تحقیقی

اثر محافظتی محلول‌های نگهدارنده کربس حاوی وراپامیل، پروپرانولول و آدرنالین در مقایسه با کربس و خون هپارینه بر سلول‌های اندوتلیال ورید صافن خوکچه هندی

دکتر مجید ملک زاده شفارودی[۱]، میترا شکری[۲]، دکتر زهره زارع[۱]، دکتر علیرضا رفیعی[۳]

دکتر محمدعلی ابراهیم زاده[٤]، رضا مرادپور[٥]، دکتر نوراله رضایی*[٦]

۱- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری ، ایران. ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم تشریح، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری ، ایران. ۳- استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.٤- استاد، مرکز تحقیقات شیمی دارویی، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.٥- دانشجوی کارشناسی مهندسی پزشکی، گروه مهندسی، مؤسسه آموزش عالی غیرانتفاعی روزبهان، ساری، ایران. ٦- دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *سلامت پوشش اندوتلیال ورید صافن برداشته شده از مهم‌ترین عناصر کلیدی سلامت رگ خونی برای باز بودن طولانی مدت آنها پس از پیوند در جراحی عروق کرونر است. نوع محلول ذخیره‌سازی قبل از پیوند نقش مهمی در حفظ اندوتلیوم ورید دارد. این مطالعه به منظور تعیین اثر محافظتی محلول های نگهدارنده کربس حاوی وراپامیل، پروپرانولول و آدرنالین در مقایسه با کربس و خون هپارینه بر سلول‌های اندوتلیال ورید صافن خوکچه هندی انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه تجربی روی ۲۸ سر خوکچه هندی نر با وزن تقریبی ۳۸۰ گرم انجام شد. برای جداسازی حلقه‌های ۳ میلی‌متری ورید صافن و سنجش نیتریک اکسید آزاد شده از اندوتلیوم آنها در محلول‌های نگهدارنده شامل کربس حاوی داروی وراپامیل، کربس حاوی پروپانولول و کربس حاوی آدرنالین در مقایسه با خون هپارینه (کنترل اول) و کربس خالص (کنترل دوم) در زمان‌های ۳۰، ٤٥، ٦۰ و ۹۰ دقیقه توسط واکنش گریس به روش میکروپلیتی مورد آزمایش قرار گرفتند. همچنین از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین برای مطالعه بافتی استفاده گردید.*

یافته ها : *میانگین غلظت نیتریک اکسید در محلول کربس وراپامیل در مقایسه با خون هپارینه، کربس خالص، کربس آدرنالین و کربس پروپرانولول افزایش آماری معنی داری نشان داد (P<۰/۰۵). همچنین بیشترین میزان غلظت نیتریک اکسید در فاصله زمانی ٤٥ دقیقه از برداشت رگ خونی ظاهر شد. مطالعه بافتی نشان داد لایه اندوتلیوم تنها در محلول کربس وراپامیل مشابه گروه کنترل کاملاً سالم بود؛ اما در بقیه محلول‌ها سلول‌های انتیمای عروقی به‌درجات متفاوت دچار آسیب شدند.*

نتیجه‌گیری : *به‌نظر می‌رسد محلول کربس وراپامیل، مناسب‌ترین محلول برای حفظ و نگهداری فیزیولوژی طبیعی سلول‌های اندوتلیال ورید صافن در مدل حیوانی است.*

کلید واژه‌ها : *اندوتلیوم ، ورید صافن ، محلول کربس، وراپامیل ، نیتریک اکسید ، خوکچه هندی*

* نویسنده مسؤول : دکتر نوراله رضائی ، پست الکترونیکی nourrezaei@gmail.com

نشانی: ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و زیست شناسی سلولی

تلفن ۳۳٥٤۳۲٥۰-۰۱۱ ، نمابر ۳۳٥٤۳۲٤۹

وصول مقاله : ۱۳۹٥/۱۲/۱٤ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹٦/۳/٦ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٦/٤/۱۳

دکتر مجید ملک زاده شفارودی https://orcid.org/0000-0003-0488-3499 ، دکتر نوراله رضایی https://orcid.org/0000-0003-1741-1909

مقدمه

بیماری‌های قلبی - عروقی، علت عمده مرگ و میر در سراسر جهان و از جمله ایران بوده و بیش از ۳۰ درصد از موارد مرگ و میر سالیانه را به خود اختصاص می‌دهند (۱). براساس برآورد انجام شده تا سال ۲۰۲۰، بیماری‌های قلبی - عروقی به‌ویژه آترواسکلروز در سراسر جهان سردسته بیماری‌هایی خواهند بود که کارایی مفید افراد را به دلیل از کارافتادگی و مرگ زودرس کاهش می‌دهند (۲). بیماری عروق کرونر شایع ترین علت مرگ در سالمندان است (۳). پیوند عروق کرونر قلب یک گزینه درمانی است که به‌طور گسترده برای ترمیم شریان‌های کرونر دچار تنگی به دلایلی چون آنژین صدری مداوم یا عدم پاسخگویی به درمان‌های دارویی ویا طولانی شدن زندگی در زیر مجموعه‌های در معرض خطر به انجام می‌رسد

(۴). یکی از عناصر کلیدی برای موفقیت این نوع از پیوند برای مدت طولانی، سلامت اندوتلیوم عروق پیوندی است (۵). ورید صافن اتولوگ به‌عنوان رایج‌ترین رگ مورد استفاده برای جراحان قلب و عروق است (۶). یکی از مشکلات اینگونه پیوندهای عروقی آن است که نتایج طولانی‌مدت گرافت‌های وریدی ضعیف است (۷). به‌طوری که ۲۰-۱۰ درصد از این گرافت‌ها در یکسال اول بعد از جراحی و ۵۰ درصد آنها بعد از ۱۰ سال دچار انسداد مجدد خواهند شد (۸). بعد از ده سال، حدود ۶۵درصد از گرافت‌های ورید صافن باز مانده و ۵۰ درصد آنها علایمی از آترواسکلروز را در آنژیوگرافی نشان می‌دهند. ۲۰ سال بعد از گرافت بای‌پس شریان کروناری، تنها ۲۵درصد از گرافت‌های ورید صافن جریان خون کافی را فراهم می‌کنند. توسعه تکثیر لایه اینتیمای جدید، ارتباط مستقیمی با میزان ضعیف جریان خون درگرافت‌های ورید صافن دارد (۹). اساس فیزیولوژیکی شکست گرافت وریدی، به ترومبوز زودرس و هایپرپلازی اینتیما نسبت داده شده است (۱۰) که تخریب سلول‌های اندوتلیال عامل اصلی این دو مورد شناخته شده است (۱۱). به‌طوری که گفته می‌شود نرخ ضعیف باز بودن لومن گرافت‌های وریدی با افزایش تزاید اینتیما نسبت مستقیم دارد (۱۲). حفظ دقیق پوشش اندوتلیال وریدهای برداشته شده در طول جراحی بدون شک مهم‌ترین عامل برای تعیین نرخ باز بودن پس از بای‌پس است. تمامیت پوشش اندوتلیال تحت تاثیر عواملی نظیر روش برداشت و محلول‌های ذخیره‌سازی ورید در طول عمل جراحی است (۱۳). رادیکال نیتریک اکسید (Nitric Oxide: NO) با عامل منبسط کننده مشتق از اندوتلیوم (Endothelium-derived Relaxing Factor: EDRF) یکسان بوده و نشانگر یکپارچگی سلول‌های اندوتلیال محسوب می‌گردد که در شرایط معمول پیوسته از اندوتلیوم آزاد می‌شود (۱۴و۱۵) و نقش محوری در تنظیم انقباض عروقی و همئوستاز بازی می‌کند (۱۶). همچنین جلوگیری از تجمع پلاکت‌ها (۱۶)، تزاید سلول‌های عضلانی صاف (۱۷) و چسبندگی لکوسیت‌ها به این عامل نسبت داده می‌شود. همچنین سبب غیرفعال شدن استرس اکسیداتیو می گردد (۱۸). نقصان تولید نیتریک اکسید نشان‌دهنده کاهش عملکرد اندوتلیوم است (۱۹و۲۰). تعیین رادیکال نیتریک اکسید به‌خودی‌خود به‌خاطر نیمه‌عمر کوتاه ۳۰-۲ ثانیه آن کار مشکلی است. بنابراین از واکنش گریس برای تعیین محصولات نهایی پایدار رادیکال NO یعنی نیتریت و نیترات در پلاسما استفاده می‌گردد. غلظت NO براساس نانومولار و میزان انتشار پایه آن به‌صورت طبیعی از اندوتلیوم وریدهای صافن به میزان ۱۰ نانومولار درنظر گرفته می‌شود (۲۱و۲۲).

محلول کربس یکی از کاربردی‌ترین محلول‌های نگهدارنده فیزیولوژیکی در آزمایشات in vitro عروقی است. تلفیق دارو و کربس می‌تواند رهگشای راهی به‌سوی یافتن محلول نگهدارنده با کارایی بالاتر و برای مدت طولانی‌تر به منظور حفظ هرچه بهتر اندوتلیوم عروقی در جراحی‌های بای‌پس برای دوام بیشتر رگ جایگزین در جهت افزایش طول عمر بافت و به طبع آن موجود زنده جانوری و یا انسان باشد. خون هپارینه خود می‌تواند به‌عنوان عاملی برای تخریب اندوتلیوم عروقی عمل نموده و دوام جراحی بای‌پس را به خطر اندازد (۲۳). این مطالعه به منظور تعیین اثر محافظتی محلول‌های نگهدارنده کربس حاوی وراپامیل، پروپرانولول و آدرنالین در مقایسه با کربس و خون هپارینه بر سلول‌های اندوتلیال ورید صافن خوکچه هندی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۲۸ سر خوکچه هندی نر از نژاد هیمالیایی با وزن تقریبی ۴±۳۸۰ گرم تهیه شده از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران طی سال ۱۳۹۴ انجام شد.

پروتکل اخلاقی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. خوکچه‌های هندی به مدت یک هفته با دسترسی آسان به آب و غذای کافی و نور مناسب در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی مازندران نگهداری شدند.

در روز آزمایش خوکچه‌ها با استفاده از اتر بیهوش شدند. بلافاصله با سرنگ ۵ سی‌سی خون از قلب آنها گرفته و در لوله‌های هپارینه ریخته شد. سپس ورید صافن با حداقل دستکاری و آسیب جدا شد و به حلقه‌های ۳ میلی‌متری (۴ حلقه در هر گروه) برش گردید (۲۴) و داخل محلول‌های نگهدارنده به شرح زیر که هرکدام به میزان ۵ میلی‌لیتر در ظروف شیشه‌ای مخصوص ریخته شده بودند؛ قرار گرفت.

گروه کنترل : نرمال؛ گروه کنترل اول : خون هپارینه و گروه کنترل دوم : کربس.

گروه تجربی اول (کربس مخلوط با وراپامیل): وراپامیل ۵ میلی‌گرم در ۲ میلی‌لیتر بود که به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به یک لیتر محلول کربس اضافه گردید.

گروه تجربی دوم (کربس مخلوط با پروپرانولول): پروپرانولول (جرم مولی ۲۵۹/۳۴) به میزان ۶/۶۶ گرم حل شده به یک لیتر محلول کربس اضافه شد.

گروه تجربی سوم (کربس مخلوط با آدرنالین): آدرنالین یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که در حجم ۲۰۰ میکرولیتر به یک لیتر محلول کربس اضافه گردید.

محلول کربس مورد استفاده شامل NaCl (۱۱۸/۵ میلی‌مولار)، KCl (۴/۷۴ میلی‌مولار)، CaCl (۵/۲ میلی‌مولار)، MgSO4 (۱/۱۸ میلی‌مولار)، NaHCO3 (۲۴/۹ میلی‌مولار)، KH2PO4 (۱/۱۸ میلی‌مولار)، Glucose+D (۱۰ میلی‌مولار) بود (۲۵).

محلول‌ها با مخلوطی از اکسیژن ۹۵درصد و گاز کربنیک

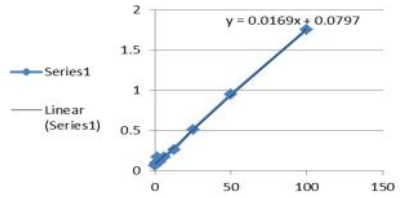
۵درصد حباب‌دهی شده و در دمایی نزدیک به ۳۷ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های مختلف ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۹۰ دقیقه از زمان برداشت (Harvesting) به صورت جداگانه در محلول‌های نگهدارنده قرار داده شدند.

در هر کدام از نمونه‌ها به دلیل تداخل کدورت ناشی از رسوب پروتئین، مرحله پروتئین‌زدایی برای نمونه‌های سرمی و پلاسمایی در واکنش گریس انجام شد. ابتدا خون با سرعت ۲۵۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و پلاسمای خون جداسازی شد. سپس نمونه‌های پلاسما توسط آب مقطر چهار برابر رقیق گشته و سپس پروتئین‌زدایی از طریق اضافه کردن ۱/۲۰ حجم سولفات روی با غلظت ۳۰۰ گرم بر لیتر برای رسیدن به غلظت نهایی ۱۵ گرم بر لیتر انجام گردید (۱۸). محلول حاصل به مدت ۵دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ gسانتریفوژ شد و از این محلول برای اندازه‌گیری غلظت نیتریت و نیترات تام (NOx) استفاده شد.

اندازه‌گیری نیتریک اکسید با استفاده از واکنش گریس: برای اندازه‌گیری غلظت نیتریت و نیترات تام، در چاهک‌های مختلف یک میکروپلیت الایزا ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر پلاسمای پروتئین‌زدایی شده؛ همچنین ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از محلول‌های مورد آزمون براساس زمان‌های مختلف ۳۰ تا ۹۰ دقیقه ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط (یک به یک) سولفانیل آمید و ۱۰۰ میکرولیتر N- نفتیل اتیلن دیامین دی هیدروکلراید افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در فضای تاریک قرار گرفت تا واکنش انجام شود. در نهایت جذب نوری ماده رنگی حاصل در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش‌گر الایزا (اسپکتروفوتومتر H1 Sinergy) خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌ها محاسبه گردید (۲۴).

نمونه‌های بافتی: بعد ازخارج کردن ورید از داخل محلول‌ها با زمان‌های مختلف ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۹۰ دقیقه بلافاصله ورید در داخل محلول پارافرمالدهید ۱۰ درصد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها وارد مرحله پردازش بافتی و قالب‌گیری با پارافین شدند. توسط میکروتوم برش هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد و در نهایت برش ها برای شمارش سلول‌های اندوتلیال جدا شده با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شده و زیر میکروسکوپ نوری (مدل زایس، ساخت آلمان) مورد بررسی قرار گرفتند (۲۶). منحنی و فرمول استاندارد غلظت NO در نمودار یک آمده است.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 تجزیه و تحلیل شدند. از آزمون One-Way ANOVA و Tukey test برای یافتن مناسب‌ترین محلول نگهداری ورید صافن و از آزمون Repeated measurement برای تعیین بهترین زمان استراحت (Resting Period) رگ خونی برای حداکثر میزان ترشح NO که دلالت بر بهترین عملکرد اندوتلیوم عروقی بود؛ استفاده گردید. سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.



نمودار ۱ : نمودار استاندارد غلظت‌های ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار

یافته‌ها

تفاوت میانگین و انحراف معیار غلظت‌های NO در زمان‌های ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۹۰ دقیقه گروه کنترل اول به ترتیب با مقادیر ۳/۸۷±۰/۲۸، ۳/۸۰±۰/۲۹، ۴/۳۳±۰/۷ و ۳/۷۱±۰/۸ در مقایسه با گروه کنترل دوم به ترتیب با مقادیر ۳/۸۷±۰/۲۳، ۳/۹۵±۰/۳۱، ۳/۷۰±۰/۲۴ و ۴/۱۹±۰/۴۴ از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول یک).

میانگین غلظت NO در گروه تجربی اول نسبت به گروه‌های کنترل اول و کنترل دوم در زمان‌های ۳۰ دقیقه (P=۰/۰۰۰۱) و ۴۵ دقیقه (P=۰/۰۰۱) افزایش آماری معنی دار یافت. همچنین این میزان در گروه تجربی اول نسبت به گروه کنترل اول در زمان ۶۰ دقیقه (P=۰/۰۳) و زمان ۹۰ دقیقه (P=۰/۰۰۸) و نسبت به گروه کنترل دوم در زمان ۶۰ دقیقه (P=۰/۰۰۶) و زمان ۹۰ دقیقه (P=۰/۰۲) افزایش آماری معنی‌داری نشان داد (جدول یک).

میانگین غلظت NO در گروه تجربی اول به ترتیب با مقادیر ۸/۳۸±۱/۳۵، ۹/۸۱±۱/۹۳، ۷/۴۴±۱/۴۶ و ۷/۷۶±۱/۷۶ نسبت به گروه تجربی دوم به ترتیب با مقادیر ۴/۲۱±۰/۲، ۴/۵۱±۰/۳۱، ۳/۹۶±۰/۱۹ و ۳/۹۶±۰/۱۹ در زمان‌های ۳۰ دقیقه (P=۰/۰۰۰۱)، ۴۵ دقیقه (P=۰/۰۰۳)، ۶۰ دقیقه (P=۰/۰۰۴) و ۹۰ دقیقه (P=۰/۰۱) افزایش آماری معنی‌داری یافت (جدول یک).

میانگین غلظت NO در گروه تجربی اول نسبت به گروه تجربی سوم به ترتیب با مقادیر ۵/۱±۰/۴۴، ۵/۳۸±۱/۱۶، ۳/۶۰±۰/۳۴ و ۳/۵۵±۰/۲۸ در زمان‌های ۳۰ دقیقه (P=۰/۰۰۷)، ۴۵ دقیقه (P=۰/۰۲)، ۶۰ دقیقه (P=۰/۰۰۴) و ۹۰ دقیقه (P=۰/۰۰۵) افزایش آماری معنی‌داری یافت (جدول یک).

میانگین غلظت NO در گروه تجربی دوم نسبت به گروه های کنترل اول و کنترل دوم در زمان‌های ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۹۰ دقیقه از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول یک).

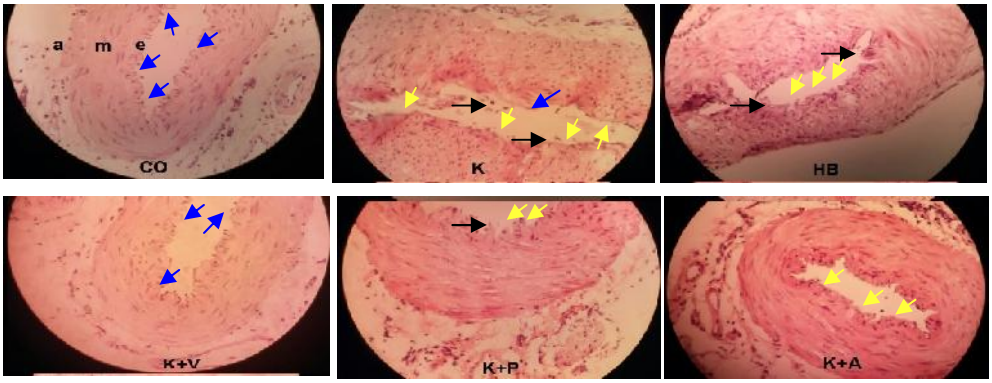
میانگین غلظت NO در گروه تجربی سوم نسبت به گروه‌های تجربی دوم، کنترل اول و کنترل دوم در زمان های ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۹۰ دقیقه از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول یک).

با مقایسه میانگین زمان‌های مختلف مورد مطالعه، میانگین مربوط به زمان ۴۵ دقیقه نسبت به بقیه زمان‌ها افزایش نشان داد که این

جدول ۱ : مقایسه میانگین و انحراف معیار غلظت نیتریک اکسید در در زمان‌های ۳۰، ٤٥، ٦٠ و ۹۰ دقیقه برای حفظ و نگهداری ورید صافن خوکچه هندی در گروه‌های کنترل و تجربی مورد مطالعه

گروه‌ها	میانگین و انحراف معیار غلظت نیتریک اکسید			
	۳۰ دقیقه	٤٥ دقیقه	٦٠ دقیقه	۹۰ دقیقه
کنترل اول (خون هپارینه)	۳/۸۷± ۰/۲۸	۳/۸۰± ۰/۲۹	٤/۳۳± ۰/۷	۳/۷۱± ۰/۸
کنترل دوم (کربس)	۳/۸۷± ۰/۲۳	۳/۹٥± ۰/۳۱	۳/۷۰± ۰/۲٤	٤/۱۹± ۰/٤٤
تجربی اول (کربس مخلوط با وراپامیل)	۸/۳۸± ۱/۳٥ *	۹/۸۱± ۱/۹۳ *	۷/٤٤± ۱/٤٦ *	۷/۷٦± ۱/۷٦ *
تجربی دوم (کربس مخلوط با پروپرانولول)	٤/۲۱± ۰/۲	٤/٥۱± ۰/۳۱	۳/۹٦± ۰/۱۹	۳/۹٦± ۰/۱۹
تجربی سوم (کربس مخلوط با آدرنالین)	٥/۱± ۰/٤٤	٥/۳۸± ۱/۱٦	۳/٦۰± ۰/۳٤	۳/٥٥± ۰/۲۸

* P<۰/۰٥ گروه تجربی اول نسبت به دیگر گروه‌ها



شکل ۱ : فتومیکروگراف لایه‌های مختلف جدار ورید صافن خوکچه هندی در محلول‌های نگهدارنده مختلف در زمان ٤٥ دقیقه
لایه اندوتلیوم به‌جز در محلول کربس مخلوط با وراپامیل در دیگر گروه‌ها به درجاتی دچار آسیب شده است.
کنترل (CO)، خون هپارینه (HB)، کربس (K)، کربس مخلوط با وراپامیل(K+V)، کربس مخلوط با پروپرانولول (K+P)، کربس مخلوط با آدرنالین (K+A) اندوتلیوم (e)، لایه سلول عضلانی (m) و لایه ادوانتیس (a)
اندوتلیوم سالم (فلش آبی رنگ)، اندوتلیوم در حال ریزش (فلش سیاه)، اندوتلیوم ریزش یافته (فلش زرد رنگ)
بزرگ نمایی x٤۰۰

افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود (P=۰/۰۲).

مقاطع تهیه شده از ورید صافن در شکل یک نشان داده شده است. در شکل کنترل (CO)، بدون استفاده از هرگونه محلول، سلول‌های لایه اندوتلیوم کاملاً سالم بودند. در مقاطع بافتی گروه تجربی اول اندوتلیوم سالم در تمامی لومن رگ قابل شناسایی بود. در مقاطع بافتی گروه‌های کنترل اول و کنترل دوم و گروه‌های تجربی دوم و سوم درجات بالایی از ریزش اندوتلیالی و مناطق وسیعی از انتیمای فاقد پوشش اندوتلیالی مشاهده شد (شکل یک).

پس از انجام مطالعه بافتی و تعیین سلامت بیش از ۵۰ درصدی سلول های اندوتلیال ورید صافن و انجام مجدد آزمون آماری و مقایسه میانگین غلظت NO گروه های مورد مطالعه در زمان‌های ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۹۰ دقیقه، افزایش میانگین غلظت گروه تجربی اول در تمامی زمان‌ها نسبت به گروه های کنترل اول و کنترل دوم و نیز نسبت به گروه های تجربی دوم و سوم افزایش آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵).

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه تنها میانگین غلظت NO در تمامی زمان‌های ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۹۰ دقیقه در محلول کربس حاوی وراپامیل نسبت به محلول‌های خون هپارینه، کربس، کربس آدرنالین و کربس پروپرانولول افزایش آماری معنی‌داری نشان داد؛ اما بین میانگین غلظت نیتریک اکسید در محلول‌های دیگر این مطالعه اختلاف آماری معنی‌داری یافت نشد. بنابراین محلول کربس حاوی وراپامیل در میان سه داروی کاربردی و همچنین خون هپارینه بیشترین میزان کارایی را در حفظ فیزیولوژی اندوتلیوم عروقی دارند. در بررسی مقاطع بافتی نیز این یافته تایید شد.

Di Napoli و همکاران مطالعه‌ای بر روی اثر داروی وراپامیل بر تغییرات پس از ایسکمی در مویرگ‌های کرونری با دوز مشابه با مطالعه ما بر روی موش صحرایی انجام دادند. دوز پایین وراپامیل منجر به کاهش موثر تغییرات پس از ایسکمی در عروق کرونر قلب موش ها گردید (۲۷) که نتایج مطالعه ما را در رابطه با حفظ معنی‌دار اندوتلیوم ورید صافن در محلول کربس حاوی وراپامیل تایید می‌کند. مطالعه Roubos و همکاران بر روی بهبود محافظت گرافت‌های ورید صافن با استفاده از محلول وراپامیل گلیسریل نیترات در طول برداشت ورید صافن انجام گردید که با نتایج مطالعه حاضر در رابطه با حفظ کاراتر پوشش اندوتلیال ورید صافن همخوانی داشت (۲۳). در مطالعه ای که Tsakok و همکاران بر روی ذخیره‌سازی گرافت ورید صافن در دو محلول خون هپارینه و سالین انجام دادند؛ ذخیره‌سازی وریدهای حیوانی در محلول خون هپارینه اثر چندانی در محافظت از اندوتلیوم در مقایسه با محلول سالین نشان نداد (۲۸) که نتایج این مطالعه را مبنی بر موثر نبودن خون هپارینه در

حفاظت از اندوتلیوم ورید صافن تایید می‌کند.

در مطالعه حاضر در تمامی موارد سنجش محلول‌های پایه کربس حاوی داروهای وراپامیل، آدرنالین و پروپرانولول و نیز دو گروه کنترل، بیشترین میزان غلظت NO در زمان ۴۵ دقیقه بود. Schwartz و همکاران مطالعه‌ای بر روی تخریب مورفولوژیکی و عملکردی اندوتلیوم وریدهای ژوگولار خارجی ذخیره شده در نرمال سالین هپارینه با هدف ارزیابی اثر ذخیره‌سازی در نرمال‌سالین بر عملکرد اندوتلیوم و عضله صاف وریدها در خرگوش، هم در محلول کربس با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و هم نرمال‌سالین هپارینه در دمای اتاق برای یک ساعت بدون متورم ساختن آنها و بدون هیچگونه کشش و فشاری در محیط آزمایشگاه انجام دادند. استراحت وابسته به استیل کولین در قطعات ذخیره شده در کربس تفاوت معنی‌داری با گروه‌های ذخیره نشده و کنترل نداشت (۲۹). در مطالعه حاضر علاوه بر زمان یک ساعت، از بازه‌های زمانی مختلف برای سنجش تغییرات تدریجی اندوتلیوم استفاده شد.

Suciu (۳۰) و Puca و همکاران (۳۱) نشان دادند که اندوتلیوم عروق نقش مهمی در تنظیم تون عروقی دارد. به‌طوری که از دست‌دادن یکپارچگی عملی اندوتلیوم عروقی با ضایعه تولید NO ارتباط دارد (۳۰و۳۱). دستکاری ورید صافن در هنگام برداشت آن منجر به کاهش در EDRF می‌گردد که با از دست رفتن و دنوده شدن مشخص اندوتلیوم مرتبط است (۳۲). علاوه بر این EDRF عضلات صاف مجاور را از اثرات همزمان ترکیبات هومورال آزاد شده از پلاکت‌های فعال حفظ می‌کند. بررسی متغیرهای همودینامیک نشان داد که وراپامیل در حفاظت از عملکرد مکانیکی قلب و همچنین برای حفاظت یکپارچگی ساختارهای سلولی و غشایی موثر است. با استناد به این خصوصیت وراپامیل می‌توان گفت این دارو ممکن است از طریق حفظ ساختارهای سلولی و غشایی اندوتلیوم ورید صافن برای ذخیره‌سازی آنها مناسب‌تر از سایر محلول‌ها باشد. همچنین وراپامیل بلوک کننده کانال کلسیمی است و اثر مستقیم بر حفاظت و یکپارچگی عروق به‌خصوص مویرگ‌ها دارد. به طوری که بلوک‌کننده‌های کانال کلسیم مانع از تجمع کلسیم در بافت شده و سلول‌ها را از تخریب محافظت می‌کنند. زیرا تجمع کلسیم در بافت‌ها منجر به انسداد و کاهش جریان خون می‌گردد. بنابراین اثر محافظتی این دارو از این لحاظ نیز می‌تواند مفید باشد. همچنین این دارو اثر اتساعی روی عروق پیوندی داشته که منجر به نفوذ بیشتر جریان خون خواهند شد (۳۳). زیرا بلوک‌کننده‌های کانال‌های کلسیمی یون کلسیم آزاد داخل سلولی را کاهش داده و سبب وازودیلاتاسیون می‌شوند. از آنجایی که یون کلسیم داخل سلولی سیگنالی برای فعال کردن کیناز زنجیر سبک میوزین و عامل انقباض درعضله صاف است؛ این آنزیم زنجیرهای سبک تنظیم کننده میوزین را فسفریله می‌کند. سپس با ایجاد پل‌های عرضی با فیلامان های نازک اکتین تولید نیرو می‌نماید. پل‌های عرضی به‌وسیله فسفاتاز زنجیر سبک میوزین دفسفریله شده منجر به شل شدن یا ریلکسیشن می‌شود. زمانی که اندوتلیوم رگ آسیب ببیند؛ عمل آنتی پلاکتی EDRF نظیر NO و پروستاگلاندین I از بین می‌رود و پلاکت‌ها به ناحیه آسیب دیده اندوتلیوم می‌چسبند و منجر به انسداد رگ پیوند شده می گردند (۳۴). پیشنهاد می‌گردد به منظور حفظ یکپارچگی و سلامت سلول‌های اندوتلیال وریدهای پیوندی برای مدت طولانی‌تر از محلول پایه کربس همراه با وراپامیل به‌جای خون هپارینه استفاده گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که اثر محافظتی محلول کربس حاوی وراپامیل بر سلول‌های اندوتلیال ورید صافن پیوندی نسبت به خون هپارینه، محلول کربس خالص، کربس حاوی آدرنالین و کربس حاوی پروپرانولول بسیار کاراتر است. در این میان مناسب‌ترین زمان (Resting Period)، برای نگهداری ورید صافن حیوانی پس از جداسازی در محلول کربس حاوی وراپامیل ۴۵ دقیقه بود که می‌توان نتیجه گرفت اندوتلیوم وریدهای صافن پیوندی تا زمان ۴۵ دقیقه کارایی خود را برای آزادسازی NO حفظ می‌کنند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۱۹۳۶-۹۵) خانم میترا شکری برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریح از دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران بود. همچنین این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی (شماره ۱۷۰۵-۹۴) مصوب مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی ومولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری آن دانشگاه به انجام رسید. بدین‌وسیله از همه آنها سپاسگزاری به‌عمل می آید. همچنین مؤلفین اظهار می‌نمایند که هیچگونه تضاد منافعی در رابطه با انتشار این مقاله وجود ندارد.

References

1. Allen JK. Coronary risk factor modification in women after coronary artery bypass surgery. Nurs Res. 1996 Sep-Oct; 45(5):260-5.

2. Antman EM, Selwyn AP, Braunwald E, Loscalzo J. Ischemic heart disease. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (eds). Harrison's Principle of Internal Medicine. 17th ed. New York: McGraw-Hill. 2008; pp: 1514-26.

3. Fakhrzadeh H, Sharifi F. [Cardiovascular diseases in the elderly]. J Gorgan Univ Med Sci. 2012; 14(3): 1-9. [Article in Persian]

4. Rahimtoola SH, Brest AN. Coronary Bypass Surgery, a perspective. Philadelphia, Pennsylvania: FA Davis Company. 1977. p: 107.

5. Pomerantzeff PM, Venossi Barbosa G. [Diretrizes de cirurgia nas valvopatias]. Arq Bras Cardiol. 2004; 82(Suppl 5): 22-33.

[Article in Portuguese] http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2004001100002

6. Allen K, Cheng D, Cohn W, Connolly M, Edgerton J, Falk V, et al. Endoscopic vascular harvest in coronary artery bypass grafting surgery: a consensus statement of the international society of minimally invasive cardiothoracic surgery (ISMICS) 2005. Innovations (Phila). 2005 Winter; 1(2):51-60. doi:10.1097/01.gim.0000196315.32179.82

7. Dilly RJ, McGeachie JK, Prendergast FJ. A review of the histologic changes in vein to artery grafts, with particular refrence to intimal hyperplasia. Arch Surg. 1988;123(6):691-696. doi:10.1001/archsurg.1988.01400300033004

8. Angelini GD, Bryan AJ, Williams HM, Soyombo AA, Williams A, Tovey J, et al. Time-course of medial and intimal thickening in pig venous arterial grafts: relationship to endothelial injury and cholesterol accumulation. J Thorac Cardiovasc Surg. 1992 Jun;103(6):1093-103.

9. Stigler R, Steger C, Schachner T, Holfeld J, Edlinger M, Grimm M, et al. The impact of distension pressure on acute endothelial cell loss and neointimal proliferation in saphenous vein grafts. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. 2012 Oct; 42(4): e74–e79. doi:https://doi.org/10.1093/ejcts/ezs402

10. Khaleel MS, Dorheim TA, Duryee MJ, Durbin HE Jr, Bussey WD, Garvin RP, et al. High-pressure distention of the saphenous vein during preparation results in increased markers of inflammation: a potential mechanism for graft failure. Ann Thorac Surg. 2012 Feb;93(2):552-8. doi:10.1016/j.athoracsur.2011.10.035

11. Soyombo AA, Angelini GD, Newby AC. Neointima formation is promoted by surgical preparation and inhibited by cyclic nucleotides in human saphenous vein organ cultures. J Thorac Cardiovasc Surg. 1995 Jan;109(1):2-12. doi:10.1016/S0022-5223(95)70415-9

12. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. Circulation. 1998 Mar; 97(9):916-31.

13. Alrawi SJ, Balaya F, Raju R, Cunningham JN Jr, Acinapura AJ. A comparative study of endothelial cell injury during open and endoscopic saphenectomy: an electron microscopic evaluation. Heart Surg Forum. 2001;4(2):120-7.

14. Lawrie GM, Weilbacher DE, Henry PD. Endothelium-dependent relaxation in human saphenous vein grafts. Effects of preparation and clinicopathologic correlations. J Thorac Cardiovasc Surg. 1990 Oct;100(4):612-20.

15. Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. Biosci Rep. 1999 Aug;19(4):235-51.

16. Radomski MW, Vallance P, Whitley G, Foxwell N, Moncada S. Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide. Cardiovasc Res. 1993 Jul;27(7):1380-2.

17. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells". J Clin Invest. 1989; 83(5): 1774-77. doi:10.1172/JCI114081

18. Angelini GD, Christie MI, Bryan AJ, Lewis MJ. Surgical preparation impairs release of endothelium-derived relaxing factor from human saphenous vein. Ann Thorac Surg. 1989 Sep; 48(3):417-20.

19. Neishi Y, Mochizuki S, Miyasaka T, Kawamoto T, Kume T, Sukmawan R, et al. Evaluation of bioavailability of nitric oxide in coronary circulation by direct measurement of plasma nitric oxide concentration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Aug; 102(32): 11456–61. doi:10.1073/pnas.0501392102

20. Ferroni P, Basili S, Paoletti V, Davì G. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2006 Apr;16(3):222-33. doi:10.1016/j.numecd.2005.11.012

21. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J. 1994 Mar;298 (Pt 2): 249-58.

22. Liu ZG, Liu XC, Yim AP, He GW. Direct measurement of nitric oxide release from saphenous vein: abolishment by surgical preparation. Ann Thorac Surg. 2001 Jan;71(1):133-7.

23. Roubos N, Rosenfeldt FL, Richards SM, Conyers RA, Davis BB. Improved preservation of saphenous vein grafts by the use of glyceryl trinitrate-verapamil solution during harvesting. Circulation. 1995 Nov; 92(9 Suppl):II31-6.

24. Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. Sensors. 2003; 3(8): 276-84. doi:10.3390/s30800276

25. Hashmi SF, Krishnamoorthy B, Critchley WR, Walker P, Bishop PW, Venkateswaran RV, et al. Histological and immunohistochemical evaluation of human saphenous vein harvested by endoscopic and open conventional methods. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2015 Feb;20(2):178-85. doi:10.1093/icvts/ivu359

26. Gray CL, Krebs-Kraft DL, Solomon MB, Norvelle A, Parent MB, Huhman KL. Immediate post-defeat infusions of the noradrenergic receptor antagonist propranolol impair the consolidation of conditioned defeat in male Syrian hamsters. Physiol Behav. 2015 Dec; 152(Pt A):56-61. doi:10.1016/j.physbeh.2015.09.010

27. Di Napoli P, Ranalli G, Di Crecchio A, Taccardi AA, Ausiello A, Di Muzio M, et al. [The effects of verapamil on the postischemic changes in the coronary microcirculation: the role of nitric oxide]. Cardiologia. 1999 Jul;44(7):667-74. [Article in Italian]

28. Tsakok M, Montgomery-Taylor S, Tsakok T. Storage of saphenous vein grafts prior to coronary artery bypass grafting: is autologous whole blood more effective than saline in preserving graft function? Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2012 Oct;15(4):720-5. doi:10.1093/icvts/ivs275

29. Schwartz LB, Radic ZS, O'Donohoe MK, McCann RL, Mikat EM, Hagen PO. Functional and morphologic endothelial damage in rabbit external jugular veins stored in heparinized normal saline. Blood Vessels. 1991;28(6):511-9.

30. Suciu M. The role of nitric oxid (NO) and statins in endothelial dysfunction and atherosclerosis. FARMACIA. 2009; 57(2): 131-40.

31. Puca AA, Carrizzo A, Ferrario A, Villa F, Vecchione C. Endothelial nitric oxide synthase, vascular integrity and human exceptional longevity. Immun Ageing. 2012 Nov; 9(1):26. doi:10.1186/1742-4933-9-26

32. Clozel M, Fischli W. Human cultured endothelial cells do secrete endothelin-1. J Cardiovasc Pharmacol. 1989; 13 (Suppl 5): S229-31.

33. Rodriguez JV, Guibert EE, Quintana A, Scandizzi A, Almada L. Role of sodium nitroprusside in the improvement of rat liver preservation in University of Wisconsin solution: A study in the isolated perfused liver model. J Surg Res. 1999 Dec; 87(2):201-8. doi:10.1006/jsre.1999.5750

34. Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. Curr Vasc Pharmacol. 2012 Jan;10(1):4-18.

Original Paper

Protective effect of perserved solutions of Krebs contains verapamil, adrenaline and propranololol in comparision with Krebs and Heparinated blood on desqumation of the endothelial cell in Saphenous vein of Guinea pig

**Majid Malekzadeh Shafaroudi (Ph.D)[1], Mitra Shokri (B.Sc)[2], Zohre Zare (Ph.D)[1]
Alireza Rafiei (Ph.D)[3], Mohammad Ali Ebrahimzadeh (Ph.D)[4]
Reza Moradpour [5], Nourollah Rezaei (Ph.D)*[6]**

[1]Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. [2]M.Sc Student of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. [3]Professor, Cell and Molecular Research Center (CMRC), Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. [4]Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center (PSRC), Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. [5]B.Sc Student of Medical Engineering, Department of Engineering, Rouzbehan Institute of Higher Education (College), Sari, Iran. [6]Associate Professor, Cell and Molecular Research Center (CMRC), Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

Abstract

Background and Objective: The most important factor in the integrity of saphenous vein is the health degree of endothelium which guaranties the dilation of them after cronary bypass sergery. Kind of preservative soulution has a key role in endothelial protection. This study was done to evaluate Protective effect of perserved solutions of krebs contains verapamil, adrenaline and propranololol in comparision with Krebs and Heparinated blood on desqumation of the endothelial cell in Saphenous vein of Guinea pig.

Methods: This experimental study was done on 28 male Guinea pigs with 380±40g weight.for separating 3mm of saphenous vein rings and Measuring of rings nitric oxide released in preserving solutions: Krebs (K), Krebs plus propranolol (K+P), adrenaline (K+A) and verapamil (K+V) compaired with heparinized blood at 30, 45, 60 and 90 minutes after harvesting measured by micro plate Griess reaction. Rings also stained by H&E and examined by light microscopy to evaluate endothelial desqumation.

Results: Average concentration of nitric oxide (NO) in the Krebs plus Verapamil solution (K+V) Vs Heparinized Blood (HB), Krebs (K), Krebs plus Adrenaline (K+A) and Krebs plus Propanololol (K+P) revealed significant increase in NO release ($P<0.05$). The maximum NO measurement was 45 minuts after harvesting. Also histological study with H&E staining showed that endothelial layer was intact only in Krebs plus verapamil in compaired to control group, but in the other solutions the vascular intimal cells had suffered different degrees.

Conclusion: It seems that Krebs solutions containing verapamil has more efficiently to the proper functioning of the saphenous veins endothelium in animal modle.

Keywords: Endothelium, Saphenous vein, Krebs solution, Verapamil, Nitric oxide, Guinea pig

*** Corresponding Author: Rezaei N (Ph.D), E-mail: nourrezaei@gmail.com**

Received 4 Mar 2017 **Revised** 27 May 2017 **Accepted** 4 Jul 2017

Majid Malekzadeh Shafaroudi (https://orcid.org/0000-0003-0488-3499), Nourollah Rezaei (https://orcid.org/0000-0003-1741-1909)

Cite this article as: Malekzadeh Shafaroudi M, Shokri M, Zare Z, Rafiei A, Ebrahimzadeh MA, Moradpour R, Rezaei N. [Protective effect of perserved solutions of krebs contains verapamil, adrenaline and propranololol in comparision with Krebs and Heparinated blood on desqumation of the endothelial cell in Saphenous vein of Guinea pig]. J Gorgan Univ Med Sci. 2018 Spring; 20(1): 29-35. [Article in Persian]