● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ چهاردهم، شمارهٔ ۳، ص۱۹۳-۱۸۵، ۱۳۸۶

مقالهٔ پژوهشی

نقش آنژیوتانسین II در تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نقش نیتریک اکسید در پاسخ‌های عروقی به آنژیوتانسین II در التهاب حاد مفصل زانوی خرگوش

دکتر حمید نجفی‌پور[1*]، نجمه صادقی[2] و دکتر احمد غلامحسینیان[3]

خلاصه

مقدمه: ثابت شده است در بسیاری از بافت‌ها در شرایط التهابی تولید نیتریک اکسید (NO) افزایش می‌یابد ونیز آنژیوتانسین II (AngII) در تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نقش دارد. از آن جا که تنظیم جریان خون مفصل زانو در شرایط التهابی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، مطالعه حاضر به بررسی نقش AngII در تولید ROS و نقشNO در تنظیم جریان خون مفصل زانو و تعدیل اثرات آنژیوتانسین II بر عروق مفصلی در شرایط التهاب حاد پرداخته است.

روش: مطالعه بر روی ۲۴ خرگوش نر نژاد سفید نیوزلندی در سه گروه آزمون و یک گروه شاهد انجام شد. التهاب حاد با تزریق ۰/۵ سی‌سی محلول کاراگینین ۲٪ در مفصل زانو ایجاد شد. ۲۴ ساعت بعد در حیوانات گروه اول تحت بیهوشی با تیوپنتال سدیم، شریان کاروتید جهت ثبت فشار شریانی و ورید ژوگولر جهت تزریق L-NAME و شریان صافن جهت تزریق آنژیوتانسین و لوزارتان کانول‌گذاری شدند. جریان خون مفصلی توسط دستگاه لیزر داپلر ثبت شد. مقاومت عروقی از تقسیم فشارخون به جریان خون محاسبه شد. بافت مفصل زانوی حیوانات گروه دوم برای هموژنیزاسیون و اندازه‌گیری ROS در روشناور بافت مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات گروه سوم ۲ ساعت قبل ازایجاد التهاب، لوزارتان (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) دریافت کردند.

یافته‌ها: مقاومت عروق مفصلی در اثر L-NAME افزایش معنی‌داری پیدا کرد. مقاومت عروقی در پاسخ به تزریق آنژیوتانسین با غلظت$^{-6}$ ۱۰ مولار به میزان معنی‌داری افزایش یافت. این پاسخ در حضور L-NAME به میزان معنی‌داری تشدید گردید (P<۰/۰۱). لوزارتان اثرات آنژیوتانسین بر عروق مفصلی را کاملاً مهار کرد. میزان آنتی‌اکسیدان تام و فعالیت آنزیم کاتالاز در روشناور بافت مفصل گروه دوم نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود. لوزارتان موجب کاهش معنی‌دار میزان کاتالاز مفصل ملتهب شد (P<۰/۰۱).

نتیجه‌گیری: NO نقش مهمی در تنظیم جریان خون و در تعدیل پاسخ‌های انقباضی به آنژیوتانسین II در مفصل ملتهب بازی می‌کند. آنژیوتانسینII موجب افزایش ROS و در نتیجه میزان آنتی‌اکسیدان درمفصل ملتهب شده و این افزایش، از طریق گیرنده AT_1 صورت گرفته است.

واژه‌های کلیدی : آنژیوتنسین II، نیتریک اکسید، گونه‌های فعال اکسیژن، التهاب حاد، کاراگینین، مفصل زانو، خرگوش

۱- استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ● **آدرس پست الکترونیک :** najafipourh@kmu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۱۱/۳ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸۶/۳/۱۷ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۶/۳/۲۴

مقدمه

بیماری‌های التهابی مفاصل از بیماری‌های شایع در سنین بالا می‌باشند. گرچه امروزه راه‌های درمانی مختلفی برای کنترل این بیماری‌ها اعمال می‌شود، ولی هیچ‌کدام به درمان کامل و قطعی بیماری منتهی نگردیده و بیشتر نقش تسکین درد برای بیماران دارند. علت این امر ناشناخته بودن مکانیسم‌های ایجاد بیماری است.

مطالعه‌ی قبلی علاوه بر نشان دادن حضور گیرنده‌های آنژیوتانسین در مفصل سالم، نقش نیتریک‌اکسید (NO) را در پاسخ عروقی مفصل به آنژیوتانسینII بررسی کرده و نشان داد که نیتریک‌اکسید در تنظیم تون عروقی مفصل سالم نقش دارد، اما اثر انقباضی آنژیوتانسینII روی این عروق را تغییر نمی‌دهد (۱۰). NO در شرایط فیزیولوژیک، اتساع عروق خونی را حفظ می‌کند (۴) و این مخالف اثر آنژیوتانسین II می‌باشد (۱۰). NO به مقدار زیادی در شرایط التهابی تولید می‌شود (۴). بنابراین بررسی نقش این ماده در پاسخ به آنژیوتانسینII در شرایط التهاب ارزش زیادی دارد. از طرف دیگر استفاده از L-NAME [(مهارکننده غیر اختصاصی آنزیم [Nitric Oxide Synthetase (NOS)] می‌تواند اثر ثانویه‌ای برجریان خون مفصل داشته باشد و به دلیل مهارcNOS (constitutive NOS) موجب کاهش نشت عروقی شود، بنابراین دارای اثر ضد آرتریت می‌باشد(۱۷). مطالعات دیگری حاکی از نقش NO در تشدید پاسخ التهابی از طریق افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن است (۱).

تحقیقات نشان داده‌اند که آنژیوتانسینII در عروق مغزی و اندوتلیوم عروق، تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS: Reactive Oxygen Species) را با واسطه NADPH-Oxidase القا می‌کند (۱۳). مطالعه دیگری نشان داده است که این عمل از طریق گیرنده AT_1 صورت می‌گیرد (۲۱). اما مطالعه‌ای که نشان‌دهنده مکانیسم تولید، افزایش یا کاهش ROS در بافت سینویوم در وضعیت التهابی باشد یافت نشد. بر اساس مطالعات انجام شده، ROS می‌تواند عملکرد اندوتلیوم عروق را از طریق NO scavenging و تبدیل آن به پراکسی نیتریت مختل کند (۶). بر اساس مطالعه دیگری، استرس اکسیداتیو باعث القای مرگ در سلول‌های اندوتلیال می‌شود (۱۹) و اثرات سمی در روند تقسیم سلولی دارد (۱۶). همچنین پراکسید هیدروژن تولید شده توسط NADPH- Oxidase باعث هیپرتروفی سلول‌های عضله صاف در پاسخ به آنژیوتانسین II می‌شود (۲۰).

اهمیت پاتوفیزیولوژی تولید سوپراکسید به واسطه آنژیوتانسین II در این است که این فرایند از طریق تحریک اکسیدازهای وابسته به NADH/ NADPH صورت می‌گیرد. یون‌های سوپراکسید تولید شده در عروق التهابی سبب اختلال عملکرد سلول‌های اندوتلیال عروقی می‌گردند (۵). ROS موجب تولید فاکتور رشد اندوتلیال عروقی شده و شواهدی وجود دارد که این ماده مسیرهای تخریب غضروف‌های مفصلی در زمان التهاب را تقویت می‌نماید (۳). همچنین احتمال فعال شدن این سیستم طی افزایش استرس اکسیداتیو نیز منتفی نیست (۱۲). مطالعات دیگری نشان داده که در شرایط التهابی سیستم رنین- آنژیوتانسین موضعی فعال شده و موجب افزایش تولید آنژیوتانسین II که یک منقبض کننده عروقی است در موضع التهاب می‌گردد (۲۲).

لذا با توجه به موارد فوق، هدف اصلی این مطالعه بررسی نقش NO در تنظیم جریان خون پایه مفصل در حالت التهابی حاد و در پاسخ این عروق به آنژیوتانسینII و نقش آنژیوتانسین II در تولید گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط التهاب حاد در این مفاصل بود.

روش بررسی

آزمایش بر روی۲۴ خرگوش نژاد سفید نیوزلندی انجام گرفت. حیوانات به سه گروه آزمایش و یک گروه شاهد تقسیم شدند (n=۶ در هر گروه) و طبق مراحل زیر عمل گردید. التهاب مفصل زانو با تزریق داخل مفصلی۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۲٪ carrageenan ایجاد شد (۹). محلول مذکور در سرنگ ۱سی‌سی و سرسوزن شماره ۲۸ از طریق

ناحیه میانی تاندون پاتلا (Mid patellar tendon) ۲۴ ساعت قبل از آزمایش به داخل فضای مفصل تزریق شد. برای انجام این عمل حیوان با هالوتان ۳٪ در مخلوط ۶۷ درصد N_2O و ۳۰ درصد O_2 برای مدت کوتاهی بیهوش گردید (۹). مطالعه قبلی با همین روش نشان داد که بر اساس هر دو شاخص اندازه‌گیری قطر مفصل و هیستولوژی بافت مفصلی، این روش منجر به ایجاد التهاب حاد مفصلی می‌گردد (۹). افزایش قطر مفصل نیز در این مطالعه مشاهده گردید.

گروه اول: ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم (50mg/kg) بیهوش شدند. در صورت نیاز در طول جراحی از بیهوشی گازی با ترکیب فوق استفاده گردید. پس از کانول‌گذاری تراشه (برای تسهیل در بیهوشی استنشاقی) و کانول‌گذاری کاروتید (برای ثبت فشارخون شریانی) شریان صافن که در بخش قدامی- جانبی ساق پا قرار دارد به صورت روبه بالا کانول‌گذاری شد، به نحوی که نوک کانول به نزدیکی انشعابات شریانی مفصل برسد. کانول شریان کاروتید از طریق یک ترانسدیوسر فشار به دستگاه فیزیوگراف (Beckman R611 USA) وصل گردید تا منحنی تغییرات فشارخون (سیستولی و دیاستولی) را روی نوار دستگاه ثبت نماید. آنگاه پوست ناحیه قدامی مفصل به همراه بافت‌های زیر تا بافت سینویوم برداشته و توسط یک فیلم شفاف(Cling film) نازک پوشیده شد تا خشک نگردد. پروب دستگاه فلومتر لیزرداپلر (model MBF 3D, Moor Instruments Axminster UK) در سطح بخش قدامی- جانبی کپسول قدامی مفصل قرار گرفت تا به طور مداوم جریان خون مفصلی (Joint blood flow: JBF) را نشان دهد (۱۰). یک ساعت پس از اتمام اعمال جراحی ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر آنژیوتانسین 10^{-6} مولار از طریق شریان صافن تزریق گردید. این غلظت آنژیوتانسین حداکثر پاسخ انقباضی را در عروق مفصلی ایجاد می‌کند بدون آنکه اثر قابل توجهی بر فشارخون شریانی حیوان بگذارد (۱۰). آنگاه (Nitro- L- Arginin Methyl Ester) L-NAME که یک بلوک‌کننده تولید NO است به صورت داخل وریدی (3mg/kg) از طریق کانول ورید ژوگولر تزریق گردید (۱۰) تا تولید NO متوقف و نقش NO درتنظیم جریان خون پایه مشخص گردد. ۴۵ دقیقه بعد آنژیوتانسین 10^{-6} مولار مجدداً تزریق تا پاسخ عروق مفصلی به این ماده در غیاب NO ارزیابی شود. در پایان ۰/۳ میلی‌لیتر محلول لوزارتان ۱ میلی‌مولار از طریق کانول شریانی نزدیک مفصل تزریق و دو دقیقه بعد دوز آنژیوتانسین 10^{-6} مولارتکرار گردید تا نقش گیرنده های AT_1 در پاسخ عروقی به آنژیوتانسین ارزیابی شود.

گروه دوم: در این گروه ۲۴ ساعت پس از ایجاد التهاب حاد، تحت بیهوشی با تیوپنتال سدیم حیوان کشته شد و مفصل زانو باز و بافت سینویوم شامل کپسول‌های قدامی و خلفی زانو جدا و هموژنیزه گردید. برای اندازه‌گیری مقدار ROS از دو شاخص اندازه‌گیری استفاده گردید. شاخص اول مقدار Total antioxidant بود که توسط کیت شرکت Randox اندازه‌گیری شد (۱۱) و شاخص دوم فعالیت آنزیم کاتالاز بود که با اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت (۱۸). علت اندازه‌گیری کاتالاز در کنار مقدار آنتی‌اکسیدان تام این بود که در سیستم آنتی‌اکسیدانی چندین عامل دخالت دارند و نقش تک‌تک آنها یکسان نیست لذا فعالیت کاتالاز به عنوان شاخص دیگری از کل آنتی‌اکسیدان‌ها اندازه‌گیری گردید.

روش هموژنیزه کردن بافت به این ترتیب است که بافت مورد نظر جدا و به قطعات ریز خرد و در بافر فسفات نگهداری می‌شود (100mM;PH=7.4 (20:1w/v) ($T=5c^0$. نمونه‌ها با استفاده از ۱۰ بار گذر از یک سیستم خردکننده که در بخش فوقانی هموژنیزر قرار دارد هموژنیزه می‌شوند (۸). برای جدا کردن مایع رویی لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در حالت سکون قرار داده شدند تا باقی‌مانده‌های بافت در ته آن رسوب کنند و بعد روشناور آهسته به داخل لوله دیگری ریخته شد.

گروه سوم: در این گروه دو ساعت قبل از تزریق کاراگینین، ۱۰ میلی‌گرم لوزارتان به ازای هر کیلوگرم وزن

به حیوان داده شد(۱۵). دارو در یک سی‌سی آب حل شده و با سرنگ یک سی‌سی به حیوان خورانده شد و ۲۴ ساعت بعد مانند گروه دوم آنتی‌اکسیدان‌ها در روشناور بافت هموژنیزه شده، اندازه‌گیری گردید.

گروه شاهد: در این گروه، به جای carrageenan ،۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل در مفصل تزریق گردید و مانند گروه دوم عمل شد. مقدار ROS در روشناور بافت هموژنیزه اندازه‌گیری شد.

آنژیوتنسین L-NAME, II و کاراگینین از شرکت سیگما (انگلستان) و لوزارتان از شرکت مرک (آلمان) خریداری گردیدند.

محاسبه مقاومت عروقی: مقادیرجریان خون مفصلی قبل و بعد از هر تزریق ثبت شدند. فشار متوسط شریانی، با استفاده از منحنی فشارخون روی کاغذ فیزیوگراف با اضافه کردن $\frac{۱}{۳}$ فشار نبض(اختلاف فشار سیستولی و دیاستولی) به فشار دیاستول محاسبه شد (۱۰). مقاومت عروقی مفصل از تقسیم فشار متوسط شریانی برجریان خون مفصلی $\left(R=\frac{\Delta p}{Q}\right)$ محاسبه گردید (۱۰). آنگاه تغییرات جریان خون، فشارخون و مقاومت عروقی به صورت درصد تغییر هر متغیر و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد تغییر در متغیر X} = \frac{b-a}{a}\times ۱۰۰$$

که در آن a مقدار متغیر x قبل از مداخله و b مقدار متغیر x بعد از مداخله است.

تجزیه و تحلیل آماری: برای مقایسه مقادیر یک متغیر قبل و بعد از یک مداخله از آزمون Student Paired t استفاده شد. برای مقایسه مقادیرمتغیر ها بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ONE WAY ANOVA) و به دنبال آن Posthoc Tukey's استفاده شد. مقادیر روی نمودارها میانگین ±خطای معیار (Mean± SE) می باشند. مقادیر P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار منظور گردید.

نتایج

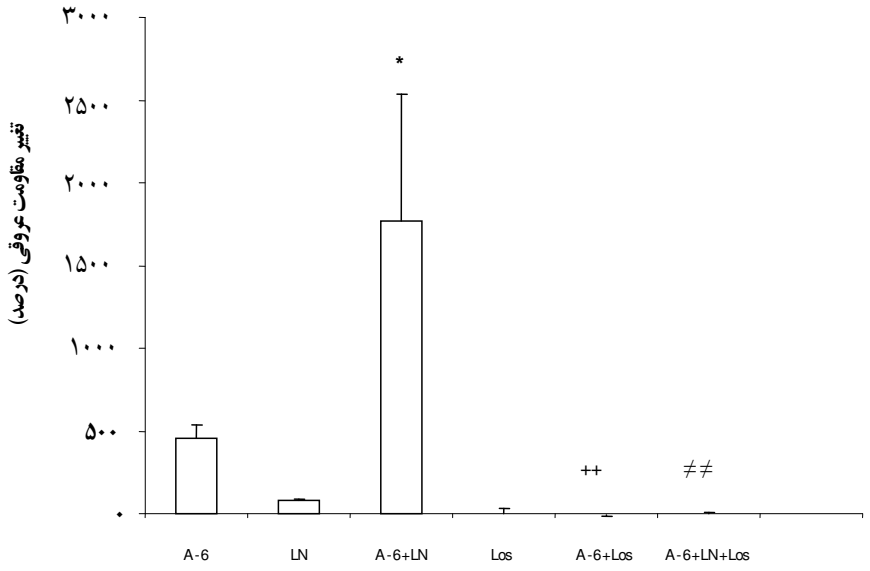
اثر آنژیوتانسین II و لوزارتان قبل و بعد از L-NAME بر مقاومت عروقی مفصل زانو:

شکل ۱، تاثیر آنژیوتانسینII با غلظت $۱۰^{-۶}$ مولار بر مقاومت عروق مفصلی را نشان می‌دهد. آنژیوتانسینII با غلظت $۱۰^{-۶}$ مولار قبل از L-NAME منجر به افزایش مقاومت عروقی به میزان۲۳۶±۴۵۷/۷ درصد (۴/۵۷ برابر) و در حضور L-NAME به میزان ۷۶۵±۱۷۴۸/۲ درصد (۱۷/۴۸ برابر) شد (P<0.01). L-NAME به تنهایی مقاومت عروق مفصلی را ۱۲/۹±۸۱/۹ درصد افزایش داد (P<۰/۰۱). لوزارتان به تنهایی تأثیری بر مقاومت عروق مفصلی نداشت. اثر بلوک‌کنندگی پاسخ انقباضی آنژیوتانسین توسط لوزارتان در حضور و غیاب L-NAME یکسان و به طور کامل بود.

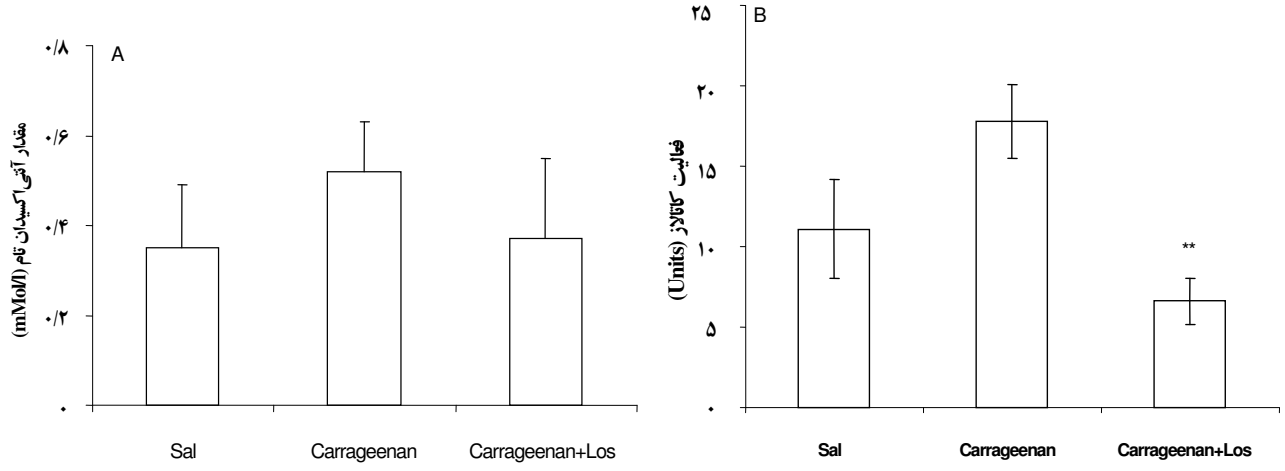
تعیین مقدار آنتی‌اکسیدان تام و فعالیت آنزیم کاتالاز:

مقدار آنتی‌اکسیدان تام درروشناور بافت هموژنیزه مفصل گروه التهابی نسبت به گروه شاهد به طور غیر معنی‌دار افزایش نشان داد (شکل۲A). میانگین این مقدار در گروه التهابی۰/۱۱±۰/۵۱ میلی‌مول در لیتر و در گروه شاهد۰/۱۳±۰/۳۴ میلی‌مول در لیتر بود. میانگین مقدار آنتی‌اکسیدان تام در گروه سوم که داروی لوزارتان دریافت کرده بودند ۰/۱۷±۰/۳۶ میلی‌مول در لیتر بود که در حد گروه شاهد است.

فعالیت آنزیم کاتالاز در روشناور بافت هموژنیزه مفصل گروه التهابی نسبت به گروه شاهد افزایش یافت اما این افزایش به مرز معنی‌داری نرسید. این میزان در دو گروه به ترتیب ۲/۳±۱۷/۸و۳/۱±۱۱/۱ واحد بود (شکل۲B). فعالیت این آنزیم در گروه سوم که داروی لوزارتان دریافت کرده بودند ۱/۴±۶/۶ واحد بود که در مقایسه با گروه التهابی کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۱).



شکل ۱: *تغییرات مقاومت عروق مفصل التهابی حاد در اثر آنژیوتانسین II ، L-NAME (LN) و متعاقب آن تکرار آنژیوتانسین II قبل و بعد از لوزارتان. در حضور LN پاسخ انقباضی آنژیوتانسین II تشدید شد. لوزارتان نیز اثرات آنژیوتانسین را به‌طور کامل مهار کرد. P<۰/۰۵ = * در مقایسه با A^{-6}، P<۰/۰۱=++ در مقایسه با A^{-6} و P<۰/۰۱=≠≠ در مقایسه با A^{6}+LN، n=۶ در هر مورد، Los=Losartan, A=AngiotensinII .*



شکل ۲: *مقدار آنتی‌اکسیدان تام (A) و فعالیت آنزیم کاتالاز (B) در روشناور بافت هموژنیزه شده مفصل زانوی خرگوش در سه گروه شاهد (Sal)، التهابی (Carrageenan) و پیش‌درمان شده با لوزارتان (Carrageenan+Los). التهاب موجب افزایش غیر معنی‌دار در تولید مقدار آنتی‌اکسیدان تام شد که این افزایش توسط لوزارتان از بین رفت. فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تأثیر التهاب افزایش یافت اما این افزایش به مرز معنی‌داری نرسید. لوزارتان موجب کاهش معنی‌دار فعالیت این آنزیم شد (P<۰/۰۱)، n=۶ در هر گروه.*

بحث

تزریق L –NAME به تنهایی موجب ۸۱٪ افزایش در مقاومت عروقی مفصل شد (شکل ۱) که تأییدکننده این است که NO در تنظیم تون پایه عروق مفصلی در شرایط التهابی نقش دارد. در مطالعه روی مفصل سالم این میزان ۲۵٪ بوده (۷) که به میزان معنی‌داری کوچکتر است ($P<0.01$) و نشان دهنده نقش بیشتر NO در تنظیم تون عروقی مفصل در شرایط التهابی و افزایش تولید این ماده در این شرایط است. پاسخ عروق مفصلی ملتهب به آنژیوتانسین II با غلظت 10^{-6} مولار در حضور L–NAME به میزان معنی‌داری شدیدتر از پاسخ در غیاب L–NAME است (شکل ۱). این امر نشان می دهد که NO در شرایط التهابی نقش انقباضی آنژیوتانسین II روی عروق مفصلی را به میزان زیادی تعدیل می‌نماید. پاسخ عروق مفصل سالم به همین دوز آنژیوتانسین II در مطالعه قبلی (۷) افزایش ۱۱۵±۶۵۳ در صد در مقاومت عروقی بعد از تزریق L–NAME و ۱۰۹±۵۰۶ در صد قبل از تزریق L–NAME بوده است ($P=0/1$). از مقایسه داده‌های دو مطالعه روی مفاصل سالم و التهابی نتیجه گرفته می‌شود که التهاب شدت پاسخ عروق مفصلی به آنژیوتانسین را تغییر نداده است ولی در حالی که در مفصل سالم NO نقش تعدیلی در پاسخ عروق به آنژیوتانسین II نداشته (۱۰) در مفصل التهابی نقش تعدیل کنندگی مهمی در پاسخ عروق به آنژیوتانسین II پیدا نموده است.

از طرف دیگر NO در شرایط التهابی موجب فعالیت سیکلواکسیژناز و افزایش تولید PGE_2 و اینترلوکین-۱ بتا (IL-1β) نیز می‌شود (۲). به همین دلیل تزریق آنژیوتانسین II متعاقب L–NAME (مهار تولید NO) موجب انقباض شدیدتری در عروق مفصلی گردیده است (شکل ۱). بنابراین می‌توان به این مسأله اشاره کرد که علی‌رغم نظر بعضی محققان مبنی بر این‌که حذف NO از طریق کاهش تولید پروستاگلندین‌ها و IL-1 در مفاصل آرتریتیک می‌تواند اثرات مفید درمانی داشته باشد (۱،۱٤)، بر اساس مشاهدات این تحقیق، حذف آن از طریق کاهش جریان خون و تشدید هیپوکسی ممکن است باعث تشدید اثرات تخریبی التهاب گردد. از آنجا که غضروف‌های مفصلی بافت‌هایی فاقد عروق هستند و برای تأمین نیازهای غذایی و اکسیژنی خود به مایع مفصلی وابسته‌اند و این مایع از جریان خون مفصل تأمین می‌شود، این امر می‌تواند تعادل بین تحویل سوبسترا و مصرف انرژی را در مفصل ملتهب مختل کند. از طرف دیگر بر اساس مطالعه دیگری آنژیوتانسین II از طریق گیرنده‌های AT_1 در پرخونی عملی اختلال ایجاد می کند (۷). لذا کاهش تولید NO می‌تواند اثرات تعدیلی آنرا بر آنژیوتانسین کاهش داده ومنجر به تشدید این اثرات آنژیوتانسین نیز گردد.

در این مطالعه مکانیسم تولید گونه‌های فعال اکسیژن طی التهاب حاد ٢٤ ساعته در مفصل زانوی خرگوش نیز مورد بررسی قرار گرفت.

شکل ۲ میزان آنتی‌اکسیدان تام را در روشناور بافت هموژنیزه مفصل زانوی خرگوش در سه گروه شاهد، التهابی و التهابی درمان شده با لوزارتان نشان می‌دهد. میزان تولید آنتی‌اکسیدان تام در گروهی که داروی لوزارتان را که یک بلوک کننده اختصاصی گیرنده‌های AT_1 می‌باشد دریافت کرده بودند، تفاوتی با حد میزان پایه آن در گروه شاهد نداشته است. از آنجا که تولید آنتی‌اکسیدان‌ها شاخصی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌باشد عدم افزایش آنها می‌تواند نشان‌دهنده دو احتمال باشد. یکی این که همان‌طور که آنژیوتانسین در تنظیم جریان خون پایه در شرایط التهاب حاد نقش نداشت (شکل ۱– اثر لوزارتان) در اینجا نیز در تولید ROS نقش نداشته باشد و التهاب به علت عوامل دیگری به غیر از ROS ایجاد شده باشدیا به عبارت دیگر التهاب ناشی از کاراگینین از مسیر ROS عمل نکرده باشد. دوم این که تأثیر این نوع التهاب بر تولید انواع مختلف ROS یکسان نباشد و در نتیجه برآیند کلی تولید ROS که آنتی‌اکسیدان تام است افزایش نشان نداده باشد. احتمال دوم بیشتر است زیرا همان طورکه در مورد فعالیت کاتالاز نشان داده شده (شکل ۲) لوزارتان توانسته میزان آنزیم کاتالاز را که یکی از

آنتی‌اکسیدان‌هاست به میزان معنی‌داری کاهش دهد. در این رابطه تحقیقات قبلی نشان داده اند که آنژیوتانسین II تولید ROS در عروق مغزی، اندوتلیوم و adventitia با واسطه NADPH-oxidase را القا می‌کند(۱۳) و این عمل از طریق گیرنده AT_1صورت می‌گیرد (۲۱).

در مطالعه حاضر نیز با توجه به کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه التهابی توسط لوزارتان (شکل ۲)، آنژیوتانسین II در تولید کاتالاز از مسیر گیرنده‌های AT_1 نقش داشته است.

محققین نشان داده‌اند که آنژیوتانسین می‌تواند تولید سوپراکسید را از طریق تحریک اکسیدازهای وابسته به NADPH/NADH واسطه‌گری کند و احتمال این که این فرایند در بین گونه‌های مختلف، متفاوت باشد وجود دارد. احتمال فعال شدن این سیستم طی افزایش استرس اکسیداتیو در انسان نیز وجود دارد (۱۲). بنابراین احتمال وجود مسیرهایی غیر از مسیر آنژیوتانسین برای تولیدROS هم در التهاب وجود دارد که یکی از آنها توسط NO است (۱). با توجه به این که در شرایط کلینیکی پزشکان بیشتر با التهابات مزمن مفصلی مواجه می‌باشند پیشنهاد می‌شود مطالعه حاضر در شرایط التهاب مزمن تکرار شود تا یافته‌های آن به بیماری‌های مزمن مفصلی قابل تعمیم گردد.

نتیجه‌گیری

NO در تنظیم تون پایه عروق مفصلی دارای التهاب حاد نقش مهمی دارد و اثرات انقباضی آنژیوتانسین II را که در این شرایط می‌تواند به صورت موضعی تولید و جریان خون مفصلی را کاهش دهد تعدیل می‌نماید. تولید کاتالاز که یکی از آنزیم‌های مهم مقابله کننده با گونه‌های فعال اکسیژن است درمفصل التهابی افزایش می‌یابد و آنژیوتانسینII از طریق گیرنده‌های AT_1خود در این پدیده نقش دارد. بنابراین وجودNO که معمولاً در شرایط التهابی از آن به عنوان یک فاکتور التهاب‌زا نام برده می‌شود بر اساس نتایج این مطالعه دارای اثرات مفید می‌باشد.

مقاله حاضر از پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی به شماره ثبت ۳۱۱۷ و مورخه مهر ۱۳۸۵ دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان: «بررسی پاسخ عروق مفصلی به آنژیوتانسین IIو تعیین نوع گیرنده‌های آن و نقش گونه‌های فعال اکسیژن و نیتریک اکسید در التهاب حاد مفصلی در خرگوش» استخراج گردیده است.

Summary

Role of Angiotensin II in Reactive Oxygen Species Production and Modulatory Role of Nitric Oxide (NO) in Vessel Responses to AngII in Acute Joint Inflammation in the Rabbit

Najafipour H., Ph.D.[1], Sadeghi N., B.Sc.[2], Gholamhosseinian A., Ph.D.[3]

1. Professor of Physiology, School of Medicine & Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 2. M.Sc. Student of Physiology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. 3. Associate Professor of Biochemistry, School of Medicine & Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

Introduction: It has been approved that in most tissues NO production increases during acute inflammation and Angiotensin II has a role in production of reactive oxygen species (ROS). As regulation of joint blood flow (JBF) is important in this situation, this study was performed to investigate the interaction of local Ang II and ROS production and the modulatory role of NO on regulation of JBF during acute inflammation.

Methods: The study was performed on 24 Newzealand white rabbits divided into three experimental and one control groups. Acute knee joint inflammation was produced by intraarticular injection of 0.5 ml of a 2% solution of carrageenan in knee joint. In the first group after 24 hours animals were anesthetized by thiopental sodium and carotid artery, jugular vein and saphenous artery were cannulated for recording blood pressure, injection of L-NAME and local injection of AngII and losartan respectively. Blood flow was

recorded by laser Doppler flow meter. Joint vascular resistance (JVR) was calculated by dividing arterial blood pressure (ABP) by JBF. In the second group, knee joint tissue was used for homogenization and ROS measurement .In the third group, Losartan (10mg/kg) was administrated orally 2 hours before induction of inflammation.

Results: L-NAME increased JVR significantly. JVR in response to AngII was significantly increased. This response was significantly potentiated by L-NAME (P<0.01). Losartan completely blocked the effect of AngII on JVR. Data showed that total amount of antioxidant and catalase activity nonsignificantly increased in inflamed group. Losartan significantly returned the catalase activity of the inflamed joint to the control level (P<0.01).

Conclusion: NO plays a role in the regulation of joint vascular tone and modulates the AT_1 receptor response to AngII in acutely inflamed joints. Ang II increased the production of ROS and as a result the amount of antioxidants in acutely inflamed joints and this is via angiotensin II and through AT_1 receptors.

Key words: Angiotensin II, Nitric oxide, Reactive oxygen species , acute inflammation, Carragenan, knee joint, Rabbit

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2007; 14(3): 185-193

References

1. Cuzzocrea S. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in arthritis. *Curr Pharm Des* 2006; 12(27): 3551-70.
2. de Mello SB, Novaes GS, Laurindo IM, Muscara MN, Maciel FM, Cossermelli W. Nitric oxide synthase inhibitor influences prostaglandin and interleukin-1 production in experimental arthritic joints. *Inflamm Res* 1997; 46(2): 72-7.
3. Fay J, Varoga D, Wruck CJ, Kurz B, Goldring MB, Pufe T. Reactive oxygen species induce expression of vascular endothelial growth factor in chondrocytes and human articular cartilage explants. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(6): R189.
4. Ferrel AJ, Blake DR, Palmer RM,Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992; 51(11): 1219-22.
5. Haruna Y, Morita Y, Komai N, Yada T, Sakuta T, Tomita N, et al. Endothelial dysfunction in rat adjuvant-arthritis: Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase and uncoupled endothelial nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 2006; 54(6): 1847-55.
6. Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration:cause,effect or association? *J Clin Invest* 2003; 111(2): 163-9.
7. Kazama K, Wang G, Frys K, Anrather J, Iadecola C. Angiotensin II attenuates functional hyperemia in the mouse somatosensory cortex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(5): H1890-9.
8. Lawler JM, Song W, Demaree SR. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(1): 9-16.
9. Najafipour H. Alteration in α- and β-Adrenoceptor profile of rabbit knee joint blood vessels due to acute inflammation. *Exp Physiol* 2000; 85(3): 267-73.
10. Najafipour H, Ketabchi F. The receptors and role of angiotensin II in knee joint blood flow regulation and role of nitric oxide in modulation of their function. *Microcircclation* 2003; 10(5): 383-90.
11. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative

stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* 1997; 43(7): 1209-14.

12. Omland T, Johnson W, Gordon MB, Creager MA. Endothelial function during stimulation of renin-angiotensin system by low-sodium diet in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(5): H2248-54.
13. Pagano PG, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. localization of a constitutively active, phagocyte –like NADPH-oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(26): I4483-I4488
14. Salvemini D, Seibert K, Masferrer JL, Settle SL, Misko TP, Currie MG, et al. Nitric oxide and cyclooxigenase pathway. Adv prostaglandin. *Tromb Oxane Leukot Res* 1995; 23: 491-3.
15. Sanz M, Ganado P, Tejerina T. Two angiotensin AT_1 receptor antagonists, irbesartan and losartan, effects in cholestrol-fed rabbits. *Eur J Pharmacol* 2002; 442(1-2): 99-106.
16. Shackelford R, Kaufmann WK, Paules RS. Cell cycle control, checkpoint mechanisms,and genotoxic stress. Environ Health *Perspect* 1999; 107 suppl 1: 5-24.
17. Stefanovic-Racic M, Meyers K, Meschter C, Coffey JW, Hoffman RA, Evans CH. Comparison of the nitric oxide inhibitors methylarginine and aminoguanidine as prophylactic and therapeutic agents in rat adjuvant induced arthritis. *J Rheum* 1995; 22(10): 1922-8.
18. Visick JE, Clarake S. RpoS- and OxyR-Independent induction of HPI catalase at stationary phase in Escherchia coli and identification of rpoS mutations in common laboratory strains. *J Bacteriol* July 1997; 179(13): 4158-4163.
19. Walsh DA, Catravas J, Wharton J. Angiotensin converting enzyme in human synovium: increased stromal [^{125}I] 351A binding in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59(2): 125-31.
20. Wang HD, Johns DG, Xu S, Cohen RA. Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensi II . *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282(5): H1697-702.
21. Wang JH, Redmond HP, Watson RW, Bouchier-Hayes D. Induction of human endothelial cell apoptosis requires both heat shock and oxidative stress responces. *Am J Physiol* 1997; 272(5 pt 1): C1543-51.
22. Wassmann S, Nickenig G. Interrelationship of free oxygen radicals and endothelial dysfunction: modulation by statins. *Endothelium* 2003; 10(1): 23-33.