

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

دکتر منصور کشاورز، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر سیدمرتضی کریمیان، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر احمدرضا دهبور، 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 ileum was investigated. Bromocriptine and apomorphine dose dependently inhibited ileal contraction. IC₅₀ for this inhibitory effects were $6.22 \pm 0.645 \times 10^{-7} \text{M}$ and $5.48 \pm 0.647 \times 10^{-6} \text{M}$, respectively. Sulpiride (a specific D₂ dopamine receptor antagonist) with concentration of 10^{-5}M inhibited the effects of these agonists. Yohimbine (an α_2 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 ileum and its function is related to formation of nitric oxide.

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

چکیده

نیتریک اکساید سنتاز) با غلظت 10^{-3} 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 نیتریک اکساید وابسته است.

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

مقدمه

مطالعات بسیاری مؤید مهار پیش‌سیناپسی ره‌ایش

اثر بروموکریپتین و آپومورفین (آگونیست‌های گیرنده‌های دوپامین) بر انقباض ناشی از تحریک با میدان الکتریکی عضله طولی ایلئوم مجزای خوکچه هندی مورد بررسی قرار گرفت. بروموکریپتین و آپومورفین به صورت وابسته به غلظت، انقباض را مهار کردند. IC₅₀ برای این اثر مهاری به ترتیب $6.22 \pm 0.645 \times 10^{-7}$ و $5.48 \pm 0.647 \times 10^{-6}$ مولار بود. سولپیرید (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های دوپامینی D₂) با غلظت 10^{-5} مولار اثر مهاری این دو دارو را وقفه داد ولی یوهیمبین (آنتاگونیست گیرنده‌های آدرنرژیک α_2) با غلظت 10^{-6} مولار، فقط اثر مهاری بروموکریپتین را وقفه داد و تأثیری بر اثر مهاری آپومورفین نداشت. L-NAME (مهار کننده آنزیم

انقباض عضله طولی به وسیله یک ترانسدایوسر ایزوتونیک (A-385 E&M) دریافت شده، توسط فیزیوگراف Narco Biosystem ثبت می‌شد.

داروهای مورد استفاده عبارتند از: استیل‌کولین هیدروکلراید، آپومورفین هیدروکلراید، یوهیمین هیدروکلراید، N^G -نیترول- L ، رژیم متیل استر (L-NAME)، سولپیراید، و بروموکرپتین 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 بروموکرپتین، 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 مهارتی به صورت درصد کاهش دامنه انقباض نسبت به دامنه انقباض اولیه محاسبه شد. IC_{50} برای اثر مهارتی بروموکرپتین و آپومورفین با محاسبه غلظتی از آگونیست که موجب ۵۰٪ مهار در پاسخ تکانه‌ای می‌شد، تعیین گردید. مقادیر به صورت $mean \pm SEM$ 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 یکتواخت شدن دامنه انقباضات، آگونیستها به صورت تجمعی به حمام بافتی اضافه می‌شدند. بروموکرپتین (10^{-5} - 10^{-7}) و آپومورفین (10^{-6} - 10^{-8}) به صورت وابسته به غلظت موجب مهار دامنه انقباض ناشی از تحریک با میدان الکتریکی شدند. IC_{50} برای اثر مهارتی این دو آگونیست گیرنده دوپامینی به ترتیب $10^{-7} \times 0.645 \pm 0.22/6$ و $10^{-6} \times 0.647 \pm 0.48/5$ مولار محاسبه شد.

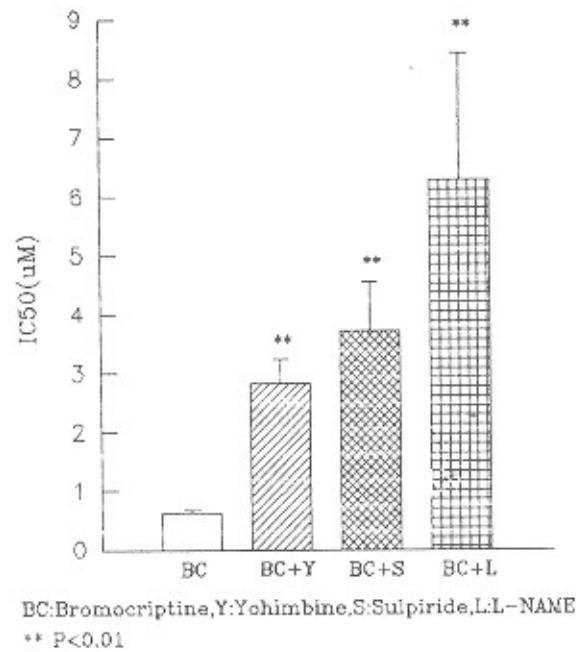
اثر سولپیراید بر مهار ناشی از بروموکرپتین و آپومورفین: اضافه نمودن 10^{-6} M سولپیراید (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های دوپامینی D2) ۱۵ تا ۲۰ دقیقه قبل از

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 اختلاف نظر وجود دارد (۱۶، ۱۳، ۱۱، ۱۰، ۳، ۲). ما برای مشخص نمودن نوع گیرنده مسؤول این اثرات مهارتی با استفاده از بروموکرپتین و آپومورفین (آگونیستهای گیرنده‌های دوپامینی)، سولپیراید (آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های دوپامینی D2) و یوهیمین (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 (۹، ۸، ۶، ۱)، نقش نیتریک‌اکساید در بروز این اثر مهارتی 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 $36/5 \pm 0/5$ C بین پایه الکتروود و قلاب ترانسدایوسر بسته می‌شد. یک گرم کتیش 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 الکتروود پلاتینی 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 Harvard 6002 تولید می‌شد). این تحریک موجب ایجاد پاسخهای تکانه‌ای (twitch responses) مجزا می‌شد.

نمودار ۱- IC50 برای اثر مهاري 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.



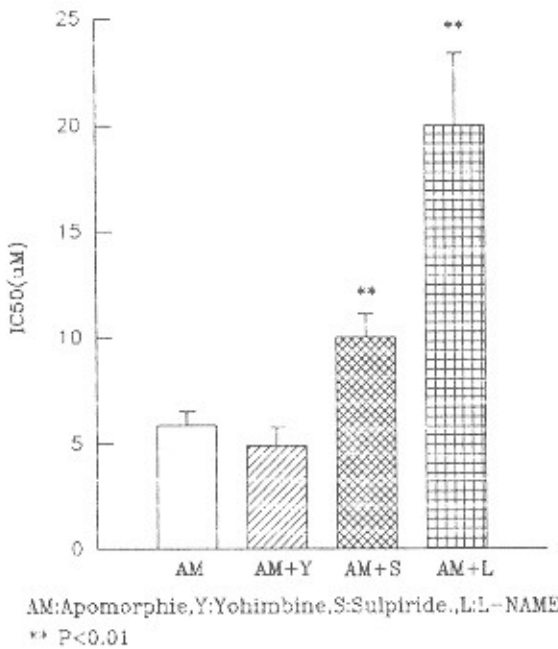
BC: Bromocriptine, Y: Yohimbine, S: Sulpiride, L: L-NAME
** P < 0.01

بروموکریپتین و آپومورفین، باعث مهار اثر این دو دارو شده، منحنی دوز- 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 $3/7 \pm 0/842 \times 10^{-6}$ مولار می‌رسد. همین وضعیت در مورد آپومورفین نیز اتفاق افتاده و IC50 آپومورفین در حضور سولپیراید به $1 \pm 0/11 \times 10^{-5}$ 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 گیرنده آدرنژیک $\alpha 2$ پیش‌سیناپسی) با غلظت 10^{-6} مولار تأثیری بر اثر مهاري آپومورفین نداشت، اما اثر مهاري بروموکریپتین را مهار کرد، به طوری که IC50 بروموکریپتین در حضور یوهیمبین به $2/412 \pm 0/82$ مولار رسید که افزایش معنی‌داری (P < ۰/۰۱) را نسبت به بروموکریپتین تنها نشان می‌دهد.

اثر L-NAME بر مهار ناشی از بروموکریپتین و آپومورفین: تجویز 10^{-3} M از داروی L-NAME (مهارکننده آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز) قبل از این آگونیست‌های گیرنده‌های دوپامین، باعث مهار اثر آنها می‌شود. L-NAME منحنی دوز- پاسخ بروموکریپتین و آپومورفین را به طرف راست و پایین منحرف کرد و IC50 بروموکریپتین ($6/27 \pm 0/214 \times 10^{-6}$ M) و آپومورفین ($2 \pm 0/336 \times 10^{-5}$ M)، افزایش معنی‌داری (P < ۰/۰۱) نسبت به هر یک از این دو دارو به تنهایی نشان می‌دهد.

نمودار ۲- IC50 برای اثر مهاري 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: Apomorphine, Y: Yohimbine, S: Sulpiride, L: L-NAME
** P < 0.01

برای مشخص کردن اینکه اثر مهاري بروموکریپتین و آپومورفین پیش‌سیناپسی است، در یک سری از آزمایشات بدون استفاده از تحریک الکتریکی، با تجویز استیل‌کولین، انقباض ایجاد کردیم و اثر این دو دارو را روی آن مورد بررسی قرار دادیم. غلظت 10^{-6} M استیل‌کولین را (که انقباضی حدود ۸۰-۷۰ درصد انقباض حداکثر ایجاد می‌کرد) انتخاب کردیم. اضافه نمودن بروموکریپتین (10^{-6} M) و آپومورفین (10^{-5} 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 مهاري آنها را روی حرکات لوله گوارش نشان داده‌اند (۱، ۲، ۱۱، ۱۳، ۱۶). در اکثر این مطالعات مشخص شده که این اثر مهاري از طریق مهار پیش‌سیناپسی رهایش استیل‌کولین از پایانه‌های کولینرژیک صورت می‌گیرد (۲، ۱۰، ۱۳). اما در مورد اینکه این اثر مهاري از طریق چه گیرنده‌ای اعمال می‌شود، بین محققین اختلاف نظر وجود دارد (۱۶). با توجه به اینکه این اثرات مهاري 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

با دوپامین را در سیستم عصبی مرکزی مطرح کرده‌اند (۱۲،۱۰،۷،۳،۲،۱). در سیستم عصبی محیطی نیز، نیتریک اکساید 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 (۱۱،۹،۸،۶،۵،۴). با توجه به شباهتی که بین عملکرد این دو ماده بر ره‌های استیل‌کولین از پایانه‌های کولینرژیک روده وجود دارد و هر دو باعث مهار پیش‌سیناپسی ره‌های 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 مهار کننده تولید نیتریک اکساید است) استفاده شد. مشاهده شد که L-NAME اثر مهاری بـرومـوکریپتین و آپومورفین را بلوک کرد. از این مشاهده می‌توان نتیجه گرفت که تحریک گیرنده دوپامینی احتمالاً با واسطه نیتریک اکساید، اثر مهاری خود را اعمال می‌کند. مطالعاتی که مهار پیش‌سیناپسی نیتریک اکساید روی انتقال کولینرژیک را مطرح کرده‌اند، مؤید نتیجه‌گیری فوق است (۱۴،۵).

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

در این مطالعات مورد استفاده قرار گرفته‌اند به طور غیراختصاصی عمل می‌کنند، اثرات مهاری دوپامین و آگونیست‌های گیرنده‌های دوپامینی را به تداخل یا 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، ره‌های استیل‌کولین از پایانه عصبی در اثر تحریک الکتریکی را مهار می‌کنند (۱۳،۱۰،۲).

سولپیراید که یک آنتاگونیست اختصاصی گیرنده دوپامینی D2 می‌باشد، مهار ناشی از دو داروی فوق را بلوک کرد، در حالی که یوهیمین که یک آنتاگونیست ترجیحی گیرنده آدرنرژیک α_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 میانرژیک ایلتوم کوچک هندی، هم گیرنده‌های دوپامینی D2 و هم آدرنرژیک α_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 نیتریک اکساید

منابع

- 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.
- Das M., Chauhan S.P.S., Ganguly D.K. Possible existence of dopaminergic receptors on cholinergic nerve terminals in guinea-pig auerbach's plexus. *Life Sciences.* 1991. 48: 1395-1399.
- Drew G.M., Hilditch A. Prejunctional dopamine receptors modulate twitch responses to parasympathetic nerve stimulation in the rabbit isolated rectococcygeus muscle. *Br. J.Pharmac.* 1984. 83: 871-881.
- Holzer P., Lippe I. Th., Tarizi A.L., LenardL., Bartho L. Dual excitatory and inhibitory effect of nitric oxide on persistalsis in the guinea-pig intestine. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 1997. 280: 154-161.
- 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.
- Kim H.S., Park W.K. Nitric Oxide mediation of cocaine - induced dopaminergic behaviors: ambulation-accelerating activity, reverse tolerance and conditioned place preference in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 1995. 275(2): 551-557.
- LI Y.F., weisbrodt N.W., Lodato R.F., Moody F.G. Nitric oxide is involved in muscle relaxation but not in changes in short circuit current in rat ileum. *Am.J. Physiol.* 1994. 266(4Pt 1): G554-559.
- 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.
- Liu Y. nitric oxide influences dopaminergic processes. *Adv. neuroimmunol.* 1996. 6(3): 259-64.
- 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.
- 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.
- Suzuki N., Mizuno K., Gomi Y. Role od nitric oxide in the persistalsis in the isolated guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 1994 251(2-3): 221-227.
- Tayo F.M. Prejunctional inhibitory α - adrenoceptors and the guinea-pig dopaminoceptors of the rat vas deferens and the guinea-pig

- 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 receptors 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., Funes 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.