwell, B., Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation: nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients, ***FEBS Lett.,*** 350 (1994) 9-12.

[14] Kidd, B. L., Gibson, S. J., O'Higgins, F., Mapp, P. I., Polak, J. M., Buckland-Wright, J.C., and Blake, D. R., A neurogenic mechanism for symmetrical arthritis, ***Lancet,*** ii (1989) 1128-1130.

[15] Khoshbaten, A., and Ferrell, W. R., Pre-and postjunctional α-adrenoceptors in rabbit articular blood vessels, ***Med. J. Islamic Rep. Iran,*** 12 (1998) 153-157.

[16] Lam, F. Y., and Ferrell, W. R., CGRP modulates nerve-mediated vasoconstriction of rat knee joint blood vessels, ***Ann. New York Academy of Sciences,*** 657 (1992) 519-521.

[17] Lam, F. Y., and Ferrell, W. R., Acute inflammation in the rat knee joint attenuates sympathetic vasoconstriction but enhances

Downloaded from ppj.phypha.ir at 1:14 +0330 on Thursday March 4th 2021

Downloaded from ppj.phypha.ir at 1:14 +0330 on Thursday March 4th 2021

neuropeptide-mediated vasodilatation assessed by laser doppler perfusion imaging, ***Neuroscience,*** 52 (1993) 443-449.

[18] Liu, S. F., Crawley, D. E., Evans, T. W., and Barnes, P. J., Endogenous nitric oxide modulates adrenergic neural vasoconstriction in guinea-pig pulmonary artery, ***Br. J. Pharmacol.,*** 104 (1991) 565-569.

[19] MacDonald, A., Daly, C. J., Bulloch, J. M., and McGrath, J. C., Contributions of α_1-adrenoceptors, α_2-adrenoceptors and P_{2x}-purinoceptors to neurotransmission in several rabbit isolated blood vessels: role of neuronal uptake and autofeedback, ***Br. J. Pharmacol.,*** 105 (1992) 347-354.

[20] McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q., Nathan, C. F., and Wahl, S. M., Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase, ***J. Exp. Med.,*** 178 (1993) 749-754.

[21] McDougall, J. J., Karimian, S. M., and Ferrell, W. R., Alteration of substance P-mediated vasodilation and sympathetic vasoconstriction in the rat knee joint by adjuvant-induced inflammation, ***Neuroscience Lett.,*** 174 (1994) 127-129.

[22] McDougall, J. J., Karimian, S. M., and Ferrell, W. R., Prolonged alteration of vasoconstrictor and vasodilator responses in rat knee joints by adjuvant monoarthritis, ***Exp. Physiol.,*** 80 (1995) 349-357.

[23] McGrath, J. C., Evidence for more than one type of post-junctional alpha-adrenoceptor, ***Biochem. Pharmacol.,*** 31 (1982) 467-484.

[24] Moncada, S., Higgs, E. A., and Furchgott, R., XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research, ***Pharmacol. Rev.,*** 49 (1997) 137-142.

[25] Moncada, S., Palmer, R. M. J., and Higgs, E. A., Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, ***Pharmacol. Rev.,*** 43 (1991) 109-142.

[26] Najafipour, H., and Ferrell, W. R., Nitric oxide modulates sympathetic vasoconstriction and basal blood flow in normal and acutely inflamed rabbit knee joints, ***Exp. Physiol.,*** 78 (1993) 615-624.

[27] Pohl, U., and De Wit, C., A unique role of NO in the control of blood flow, ***News in Physiological Sciences,*** 14 (1999) 74-80.

[28] Snyder, S. H., and Bredt, D. S., Biological roles of nitric oxide, ***Scientific American,*** 5 (1992) 68-77.

[29] Wolf, D. J., and Lubeskie, A., Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase, ***Arch. Biochem. Biophys.,*** 316 (1995) 290-301.

[30] Yamaguchi, I., and Kopin I. J., Differential inhibition of α_1-adrenoceptor-mediated pressor responses in pithed rats, ***J. Pharmacol. Exp. Ther.,*** 214 (1980) 275-281.