



Inotropic and chronotropic effects of new cilostamide derivatives on isolated rat atria

Azar Hosseini¹, Reza Shafiee Nick^{1*}, Heydar Parsaee¹, Hamid Sadeghian²

1. Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Dept. Pharmacology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

2. Dept. laboratory Sciences, Paramedic School, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad-Iran

Received: 12 Apr 2011

Accepted: 4 Aug 2011

Abstract

Introduction: It was shown in a previous study, that MCPiP, a cilostamide derivative, increased atrial contraction force without changing contraction rate. To improve this property, two new derivatives of cilostamide were synthesized and their effects on PDE3 activity and isolated rat atria contraction were investigated.

Methods: The inhibitory effect of each compound on PDE3 enzyme was determined. Reserpine-treated rat atria were separated and suspended in an organ bath containing Krebs-Henseleit buffer. The effects of each compound alone or in combination with isoprenaline were assessed.

Results: Mc2 and mbc2 inhibited PDE3 activity with a potency lower than cilostamide, while they increased the contraction force with a higher efficacy (percentage higher than base line, cilostamide=19±3%, $P<0.05$, mc2= 43±7% and mbc2=34±5%, $P<0.001$). The effect of isoprenaline was potentiated by cilostamide and new compounds with different efficacies (mc2>mbc2>cilostamide). Atrial contraction rate was increased in the presence of cilostamide or isoprenaline, but was not changed with synthetic compounds. Furthermore, the effect of isoprenaline on the contraction rate was inhibited by synthetic compounds (percentage higher than base line, isoprenaline=68±9%, +mc2=6±5% and +mbc2=36±6%) and was not changed in the presence of cilostamide.

Conclusion: The synthetic compounds induced an increase in the atrial contraction force that was higher than cilostamide and was not correlated to their PDE3 inhibition. These compounds potentiated the effect of isoprenaline on the contraction force which excludes the possibility of their inhibitory effect on the receptor. In addition to PDE3 inhibition, other mechanisms are involved in producing the effects of these compounds, which are not clear and needs further investigation.

Key words: Phosphodiesterase, cilostamide, atria, rat, inotropic effect

* Corresponding author e-mail: shafieer@mums.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

اثرات اینوتروپیک و کرونوتروپیک مشتقات جدید سیلوستاماید بر دهلیز جدا شده موش صحرایی نر

آذر حسینی^۱، رضا شفیعی نیک^{۱*}، حیدر پارسایی^۱، حمید صادقیان^۲

۱. مرکز تحقیقات فارماکولوژیک گیاهان دارویی، گروه آموزشی فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد،

۲. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد،

پذیرش: ۱۳ مرداد ۹۰

دریافت: ۲۳ فروردین ۹۰

چکیده

مقدمه: در تحقیق قبلی MCPIP، یک مشتق سیلوستاماید، قدرت انقباضی دهلیز را بدون تغییر در سرعت ضربان افزایش داد. در جهت تقویت این مشخصه، دو مشتق جدید از سیلوستاماید سنتز و اثرات آنها بر مهار PDE3 و انقباضات دهلیز جدا شده از موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

روش ها: اثر مهاری هر ترکیب بر آنزیم PDE3 اندازه گیری شد. دهلیز از رت رزپینه جدا و در حمام بافت حاوی کربس قرار گرفت. اثر هر ترکیب به تنهایی یا توأم با ایزوپرنالین بررسی گردید.

یافته ها: mc2 و mbc2 با قدرت کمتری نسبت به سیلوستاماید سبب مهار آنزیم PDE3 شدند. در حالیکه قدرت انقباضی را بیشتر از سیلوستاماید افزایش دادند. (درصد افزایش نسبت به پایه، $\text{cilostamide} = 19 \pm 3\%$ ، $P < 0.05$ ، $\text{mc2} = 43 \pm 7\%$ و $\text{mbc2} = 34 \pm 5\%$ ، $P < 0.001$). اثر ایزوپرنالین توسط سیلوستاماید و ترکیبات جدید با شدت متفاوت تقویت شد ($\text{mbc2} < \text{mc2}$ سیلوستاماید). سیلوستاماید و ایزوپرنالین هر کدام به تنهایی سرعت ضربان دهلیز را افزایش دادند، اما ترکیبات سنتتیک تغییری در سرعت ضربان ایجاد نمودند. در حضور ترکیبات سنتتیک اثر ایزوپرنالین بر سرعت ضربان دهلیز مهار گردید (درصد افزایش نسبت به پایه: $\text{isoprenaline} = 68 \pm 9\%$ ، $\text{mc2} = 6 \pm 5\%$ و $\text{mbc2} = 36 \pm 6\%$) و افزایش سیلوستاماید تغییری در اثر ایزوپرنالین ایجاد نکرد.

نتیجه گیری: ترکیبات سنتتیک قدرت انقباضی دهلیز را بیشتر از سیلوستاماید افزایش دادند که با مهار PDE3 همبستگی ندارد. این ترکیبات قدرت انقباضی ایزوپرنالین را تقویت نمودند لذا اثر مهاری آنها بر ضربان دهلیز مستقل از مهار گیرنده است و مکانیسمهای دیگری علاوه بر مهار PDE3 در ایجاد این اثرات نقش دارند که بررسی دقیق آنها مستلزم تحقیقات بیشتر می باشد.

واژه های کلیدی: فسفودی استراز، سیلوستاماید، دهلیز، موش صحرایی، اثر اینوتروپیک

مقدمه

و متابولیسم را تنظیم می کند [۲]، غلظت داخل سلولی cAMP برآیندی از سرعت سنتز آن توسط آدنیلیل سیکلاز و هیدرولیزش توسط آنزیمهای فسفودی استراز (PDEs) می باشد [۷]. داروهای محرک آدنیلیل سیکلاز (مثل β_1 -آگونیستها، گلوکاگون و فورسکولین) و داروهای مهارکننده PDE (مثل سیلوستاماید و متیل گزانترینها) با افزایش cAMP موجب افزایش قدرت انقباضی و سرعت ضربان قلب می شوند

آدنوزین منو فسفات حلقوی (cAMP) بسیاری از روندهای مهم سلولی از جمله رشد، تقسیم و تمایز سلولی، انقباضات قلبی

shafieer@mums.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

جدول ۱- ساختمان مشتقات صنعتی سیلوستاماید به عنوان مهار کننده انتخابی آنزیم PDE3

Test compound	Chemical name	Structural formula
Cilostamide	4-(1,2-dihydro-2-oxoquinolin-6-yloxy)-N-cyclohexyl-N-methylbutanamide	
mc2	6-(4-(4-methylpiperidin-1-yl)-4-oxobutoxy)-4-methylquinolin-2(1H)-one	
mbc2	4-Methyl-6-({3-[(4-methylpiperidino)carbonyl]-benzyl}oxy)-1,2-dihydro-2quinolinone	

[۱۷۱۰].

می باشد. مطالعات نشان داده که تجویز خوراکی سیلوستاماید در رتی که دیواره عروقی آن به وسیله بالون آسیب دیده و دچار هیپرپلازی دیواره شده است، باعث سرکوب تکثیر پوشش عروقی می شود [۱۵].

همچنین سیلوستاماید نیز مانند سایر مهارکننده های فسفودی استراز نوع ۳ دارای خاصیت آنتی ترومبوتیک و آنتی اینتیمال می باشد [۲۶]، اما استفاده کلینیکی از آن به دلیل عارضه تاکی کاردی محدود شده است. بنابراین در مطالعات گوناگون، مشتقات جدید از سیلوستاماید سنتز شده تا بتوانند به ترکیبی دست یابند که علاوه بر داشتن خواص سیلوستاماید، عوارض آن را کمتر یا نداشته باشد. بر اساس ساختمان سیلوستاماید با استفاده از نرم افزارهای clustaX 1.81، chem3D professional و AutoDockTools ترکیبات دارای بیشترین تمایل اتصال به جایگاه فعال آنزیم PDE3A طراحی، انتخاب و سنتز گردیدند [۲۵].

در مطالعه قبلی نشان داده شد در بین داروهای سنتز شده جدید، ترکیب MCPIP (6-(4-(4-methylpiperazine-1-yl)-4-methyl quinolin-2(1H)-one) بیشترین اثر افزایش قدرت انقباضی را ایجاد کرد. بعلاوه این ترکیب قدرت انقباضی ایزوپرنالین را افزایش داد بدون اینکه تغییری در سرعت ضربان دهلیز ایجاد شده با ایزوپرنالین ایجاد کند [۲۰]. با استفاده از

تا کنون ۱۱ خانواده PDE شناسایی [۴] و بر اساس ساختمان ملکولی و مترادف اسیدهای آمینه، خصوصیات کاتالیتیکی و سوبسترا، نوع سلول، نحوه تنظیم و حساسیتشان نسبت به مهارکننده های انتخابی و خواص فارماکولوژیک دسته بندی شده اند (PDE1، PDE2،، PDE11) [۶]. نقش این آنزیمها در قلب کاملاً شناخته شده است. از بین ۱۱ خانواده PDE تنها انواع PDE2، PDE3، PDE4 و PDE5 در میوسیت های قلبی فعالیت دارند و در بین این آنزیمها، PDE3 نقش مهمتری در تنظیم عملکرد قلب دارد [۲۴]. مهارکننده های انتخابی PDE3 با افزایش غلظت cAMP قدرت انقباضی قلب را تقویت می نمایند [۱۹]. از بین این ترکیبات، تجویز وریدی آمینون، میلرینون، انوکسیمون به عنوان داروهای تقویت کننده قدرت انقباضی قلب در درمان کوتاه مدت نارسایی احتقانی توسط سازمان غذا و دارو آمریکا تأیید شده اند [۵] و [۱۸]. تجویز خوراکی این داروها به عنوان جایگزین برای دیگوسکین قبلاً مطرح شده است ولیکن بدلیل افزایش میزان مرگ و میر کاربرد این داروها محدود گردید [۳]. جستجو جهت یافتن ترکیباتی که در نارسایی احتقانی قلب بتوانند جایگزین دیگوسکین شوند ادامه دارد. سیلوستاماید به عنوان مهار کننده قوی PDE3 دارای اثرات مفیدی در سیستم قلب و عروق

تغییرات در ضربان و قدرت انقباضی دهلیز در مانیتور قابل مشاهده و به صورت دیجیتالی ذخیره گردید. در هر آزمایش میزان کشش وارد شده به بافت نیم گرم تنظیم شد، پس از مدت ۴۰-۶۰ دقیقه (زمان رسیدن انقباضات به حالت تعادل)، دارو با غلظت ۱۰۰ میکرومول اضافه گردید (شایان ذکر است در تحقیقات قبلی اثر غلظتهای ۱-۱۰۰۰ میکرومول مشتقات سیلوستاماید بررسی شد که، بهترین پاسخ در غلظت ۱۰۰ بدست آمد) [۲۰]. جهت رسیدن به حداکثر اثر دارو، بافت به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ذکر شده ثابت باقی ماند، سپس غلظتهای تجمعی از ایزوپرنالین (10^{-6} - 3×10^{-10}) به محیط انکوبیشن اضافه شد. در هر نمونه، سرعت ضربان دهلیز و میانگین قدرت انقباضی در مدت زمان یک دقیقه از منحنی حالت پایدار (Steady state) محاسبه گردید. هر آزمایش ۶ تا ۷ بار تکرار شد. تمام داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (SEM) بیان گردید. برای تعیین تفاوت بین گروه ها، از آزمون آماری ANOVA یک طرفه و به دنبال آن تست Tukey استفاده شد. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار آماری در نظر گرفته شد. بررسی میزان مهار PDE3 توسط ترکیبات mc2، mbc2 و سیلوستاماید به وسیله شرکت San Diego, United States Bioscience Inc, با استفاده از کیت اندازه گیری فعالیت فسفودی استراز (Progressive Binding Kit IMAP TR-FRET شرکت R8160, Sunnyvale, CA. Molecular Devices) انجام گردید. به طور خلاصه به مخلوط حاوی IMAP immobilized metal high affinity binding (phosphate)، FAM-cAMP (آدنوزین منوفسفات حلقوی نشان دار شده با ماده فلورسانس)، 100nM سوپسترا (cAMP) و آنزیم PDE3A ترکیب مورد آزمایش با غلظت های مورد نظر اضافه گردید. مخلوط در دمای اتاق به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد. سپس واکنش متوقف و شدت فلورسانس توسط دستگاه BioTek SynergyTM 2 microplate reader اندازه گیری گردید.

یافته ها

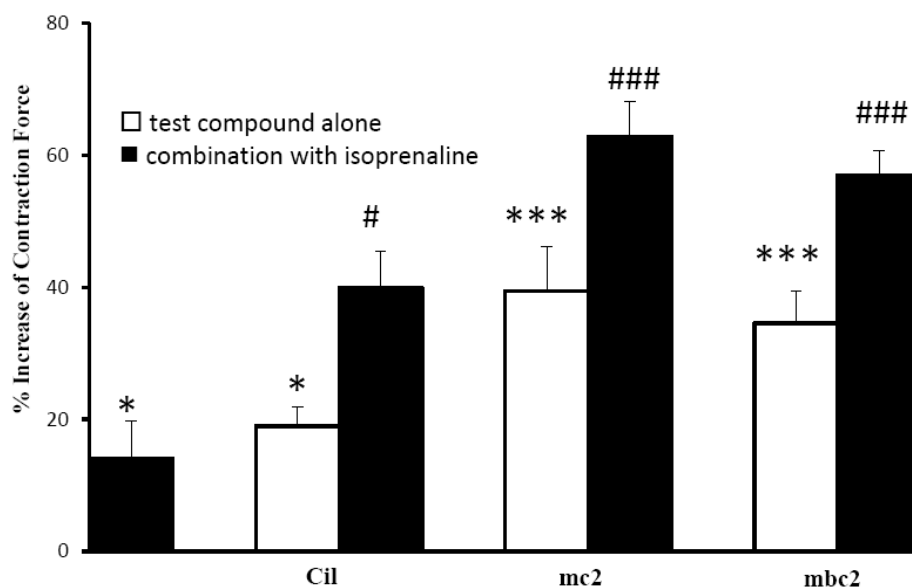
تغییرات قدرت انقباضی: ایزوپرنالین میانگین قدرت انقباضی

این تجربه، دو ترکیب دیگر با نامهای اختصاری mc2 و mbc2 (جدول ۱) سنتز و اثرات مهاری آنها بر PDE3 و اثراتشان بر قدرت انقباضی و سرعت ضربان دهلیز به تنهایی و در حضور ایزوپرنالین بررسی و با سیلوستاماید مقایسه گردید.

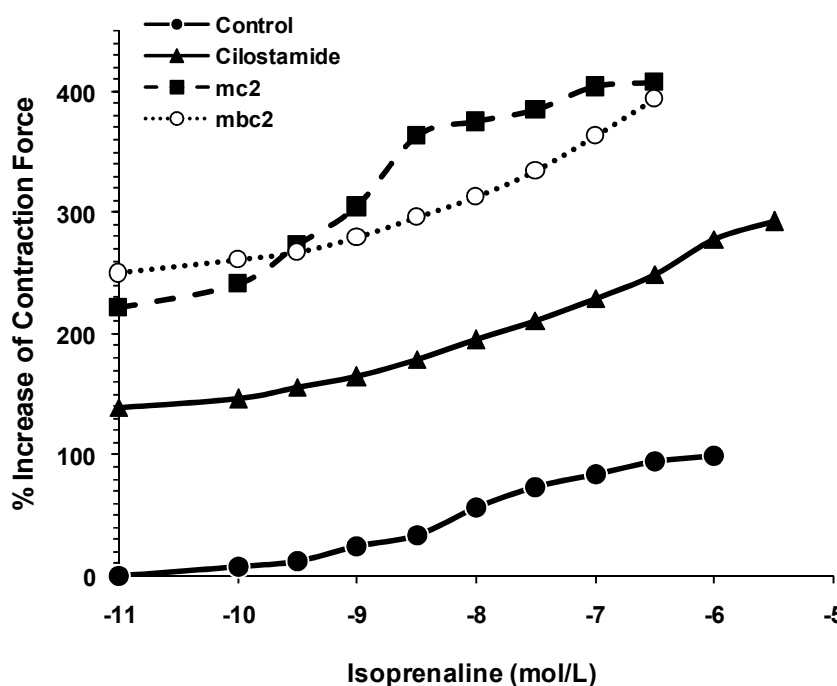
مواد و روش ها

سدیم تیوپنتال از کمپانی GmbH, Vienna Austria Biochemic، دی متیل سولفوکساید (DMSO) از شرکت فلوکا، رزپین و ایزوپرنالین هیدروکلراید از شرکت سیگما تهیه شدند. ایزوپرنالین در آب مقطر حاوی ۱٪ ویتامین ث حل شده و در حین آزمایش توسط محلول کربس ۱۰ میلی مولار گلوکز (حاوی NaCl 118, KCl 4.5, CaCl₂ 1.36, MgSO₄ 1.2, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25 شرکت Merck) تا غلظت مورد نظر رقیق گردید. ترکیبات سنتز شده نیز در DMSO حل گشته و با محلول کربس تا غلظت مورد نظر رقیق شدند.

در این مطالعه موشهای صحرایی نر از نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم استفاده گردید که در اتاق حیوانات دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد با شرایط تهویه مناسب، رطوبت ۵۰ درصد، دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد، سیکل نوری ۱۲ ساعته و با دسترسی آزاد به آب و غذای کافی نگهداری می شدند. به منظور جلوگیری از تداخل کاتکولامین های اندوژن، یک روز قبل از آزمایش، به هر حیوان یک دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم [۲۱] رزپین به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. در روز بعد حیوان با تزریق داخل صفاقی سدیم تیوپنتال (۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش گردیده و پس از باز نمودن قفسه سینه، قلب جدا و در محلول کربس قرار داده شد. دهلیز بطور کامل از بقیه قسمتهای قلب جدا و در حمام بافت حاوی ۵۰ میلی لیتر کربس با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH=7.4 ثابت گردید. در طی آزمایش محلول بطور یکنواخت توسط اکسیژن ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵٪ گاز داده می شد [۸]. جهت ثبت قدرت انقباضی و سرعت ضربان دهلیز از دستگاه power lab 8/30 همراه با تقویت کننده (amplifier) و ترانسادیوسر ایزومتریک (isometric transducer) با حساسیت صفر تا ۲۵ گرم استفاده گردید.



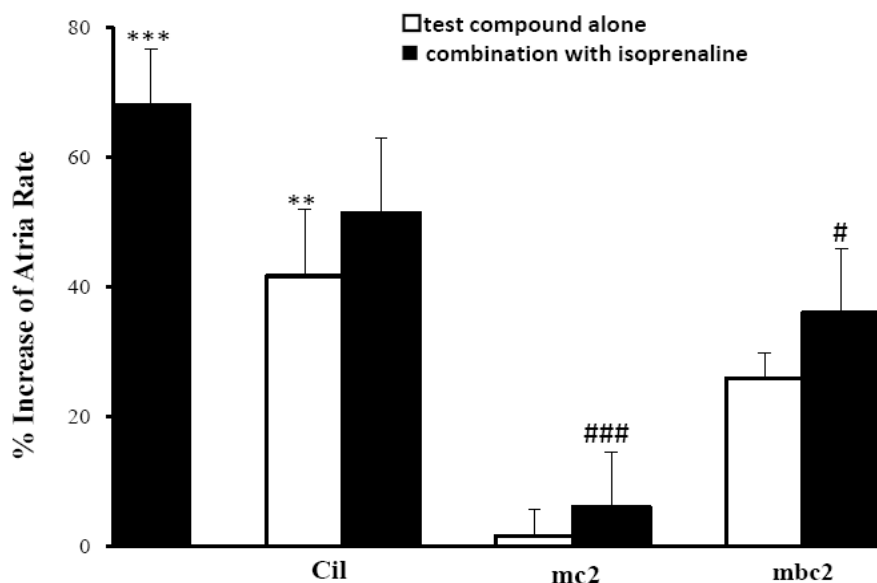
شکل ۱- مقایسه اثر ماکزیمم هر ترکیب به تنهایی و در ترکیب با ایزوپرنالین بر قدرت انقباضی دهلیز، دهلیز رت کاملاً جدا و در حمام بافت قرار داده شد. کشش اولیه دهلیز در حضور حلال (495 ± 2 میلی گرم) تنظیم گردید. قدرت انقباضی در حضور ۱ میکرومولار ایزوپرنالین به تنهایی و همراه با ۱۰۰ میکرومولار Cilostamide (cil)، mc2 یا mbc2 ثبت گردید. هر ستون بیانگر میانگین قدرت انقباضی دهلیز برای هر ترکیب به تنهایی یا ترکیب با ۱ میکرومولار ایزوپرنالین (ISO) $\pm$ خطای استاندارد ۷ آزمایش می باشد. (*) تفاوت قدرت انقباضی در حضور هر ترکیب با حالت پایه: ($P < 0.05$), (***) ($P < 0.001$), (#) تفاوت قدرت انقباضی در حضور ایزوپرنالین به تنهایی و همراه با ترکیبات مورد آزمایش، (#) ($P < 0.05$), (###) ($P < 0.001$)



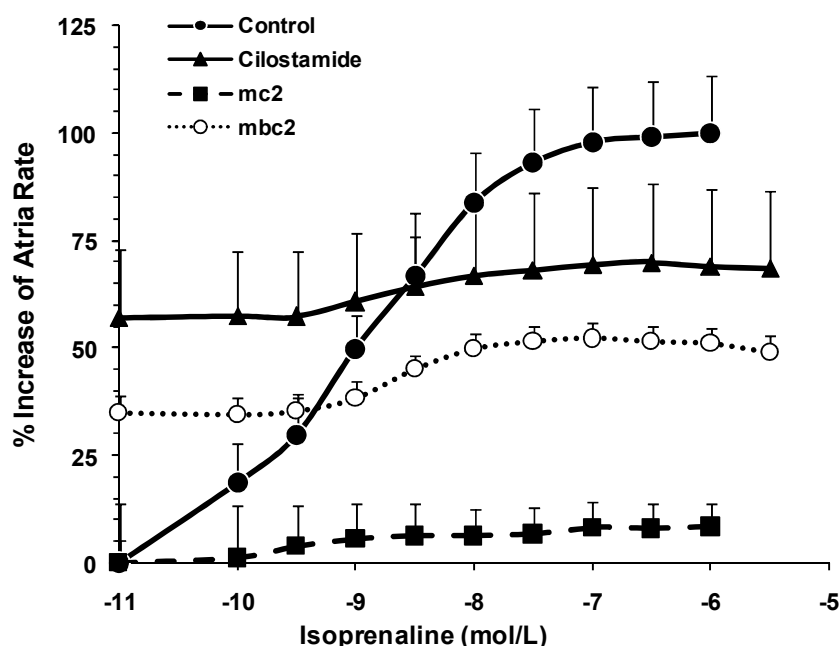
شکل ۲- تغییرات منحنی دوز-پاسخ ایزوپرنالین بر قدرت انقباضی در حضور ترکیبات سنتتیک، دهلیز رت کاملاً جدا و در حمام بافت قرار گرفت. سپس غلظت ۱۰۰ میکرومولار از ترکیبات مورد آزمایش اضافه گردید. پس از ۲۰ دقیقه غلظتهای تجمعی از ایزوپرنالین (10^{-6} تا 10^{-11}) اضافه شد و تغییرات منحنی ایزوپرنالین بر قدرت انقباضی در حضور هر ترکیب ثبت گردید. هر نقطه میانگین ۷ آزمایش $\pm$ خطای استاندارد می باشد.

سیلوستامید در غلظت ۱۰۰ میکرومولار میانگین قدرت انقباضی را $19 \pm 3\%$ افزایش داد (شکل ۱)، در حضور سیلوستامید غلظتهای تجمعی ایزوپرنالین اضافه گردید. در این

را به صورت وابسته به دوز افزایش داد. در غلظت 10^{-10} مولار اثر دارو آغاز و در غلظت 10^{-6} مولار به حدکثر اثر رسید که $14 \pm 6\%$ بیشتر از حد پایه بود (شکل ۱ و ۲).



شکل ۳- مقایسه اثر ماکزیمم هر ترکیب به تنهایی و در ترکیب با ایزوپرنالین بر سرعت ضربان دهلیز، دهلیز رت کاملاً جدا و در حمام بافت قرار داده شد. ضربان دهلیز در غیاب دارو طی ۴۰ دقیقه به حالت تعادل رسید (210 ± 3 ضربان در هر دقیقه). سرعت ضربان دهلیز در حضور ۱ میکرومولار ایزوپرنالین به تنهایی و همراه با ۱۰۰ میکرومولار، $mc2$ یا $mbc2$ ثبت گردید. هر ستون بیانگر میانگین سرعت ضربان دهلیز برای هر ترکیب به تنهایی یا ترکیب با ۱ میکرومولار ایزوپرنالین ($ISO \pm$ خطای استاندارد ۷ آزمایش می باشد). (*) تفاوت سرعت ضربان دهلیز در حضور هر ترکیب با حالت پایه: (** $P < 0.01$ ، *** $P < 0.001$ ، #) تفاوت سرعت ضربان دهلیز در حضور ایزوپرنالین به تنهایی و همراه با ترکیبات مورد آزمایش، (# $P < 0.05$ ، ### $P < 0.001$)

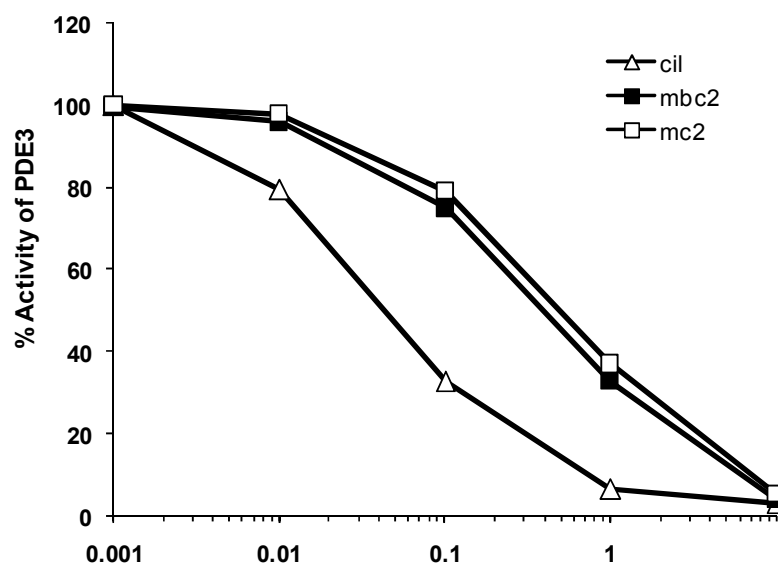


شکل ۴- تغییرات منحنی دوز-پاسخ ایزوپرنالین بر سرعت ضربان دهلیز در حضور ترکیبات سنتتیک، دهلیز رت جدا و در حمام بافت قرار گرفت. سپس غلظت ۱۰۰ میکرومولار از ترکیبات مورد آزمایش اضافه گردید. پس از ۲۰ دقیقه غلظتهای تجمعی از ایزوپرنالین (10^{-6} - 10^{-1}) اضافه شد و تغییرات منحنی ایزوپرنالین بر سرعت ضربان دهلیز در حضور هر ترکیب ثبت گردید. هر نقطه میانگین ۷ آزمایش $\pm$ خطای استاندارد می باشد.

قرار گرفتند. اضافه نمودن ۱۰۰ میکرومولار $mbc2$ به حمام بافت، قدرت انقباضی را $34 \pm 5\%$ افزایش داد (شکل ۱) و پس از ۲۰ دقیقه با اضافه نمودن ایزوپرنالین قدرت انقباضی تقویت شده و در غلظت 10^{-6} مولار به ماکزیمم اثر که $57 \pm 4\%$ بالاتر

حالت اثر ایزوپرنالین توسط سیلوستاماید تقویت شده و میانگین ماکزیمم قدرت انقباضی به $40 \pm 6\%$ بیشتر از حد پایه رسید (شکل ۱ و ۲).

طبق روش فوق الذکر، اثر ترکیبات سنتتیک مورد بررسی



شکل ۵- اثر مهارى تركيبات مورد آزمایش بر فعاليت PDE3، غلظت های مختلف هر ترکیب مورد آزمایش (cilostamide (cil) و mc2 و mbc2) به مخلوط 100 nM سوبسترا (cAMP) همزه با نوکلئوتید نشان دار، IMAP و آنزیم PDE3A اضافه شد. مخلوط در دمای اتاق به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد. سپس واکنش متوقف و شدت فلورسانس نمونه ها اندازه گیری شد. هر نقطه نشان دهنده میانگین فعاليت آنزیم دو نمونه می باشد.

ترکیب با ایزوپرنالین اثر تحرکی ایزوپرنالین بر سرعت ضربان دهلیز را مهار نمود (شکل ۴۳).

اندازه گیری مهار فعاليت PDE3: اثر غلظت های متفاوت سیلوستاماید و ترکیبات سنتتیک mc2 و mbc2 بر فعاليت PDE3 اندازه گیری گردید. سیلوستاماید در غلظت ۱۰ میکرومولار بیش از ۹۵٪ آنزیم PDE3A را مهار نمود و دارای $IC_{50}=0.05\mu M$ بود. ترکیبات سنتتیک mc2 و mbc2 تقریباً مشابه یکدیگر سبب مهار آنزیم شدند ($IC_{50}: mc2=0.5, mbc2=0.42\mu M$). نتایج نشان داد که در مقایسه با سیلوستاماید دو ترکیب سنتتیک با قدرت اثر کمتری سبب مهار آنزیم شدند (شکل ۵).

بحث

در این مطالعه نشان داده شد، در دهلیز جدا شده رت اثر اینوتروپیک ترکیبات سنتز شده بیشتر از سیلوستاماید می باشد ولی این اثر ارتباط منطقی با اثر مهارى این ترکیبات بر فعاليت PDE3 ندارد. چون قدرت مهارى mc2 و mbc2 بر PDE3 کمتر از سیلوستاماید می باشد. بعلاوه سیلوستاماید و ایزوپرنالین نیز هر کدام به تنهایی سرعت ضربان دهلیز را افزایش دادند ولیکن در حضور سیلوستاماید، افزودن ایزوپرنالین اثر اضافی بر

از حد پایه بود، رسید (شکل ۲۱). در حالیکه mc2 قدرت انقباضی را به تنهایی $43\pm 7\%$ (شکل ۱) افزایش داد. در حضور این ترکیب قدرت انقباضی توسط ایزوپرنالین تقویت شد و در غلظت 10^{-6} مولار ایزوپرنالین قدرت انقباضی به $63\pm 5\%$ بالاتر از حد پایه رسید (شکل ۲۱).

تغییرات ضربان دهلیز: اضافه نمودن ایزوپرنالین سرعت ضربان دهلیز را به صورت وابسته به دوز افزایش داد. این اثر در غلظت 10^{-10} مولار دارو آغاز و در غلظت 10^{-6} مولار به حدکثر اثر که $68\pm 9\%$ بیشتر از حد پایه بود، رسید (شکل ۴).

سیلوستاماید در غلظت ۱۰۰ میکرو مولار سرعت ضربان دهلیز را $42\pm 10\%$ افزایش داد (شکل ۳)، اضافه کردن غلظتهای تجمعی ایزوپرنالین (10^{-6} تا 10^{-1}) تغییری در سرعت ضربان دهلیز ایجاد نکرد (شکل ۴۳).

اضافه کردن ۱۰۰ میکرومولار mbc2 به حمام بافت سرعت ضربان دهلیز را افزایش نداد (شکل ۳) جالب توجه اینکه اضافه نمودن غلظتهای تجمعی ایزوپرنالین (10^{-6} تا 10^{-1}) تغییری در سرعت ضربان دهلیز ایجاد نکرد. به عبارت دیگر mbc2 سرعت ضربان دهلیز تحریک شده با ایزوپرنالین را مهار نمود (شکل ۴۳).

mc2 در غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیز به تنهایی سرعت ضربان دهلیز را افزایش نداد (شکل ۳) و مشابه اثر mbc2 در

داروها در ایجاد سینرژیسم با ایزوپرنالین ارتباطی با تفاوت قدرت آنها در مهار آنزیم PDE3 نداشته و مکانیسمهای احتمالی دیگری موجب این اختلاف اثر شده اند.

غلظت cAMP در کنترل ضربان دهلیز از اهمیت بالایی برخوردار است. به طوریکه افزایش آن در گره سینوسی-دهلیزی سبب افزایش ضربان می گردد [۲۸]. لذا انتظار می رود تجویز توأم یک بتا-آگونیست و یک مهار کننده PDE اثر سینرژیسم در تحریک ضربان دهلیز ایجاد کنند. در این تحقیق سیلوستاماید به تنهایی سرعت ضربان دهلیز را افزایش داد ولی اثر ایزوپرنالین بر سرعت ضربان دهلیز را تقویت نمود. این اثر منحصر به سیلوستاماید نبوده و در مورد دیگر مهار کننده های PDE قبلاً نشان داده است. سیلوستاماید و رولپیرام (مهار کننده انتخابی PDE4) هر کدام به تنهایی ضربان دهلیز را به ترتیب در خرگوش و رت افزایش می دهند، اما تجویز توأم هر کدام از آنها با یک بتا آگونیست سبب تقویت بیشتر ضربان دهلیز نمی شود، درحالیکه داروهای مذکور افزایش قدرت انقباضی ناشی از بتا-آگونیست را تقویت می نماید [۹]. علت عدم تقویت ضربان دهلیز تحریک شده در حضور بتا-آگونیست توسط سیلوستاماید یا رولپیرام مشخص نیست ولی در این مورد احتمال وجود دو فضای متفاوت در گره سینوسی-دهلیزی برای cAMP فرض شده است. به عبارت دیگر بخشی که فعالیت PDE3 غلظت cAMP را کنترل می کند از بخشی که فعالیت بتا-آگونیست موجب افزایش cAMP در آن می شود، جدا می باشد [۱۶]. این اثر در مورد آمینون نیز مشاهده گردیده است بطوریکه آمینون قدرت انقباضی ایزوپرنالین را تقویت نموده بدون اینکه تغییری در ضربان قلب افزایش یافته توسط ایزوپرنالین ایجاد نماید [۱۳].

ولی نکته قابل توجه در مورد دو ترکیب سنتز شده (mc2 و mbc2) اینست که این داروها گرچه قدرت انقباضی را افزایش دادند و این اثر توسط ایزوپرنالین تقویت گردید ولی هر کدام به تنهایی نتوانستند سرعت ضربان دهلیز را افزایش دهند و اثر ایزوپرنالین در تحریک سرعت ضربان دهلیز را مهار نمودند. با توجه به اینکه این ترکیبات اثر ایزوپرنالین بر قدرت انقباضی را تقویت نمودند پس احتمال اثر آنتاگونیستی آنها بر رستپورهای بتا رد می گردد، و باید نتیجه گرفت که مکانیسم اثرات مهار کننده های انتخابی PDE3 بر دهلیز پیچیده بوده و بعضی

سرعت ضربان دهلیز ایجاد نکرد. ترکیبات سنتز شده به تنهایی سرعت ضربان دهلیز را افزایش ندادند و جالب اینکه در حضور این ترکیبات اثر کرونوتروپیک ایزوپرنالین مهار شد.

افزایش cAMP در قلب سبب افزایش قدرت انقباضی و ضربان قلب می گردد. فعال کننده های آدنیلیل سیکلاز (مثل گلوکاگون و فورسکولین)، مهار کننده های غیر انتخابی PDE (مثل تئوفیلین) و داروهای مهار کننده انتخابی PDE3 (میلرینون و سیلوستاماید) با افزایش cAMP موجب تقویت قدرت انقباضی و افزایش سرعت ضربان قلب می شوند [۲۷]. از بین ۱۱ خانواده PDE در قلب ۵ نوع ایزوآنزیم (PDE1 - PDE5) وجود دارند که در کنترل سیگنالینگ cAMP، PDE3 و PDE4 از اهمیت بیشتری برخوردار هستند [۲۴]. بعضی از مهار کننده های انتخابی PDE3 (میلرینون و آمینون) جهت درمان اورژانس نارسایی احتقانی قلب تأیید شده اند [۱، ۲، ۱۱]. ولی سیلوستاماید، با وجود اینکه اثرات درمانی مهمی مانند تقویت قدرت انقباضی قلب، اتساع عروق و کاهش تجمع پلاکتی را دارد، اما استفاده کلینیکی از آن در درمان نارسایی احتقانی به دلیل عارضه افزایش ضربان قلب محدود شده است [۶، ۱۲].

در این تحقیق جهت بررسی وجود اثر سینرژیسم احتمالی بین ترکیبات سنتز شده (مهار کننده PDE3) و یک بتا-آگونیست (محرک آدنیلیل سیکلاز)، در انکوبیشن حاوی هر کدام از این داروها، ایزوپرنالین با دوز تجمعی اضافه شد. ایزوپرنالین موجب تقویت افزایش قدرت انقباضی دهلیز ناشی از هر کدام از مهار کننده های PDE شد ولی این شدت تقویت اثر متناسب با قدرت اثر مهاری آنها بر PDE3 نبوده و تقویت اثر بصورت $mc2 < mbc2$ سیلوستاماید ایجاد شد. چون با توجه به IC_{50} هر کدام از داروهای مذکور در مهار PDE3 می توان گفت قدرت مهاری mc2 و mbc2 در مهار PDE3 تقریباً مشابه یکدیگر و ده برابر کمتر از سیلوستاماید است. معذالک باید توجه داشت غلظت این داروها در محیط انکوبیشن ۱۰۰ میکرومولار بوده که در مورد سیلوستاماید دو هزار برابر و در مورد داروهای سنتز شده دویست برابر IC_{50} آنها (غلظتی که در آن ۵۰٪ فعالیت آنزیم PDE3 مهار می شود) می باشد. لذا در این غلظت فعالیت آنزیم PDE3 بطور کامل توسط هر سه دارو بلوک شده است و می توان نتیجه گرفت که تفاوت اثر این

ایزوپرنالین را مهار نمودند. مکانیسم اثر مهاری این داروها بر سرعت ضربان دهلیز متفاوت از مکانیسم اثر آنها در تقویت قدرت انقباضی می باشد. با توجه به اثر افزایشده قدرت انقباضی که همراه با مهار ضربان دهلیز تحریک شده توسط سیستم سمپاتیک می باشد، می توان گفت که این داروها اثرات مناسبی جهت درمان بیماران دچار نارسایی قلبی دارند. درک مکانیسم دقیق این ترکیبات در تقویت قدرت انقباضی و مهار ضربان دهلیز نیاز به بررسی بیشتر دارد.

سپاسگزاری

در پایان، نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که حمایت مالی این تحقیق را بر عهده داشتند، اعلام می نمایند.

References

- [1] Ahlstrom MEB, Cyclic nucleotide inactivation in osteoblasts and osteosarcoma cell lines. *Cell Mol Biol Lett* 11 (2001) 205-19.
- [2] Ahlstrom MEB, Pekkinen M, Huttunen M, Lamberg AC, Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) in human osteoblastic cells: the effect of PDE inhibition on cAMP Accumulation. *Cell Mol Biol Lett* 10 (2005) 305-19.
- [3] Bekhit A, Baraka AM, Novel milrinone analogs of pyridine-3-carbonitrile derivatives as promising cardiotonic agents. *Eur J Med Chem* 40 (2005) 1405-1413.
- [4] Bender AT, Beavo JA, Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58 (2006) 488-520.
- [5] Candia M, Fossa P, Cellamare S, Mosti L, Carotti A, Altomare C, Insights into structure-activity relationships from lipophilicity profiles of pyridin-2(1H)-one analogs of the cardiotonic agent milrinone. *Eur J Pharm Sci* 26 (2005) 78-86.
- [6] Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY, Jin C, Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol*

اثرات این داروها مستقل از افزایش cAMP در میوسیت ها می باشد.

یکی از مکانیسمهای مطرح شده درمورد ترکیبات مهارکننده PDE3، اثر این داروها در تغییر فعالیت کانالهای یونی می باشد. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که بعضی از مهارکننده های PDE3 مشتق شده از کینولینون (OPC-8212 و OPC-8490) بر روی کانالهای پتاسیم اثر مهاری داشته و این ترکیبات با اینکه قدرت انقباضی را افزایش دادند اما تغییری در ضربان قلب ایجاد نمی نمایند [۱۴، ۲۲، ۲۳]. بنابراین اثرات انتخابی این داروها بر روی بعضی از کانال های یونی می تواند موضوع مطالعات آینده باشند.

ترکیبات جدید mc2 و mbc2 به تنهایی و در ترکیب با ایزوپرنالین قدرت انقباضی دهلیز را بیشتر از سیلوستاماید افزایش دادند. این ترکیبات به تنهایی سرعت ضربان دهلیز را تغییر ندادند و در ترکیب با ایزوپرنالین ضربان تحریک شده با

- Chem* 278 (2003) 5493-6.
- [7] Fischmeister R, Castro L, Abi-Gerges A, Rochais F, Jonas Jurevicius, Leroy J, Vandecasteele G, Compartmentation of Cyclic Nucleotide Signaling in the Heart: The Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *Circ Res* 99 (2006) 816-828.
- [8] Fossa P, Menozzi G, Dorigo P, Floreanib M, Mosti L, Synthesis and pharmacological characterization of functionalized 2-pyridones structurally related to the cardiotonic agent milrinone. *Bioorg Med Chem* 11 (2003) 4749-59.
- [9] Galindo-Tovar A, Vargas ML, Kaumann AJ, Phosphodiesterases PDE3 and PDE4 jointly control the inotropic effects but not chronotropic effects of (-)-CGP12177 despite PDE4-evoked sinoatrial bradycardia in rat atrium. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 379 (2009) 379-84.
- [10] Gonzalez-Munoz C, Nieto-Cerón S, Cabezas-Herrera J, Hernández-Cascales J, Glucagon increases contractility in ventricle but not in atrium of the rat heart. *Eur J Pharmacol* 587 (2008) 243-47.
- [11] Hamada Y, Kawachi K, Nakati T, Tsunooka N, Effects of a phosphodiesterase 3 inhibitor on circulating blood volum after cardiopulmonary bypass. *Heart Vessels* 15 (2000) 70-3.

- [12] Hidaka H, Hayashi H, Kohri H, Kimura Y, Hosokawa T, Igawa T, Saitoh Y, Selective inhibitor of platelet cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase, cilostamide, inhibits platelet aggregation. *J Pharmacol Exp Ther* 211(1979) 26–30.
- [13] Honerjager P, Schafer-Korting M, Reiter M, Involvement of cyclic AMP in the direct inotropic action of amrinone. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 318 (1981) 112-120.
- [14] Iijima T, Taira N, Membrane current changes responsible for the positive inotropic effect of OPC 8212, a new positive inotropic agent, in single ventricular cells of the guinea pig heart. *J Pharmacol Exp Ther* 240 (1987) 657-62.
- [15] Inoue Y, Toga K, Sudo T, Tachibana K, Tochizawa S, Kimura Y, Suppression of arterial intimal hyperplasia by cilostamide, a cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 inhibitor, in a rat balloon double-injury model. *Br J Pharmacol* 130 (2000) 231-41.
- [16] Kaumann AJ, Galindo-Tovar A, Escudero E, Vargas ML, Phosphodiesterases do not limit β 1-adrenoceptor-mediated sinoatrial tachycardia: evidence with PDE3 and PDE4 in rabbits and PDE1–5 in rats. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 380 (2009) 421–30.
- [17] Lai N, Tang T, Gao M H, Saito M, Takahashi T, Roth DM, Hammond H, Activation of Cardiac Adenylyl Cyclase Expression Increases Function of the Failing Ischemic Heart in Mice. *J Am Coll Cardiol* 51 (2008)1490-97.
- [18] Lowes B D, Higginbotham M, Petrovich L, DeWood MA, Low-Dose Enoximone Improves Exercise Capacity in Chronic Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 36 (2000) 501-8.
- [19] Luginier C, Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 109 (2006) 366 –98.
- [20] Mansouri SMT, Shafiee-Nick R, Parsaee H, Seyedi SM, Saberi MR, Sadeghian H, Inotropic and Chronotropic Effects of 6-Hydroxy-4- Methylquinolin-2(1H)-One Derivatives in Isolated Rat Atria. *Iran Biomed J* 12 (2008) 77-84.
- [21] Martinez E, Penaafiel R, Collado MC, Hernandez J, Diazepam potentiates the inotropic effect of isoprenaline in rat ventricle strips: role of cyclic AMP. *Eur J Pharmacol* 282 (1995) 169-75.
- [22] Momose Y, Sasayama S, Effect of OPC-8490 on the membrane potentials and membrane currents of single guinea-pig myocytes. *Cardiovasc Drugs Ther* 4 (1990) 713-7.
- [23] Mori T, Yamashita S, Hosokawa T, Yabuuchi Y, Cardiovascular effects of OPC-8490, a new positive inotropic agent with vasodilator action. *Jpn J Pharmacol* 46 (1988) 130.
- [24] Osadchii O E, Myocardial Phosphodiesterases and Regulation of Cardiac Contractility in Health and Cardiac Disease. *Cardiovasc Drugs Ther* 21 (2007) 171–94.
- [25] Sadeghian H, Seyedi M, Saberi MR, Shafiee –Nik R, Hosseini A, Mansouri M, Parsaee H, Design, synthesis and pharmacological evaluation of 6-hydroxy-4-methylquinolin-2 (1H)-one derivatives as inotropic agents. *J Enzyme Inhib Med Chem* 24 (2008) 918-29.
- [26] Toshiki S, Kazue T, Kazuyuki T, Shirou T, Yoshihiro I, Yukio K, Hiroyoshi H, Potent Effects of Novel Anti-platelet Aggregatory Cilostamide Analogues on Recombinant Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Isozyme Activity. *Biochem Pharmacol* 59 (2000) 347–56.
- [27] Tsunoo A, Kamijo M, Non-cyclicAMP-dependent positive inotropic cyclodepsi peptides with negative chronotropic. *J Pharmacol Exp Ther* 290 (1999) 1006-12.
- [28] Vinogradova TM, Sirenko S, Lyashkove A, Younes A, Li Y, Zhu W, Constitutive Phosphodiesterase Activity Restricts Spontaneous Beating Rate of Cardiac Pacemaker Cells by Suppressing Local Ca²⁺ Releases. *Circ Res* 102 (2008) 761-9.