بررسی اثر آگونیستهای گیرنده‌های دوپامینی بر انقباض عضله طولی ایلئوم مجزای خوکچه هندی و رابطه آن با نیتریک‌اکساید

دکتر منصور کشاورز، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر سیدمرتضی کریمیان، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر احمدرضا دهپور، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر محسن پرویز، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

The Effect of Dopamine Receptor Agonists on Twitch Response of Guinea-pig Ileum Longitudinal Muscle and Its Relation to Nitric Oxide

ABSTRACT

In this study the effects of bromocriptine and apomorphine (dopamine receptor agonists) on electrical field induced twitch response of longitudinal muscle of guinea-pig illeum was investigated. Bromocriptine and apomorphine dose dependently inhibited illeal contraction. IC50 for this inhibitory effects were $6.22 \pm 0.645\times10^{-7}$M and $5.48 \pm 0.647 \times10^{-6}$ M, respectively. Sulpiride (a specific D2 dopamine receptor antagonist) with concentration of 10^{-5} M inhibited the effects of these agonists. Yohimbine (an $\alpha2$ adrenergic receptor antagonist) only blocked the inhibitory effect of bromocriptine but failed to block apomorphine inhibitory effects. L-NAME (nitric oxide synthetase inhibitor) with concentration of 10^{-3}M blocked the effects of bromocriptine and apomorphine.

These data suggest that there is inhibitory presynaptic dopamine receptors in cholinergic terminals of guinea - pig illeum and its function is related to formation of nitric oxide.

Key Words: Dopamine receptors; Nitric Oxide; Ileum; Guinea-pig;

چکیده

اثر بروموکریپتین و آپومورفین (آگونیست‌های گیرنده‌های دوپامین) بر انقباض ناشی از تحریک با میدان الکتریکی عضله طولی ایلئوم مجزای خوکچهٔ هندی مورد بررسی قرار گرفت. بروموکریپتین و آپومورفین به صورت وابسته به غلظت، انقباض را مهار کردند. IC50 برای این اثر مهاری به ترتیب $۶/۲۲ \pm ۰/۶۴۵ \times ۱۰^{-۷}$ و $۵/۴۸ \pm ۰/۶۴۷ \times ۱۰^{-۶}$ مولار بود. سولپیراید (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های دوپامینی D2) با غلظت $۱۰^{-۵}$ مولارو اثر مهاری این دو دارو را وقفه داد ولی یوهیمبین (آنتاگونیست گیرنده‌های آدرنرژیک $\alpha2$) با غلظت $۱۰^{-۶}$ مولار، فقط اثر مهاری بروموکریپتین را وقفه داد و تأثیری بر اثر مهاری آپومورفین نداشت. L-NAME (مهارکننده آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز) با غلظت $۱۰^{-۳}$ مولار، موجب وقفه در اثر مهاری بروموکریپتین و آپومورفین شد. این نتایج می‌تواند نشاندهنده آن باشد که در پایانه‌های کولینرژیک ایلئوم خوکچه هندی، گیرنده مهاری پیش‌سیناپسی دوپامینی وجود دارد و عملکرد آن به نیتریک‌اکساید وابسته است.

کلمات کلیدی: گیرنده دوپامین؛ نیتریک اکساید؛ ایلئوم؛ خوکچه هندی

مقدمه

مطالعات بسیاری مؤید مهار پیش‌سیناپسی رهایش

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-05-30]

استیل‌کولین از سیناپسهای اتونوم محیطی توسط دوپامین و آگونیستهای آن بوده است. ولی در رابطه با نوع گیرنده‌ای که این اثرات از طریق آن اعمال می‌شود، بین محققان اختلاف‌نظر وجود دارد(۲،۳،۱۰،۱۱،۱۳،۱۶). ما برای مشخص نمودن نوع گیرنده مسؤول این اثرات مهاری با استفاده از برموکریپتین و آپومورفین (آگونیستهای گیرنده‌های دوپامینی)، سولپیراید (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های دوپامینی D2) و یوهیمبین (آنتاگونیست گیرنده‌های آدرنرژیک $\alpha 2$) مطالعه زیر را ترتیب دادیم. در ادامه این مطالعه با توجه به وجود رابطه بین سیستم دوپامینی و نیتریک‌اکساید در سیستم عصبی مرکزی (۱،۶،۸،۹)، نقش نیتریک‌اکساید در بروز این اثر مهاری در سیستم عصبی روده مورد بررسی قرار گرفت.

روش و مواد

خوکچه‌های هندی نر با وزن ۳۰۰ تا ۴۰۰ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت نور ۱۲ ساعت تاریکی، با دسترسی آزاد به آب و غذا در حیوانخانه نگهداری می‌شدند. حیوان مورد آزمایش را با زدن ضربه‌ای به پشت سر کشته و پس از باز کردن شکم و یافتن محل اتصال ایلئوم به سکوم، با صرف‌نظر از ۱۰ سانتیمتر انتهایی ایلئوم، ۲۰ سانتیمتر بعدی برای انجام آزمایشات جدا می‌شد و بلافاصله در محلول تیرود تغییر یافته با ترکیب NaCl, 136.7; KCl, 2.7; Glu, 5.5; NaHCO3, 11.9; CaCl2, 1.8; NaH2PO4, 4.1; MgSO4, 1; (بر حسب mM) قرار می‌گرفت. سپس با استفاده از همین محلول، محتویات داخلی روده شستشو شده، به قطعات ۲ سانتیمتری تقسیم می‌شد. قطعه مورد آزمایش در حمام بافتی با گنجایش ۱۵ ml محتوی محلول تیرود تغییر یافته با دمای ۰/۵ C ± ۳۶/۵ بین پایه الکترود و قلاب ترانسدیوسر بسته می‌شد. یک گرم کشش به بافت اعمال شده و مدت ۶۰ دقیقه برای تطابق با شرایط جدید به آن فرصت داده می‌شد و طی این مدت هر ۱۵ دقیقه یکبار محلول تعویض می‌گردید. تحریک الکتریکی (electrical field stimulation) توسط یک جفت الکترودپلاتینی که در دو طرف بافت قرار داشت القاء می‌شد. ویژگیهای تحریک عبارت بود از: ولتاژ فوق ماکزیمم، طول تحریک ۱ mS و فرکانس ۰/۱۵ Hz (که توسط یک استیمولاتور Harward 6002 تولید می‌شد). این تحریک موجب ایجاد پاسخهای تکانه‌ای (twitch responses) مجزا می‌شد. انقباض عضله طولی به وسیله یک ترانسدیوسر ایزوتونیک (A-385 E&M) دریافت شده، توسط فیزیوگراف Narco Biosystem ثبت می‌شد.

داروهای مورد استفاده عبارتند از: استیل‌کولین هیدروکلراید، آپومورفین هیدروکلراید، یوهیمبین هیدروکلراید، N^G- نیترو - L- رژنین متیل استر (L-NAME)، سولپیراید، و برموکریپتین مسیلات، که همگی از کمپانی Sigma (USA) تهیه شدند. برای تهیه محلول دارویی، سه داروی اول در آب دیونیزه و L-NAME در محلول تیرود تغییر یافته حل می‌شود. سولپیراید ابتدا در چند قطره اسید استیک حل شده، سپس با آب دیونیزه به حجم می‌رسد. برای ساختن محلول برموکریپتین، لازم است معادل وزن آن اسید تارتاریک اضافه کرده، ماده حاصل شده در چند قطره الکل اتیلیک حل شود و با آب دیونیزه به حجم برسد.

برای بررسی اثر هر دارو حداقل ۶ بافت جداگانه مورد آزمایش قرار می‌گرفت و روی هر بافت فقط یک آزمایش انجام می‌شد. پاسخهای مهاری به صورت درصد کاهش دامنه انقباض نسبت به دامنه انقباض اولیه محاسبه شد. IC50 برای اثر مهاری برموکریپتین و آپومورفین با محاسبه غلظتی از آگونیست که موجب ۵۰٪ مهار در پاسخ تکانه‌ای می‌شد، تعیین گردید. مقادیر به صورت mean ± SEM گزارش شده و اختلاف بین میانگین‌ها با استفاده از Unpaired Student's t-test محاسبه شد و مقدار $P<0/05$ معنی‌دار تلقی گردید.

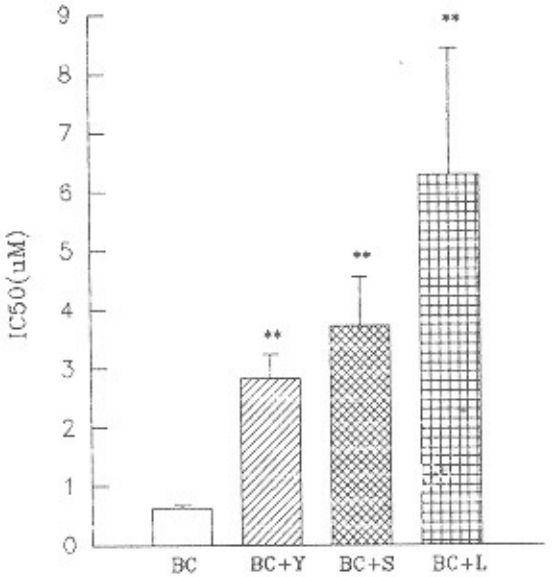
نتایج

اثر آگونیستهای گیرنده دوپامین بر انقباض ناشی از تحریک الکتریکی عضله طولی ایلئوم خوکچه هندی: بعد از شروع تحریک الکتریکی و یکنواخت شدن دامنه انقباضات، آگونیستها به صورت تجمعی به حمام بافتی اضافه می‌شدند. برموکریپتین (10^{-5}M-10^{-7}) و آپومورفین (10^{-4}M - 10^{-6}) به صورت وابسته به غلظت موجب مهار دامنه انقباض ناشی از تحریک با میدان الکتریکی شدند. IC50 برای اثر مهاری این دو آگونیست گیرنده دوپامینی به ترتیب 10^{-7} × ۰/۶۴۵ ± ۶/۲۲ و 10^{-6} × ۰/۶۴۷ ± ۵/۴۸ مولار محاسبه شد.

اثر سولپیراید بر مهار ناشی از برموکریپتین و آپومورفین: اضافه نمودن 10^{-6} M سولپیراید (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های دوپامینی D2) ۱۵ تا ۲۰ دقیقه قبل از

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-05-30]

نمودار ۱ـ IC50 برای اثر مهاری بروموکریپتین (BC) بر انقباض ایلئوم: مشاهده می‌شود که IC50 در حضور یوهیمبین (BC+Y)، سولپیراید (BC+S) و L-NAME (BC+L) افزایش معنی‌داری (P< ۰/۰۱) نشان می‌دهد.



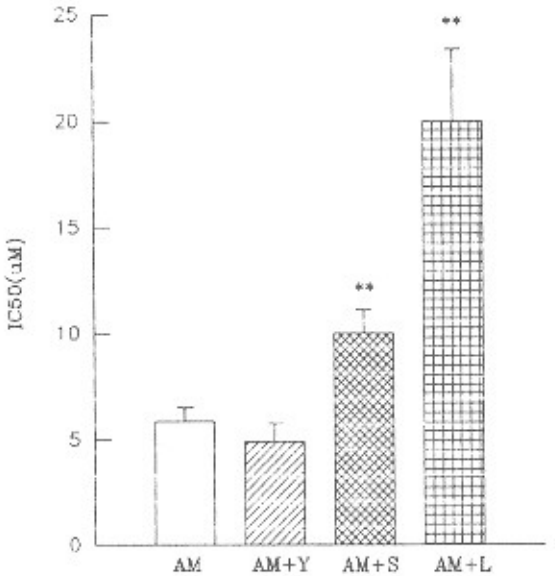
BC:Bromocriptine,Y:Yohimbine,S:Sulpiride,L:L-NAME
** P<0.01

بروموکریپتین و آپومورفین، باعث مهار اثر این دو دارو شده، منحنی دوز ـ پاسخ آنها را به طرف راست و پایین منحرف کرد. IC50 بروموکریپتین در حضور سولپیراید به طور معنی‌داری (P< ۰/۰۱) افزایش یافته و به $۱۰^{-۶}$ × ۰/۸۴۲ ± ۳/۷ مولار می‌رسد. همین وضعیت در مورد آپومورفین نیز اتفاق افتاده و IC50 آپومورفین در حضور سولپیراید به $۱۰^{-۵}$ × ۰/۱۱ ± ۱ مولار می‌رسد که نسبت به آپومورفین به تنهایی دارای اختلاف معنی‌دار (P< ۰/۰۱) است.

اثر یوهیمبین بر مهار ناشی از بروموکریپتین و آپومورفین: یوهیمبین (آنتاگونیست گیرنه آدرنرژیک $\alpha 2$ پیش‌سیناپسی) با غلظت $۱۰^{-۶}$ مولار تأثیری بر اثر مهاری آپومورفین نداشت، اما اثر مهاری بروموکریپتین را مهار کرد، به طوری که IC50 بروموکریپتین در حضور یوهیمبین به $۱۰^{-۶}$ × ۰/۴۱۲ ± ۲/۸۲ مولار رسید که افزایش معنی‌داری (P< ۰/۰۱) را نسبت به بروموکریپتین تنها نشان می‌دهد.

اثر L-NAME بر مهار ناشی از برموکریپتین و آپومورفین: تجویز $۱۰^{-۳}$ M از داروی L-NAME (مهارکننده آنزیم نیتریک‌اکساید سنتتاز) قبل از این آگونیست‌های گیرنده‌های دوپامین، باعث مهار اثر آنها می‌شود. L-NAME منحنی دوز ـ پاسخ بروموکریپتین و آپومورفین را به طرف راست و پایین منحرف کرد و IC50 برموکریپتین ($۱۰^{-۶}$M × ۰/۲۱۴ ± ۶/۲۷) و آپومورفین ($۱۰^{-۵}$M × ۰/۳۳۶ ± ۲)، افزایش معنی‌داری (۰/۰۱ >P) نسبت به هر یک از این دو دارو به تنهایی نشان می‌دهد.

نمودار ۲ـ IC50 برای اثر مهاری بروموکریپتین (AM) بر انقباض ایلئوم: مشاهده می‌شود که IC50 در حضور سولپیراید (AM+S) و L-NAME (AM+L) افزایش معنی‌داری (P< ۰/۰۱) نشان می‌دهد.



AM:Apomorphie,Y:Yohimbine,S:Sulpiride.,L:L-NAME
** P<0.01

برای مشخص کردن اینکه اثر مهاری بروموکریپتین و آپومورفین پیش‌سیناپسی است، در یک سری از آزمایشات بدون استفاده از تحریک الکتریکی، با تجویز استیل‌کولین، انقباض ایجاد کردیم و اثر این دودارو را روی آن مورد بررسی قرار دادیم. غلظت $۱۰^{-۷}$M استیل کولین را (که انقباضی حدود ۸۰-۷۰ درصد انقباض حداکثر ایجاد می‌کرد) انتخاب کردیم. اضافه نمودن بروموکریپتین ($۱۰^{-۶}$M) و آپومورفین ($۱۰^{-۵}$M) قبل از استیل‌کولین، تأثیری بر انقباض ناشی از آن نداشت.

بحث

مطالعات متعددی اثر دوپامین و آگونیستهای گیرنده‌های دوپامین را بر قسمتهای مختلف لوله گوارش سنجیده و اثرات مهاری آنها را روی حرکات لوله گوارش نشان داده‌اند (۲،۱۰،۱۱،۱۳،۱۶). در اکثر این مطالعات مشخص شده که این اثر مهاری از طریق مهار پیش‌سیناپسی رهایش استیل‌کولین از پایانه‌های کولینرژیک صورت می‌گیرد (۲،۱۰،۱۳). اما در مورد اینکه این اثر مهاری از طریق چه گیرنده‌ای اعمال می‌شود، بین محققین اختلاف نظر وجود دارد(۱۶). با توجه به اینکه این اثرات مهاری به وسیله آنتاگونیستهای گیرنده دوپامینی مهار می‌شوند، گروهی معتقدند که در غشای پیش‌سیناپسی، گیرنده دوپامینی حضور دارد و تحریک آن باعث مهار رهایش استیل‌کولین از پایانه عصبی و در نتیجه مهار انقباض می‌شود(۲،۱۰،۱۳). گروه مقابل با بیان این نکته که بیشتر آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های دوپامینی که

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-05-30]

در این مطالعات مورد استفاده قرار گرفته‌اند به طور غیراختصاصی عمل می‌کنند، اثرات مهاری دوپامین و آگونیست‌های گیرنده‌های دوپامینی را به تداخل با گیرنده آدرنرژیک پیش‌سیناپسی نسبت می‌دهند(۱۶).

در این مطالعه بروموکریپتین و آپومورفین (آگونیست‌های گیرنده‌های دوپامینی)، انقباض ناشی از تحریک الکتریکی را مهار کردند، ولی بر انقباض ناشی از تجویز استیل‌کولین تأثیری نداشتند. بنابراین، داروهای فوق به صورت پیش‌سیناپسی عمل کرده، رهایش استیل‌کولین از پایانه عصبی در اثر تحریک الکتریکی را مهار می‌کنند(۲،۱۰،۱۳).

سولپیراید که یک آنتاگونیست اختصاصی گیرنده دوپامینی D2 می‌باشد، مهار ناشی از دو داروی فوق را بلوک کرد، در حالی که یوهیمبین که یک آنتاگونیست ترجیحی گیرنده آدرنرژیک $\alpha 2$ است، فقط اثر بروموکریپتین را بلوک کرد و روی اثر مهاری آپومورفین تأثیری نداشت. بر اساس این مشاهدات می‌توان چنین نتیجه گرفت که در غشای پیش‌سیناپسی پایانه عصبی کولینرژیک شبکه میانتریک ایلئوم خوکچه هندی، هم گیرنده‌های دوپامینی D2 و هم آدنرژیک $\alpha 2$ وجود دارند. بروموکریپتین با هر دو گیرنده واکنش نشان داده و اثر مهاری خود را اعمال می‌کند، ولی اثر مهاری آپومورفین از طریق گیرنده دوپامینی D2 اعمال می‌شود. به این ترتیب در این مطالعه وجود گیرنده دوپامینی پیش‌سیناپسی تأیید شد.

از سوی دیگر، مطالعات متعددی اثرات متقابل نیتریک‌اکساید با دوپامین را در سیستم عصبی مرکزی مطرح کرده‌اند(۱،۲،۳،۷،۱۰،۱۲). در سیستم عصبی محیطی نیز، نیتریک‌اکساید و دوپامین به عنوان میانجی عصبی مطرح شده‌اند و مطالعات مختلف، نقشهایی را برای آنها در سیستم عصبی محیطی و بویژه در سیستم عصبی روده (Enteric Nervous System) مطرح نموده‌اند(۴،۵،۶،۸،۹،۱۱). باتوجه به شباهتی که بین عملکرد این دو ماده بر رهایش استیل‌کولین از پایانه‌های کولینرژیک روده وجود دارد و هر دو باعث مهار پیش‌سیناپسی رهایش استیل‌کولین می‌شوند، چنین به نظر می‌رسد که در سیستم عصبی محیطی نیز همانند سیستم عصبی مرکزی، عملکرد این دو ماده با یکدیگر ارتباط داشته باشد. برای یافتن این رابطه، در این تحقیق از L-NAME (که یک مهارکننده تولید نیتریک‌اکساید است) استفاده شد. مشاهده شد که L-NAME اثر مهاری بروموکریپتین و آپومورفین را بلوک کرد. از این مشاهده می‌توان نتیجه گرفت که تحریک گیرنده دوپامینی احتمالاً با واسطه نیتریک‌اکساید، اثر مهاری خود را اعمال می‌کند. مطالعاتی که مهار پیش‌سیناپسی نیتریک‌اکساید روی انتقال کولینرژیک را مطرح کرده‌اند، مؤید نتیجه‌گیری فوق است(۵،۱۴).

به طور خلاصه این مطالعه نشان داد که در پایانه‌های کولینرژیک ایلئوم خوکچه هندی، گیرنده‌های پیش‌سیناپسی دوپامینی وجود دارند و این گیرنده‌ها احتمالاً با واسطه نیتریک‌اکساید باعث مهار انقباض ناشی از تحریک الکتریکی می‌شوند.

منابع

1- Calignano A, Persico P., Mancuso F., Sorrentino L. Endogenous nitric oxide modulates morphine - induced changes in locomotion and food intake in mice. Eur.J. Pharmacol. 1993. 231(3): 415-419.

2- Das M., Chauhan S.P.S., Ganguly D.K. Possible existance of dopaminergic receptors on cholinergic nerve terminals in guinea-pig auerbach's plexus. Life Sciences. 1991. 48: 1395-1399.

3- Drew G.M., Hilditch A. Prejunctional dopamine receptors modulate twitch responses to parasymphathetic nerve stimulation in the rabbit isolated rectococcygeus muscle. Br. J.Pharmac. 1984. 83: 871-881.

4- Holzer P., Lippe I. Th., Tarizi A.L., LenardL., Bartho L. Dual excitatory and inibitory effect of nitric oxide on persistalsis in the guinea-pig intestine. J.Pharmacol. Exp. Ther. 1997. 280: 154-161.

5- Hryhorenko L.M., Woskowaska Z., Fox-Threlkeld J.A. Nitric oxide (NO) inhibits release of acetylcholine from nerves of isolated circular muscle of the canine ileum: relationship to motility and release of nitric oxide. J.Pharmacol. Exp. The. 1994. 271(2): 918-926.

6- Kim H.S., Park W.K. Nitric Oxide mediation of cocaine - induced dopaminergic behaviors: ambulation-accelerating activity, reverse toerance and conditioned place preference in mice. J. Pharmacol. Exp. Ther 1995. 275(2): 551-557.

7- LI Y.F., weisbrodt N.W., Lodato R.F., Moody F.G. Nitric oxide is involved in muslce relaxation but not in changes in short circut current in rat ileum. Am.J. Physiol. 1994. 266(4Pt 1): G554-559.

8- Lin A.M., Kao I.S., Chai C.Y. Involvement of nitric oxide in dopaminergic transmission in rat striatum: an in vivo electrochemical study. J. Neurochem. 1995. 65(5); 2043-2049.

9- Liu Y. nitric oxide influences dopaminergic processes. Adv. neuroimmunol. 1996. 6(3): 259-64.

10- Samini M., Dehpour A.R., Yousefnejad S. The effects of dopaminergic and adrenergic drugs on twitch response of guinea-pig common bile duct. Gen. Pharm. 1997. 29(3): 469-471.

11- Seno N., Nakazato Y., Ohga A., Presynaptic inhibitory effects of catecholamines on cholinergic transmission in the smooth muscle of the chick stomach. Eur. J. Pharmacol. 1978. 51: 229-237.

12- Suzuki N., Mizuno K., Gomi Y. Role od nitric oxide in the persitalsis in the isolated guinea-pig ileum. Eur. J. Pharmacol. 1994 251(2-3): 221-227.

13- Tayo F.M. Prejunctional inhibitory α- adrenoceptors and dopaminoceptors of the rat vas deferens and the guinea-pig

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-05-30]

ileum in-vitro. Eur. J.Pharmacol. 1979. 58: 189-195.

14- Wiklund C.U., Olgart C., Wiklund N.P., Gustafsson L.E. Modulation of cholinergic and substance P-like neurotransmission by nitric oxide in the guinea pig ileum. Br. J. Pharmacol. 1993. 110(2): 833-839.

15- Wiklund C.U., Wiklund N.P., Gustafsson L.E. Modulation of neuroeffector transmission by endogenous nitric oxide: a role for acetylcholine receptor - activated nitric oxide formations, as indicated by measurements of nitric oxide/nitric release. Eur. J. Pharmacol. 1993. 240(2-3): 235-242.

16- Willems J.L., Buylaert W.A., Lefebvre R.A., Bogart M.G. Neuronal dopamine recptors on autonomic ganglia sympathetic nerves and dopamine receptors in the gastrointestinal system. Pharmacol. Rev. 1985. 37(2): 165-216.

17- Young H.M., McConalogue K., Funess J. B., De-Vente J. Nitric Oxide (NO) inhibits release of acetylcholine from nerves of isolated circular muscle of the canine ileum: relationship to motility and release of nitric oxide. J. Pharmacol. exp. Ther. 1994 271(2): 918-926.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-05-30]