

تحقیقی

اثر هیدروژن سولفید بر فعالیت حرکتی ژژنوم موش سوری

دکتر رضا رحمتی^{۱*}، دکتر دیوید گروندی^۲

۱- استادیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گرگان، مرکز تحقیقات گوارش و کبد گلستان.

۲- استاد گروه فیزیولوژی، بخش علوم بیومدیکال دانشگاه شفیلد انگلستان.

چکیده

زمینه و هدف: نقش بیولوژیکی هیدروژن سولفید روی عضله صاف بافت‌های عروقی و غیرعروقی تا حدودی متناقض بوده و شامل فعالیت‌های انقباضی و شل شدن می‌باشد. این مطالعه به منظور تعیین اثر هیدروژن سولفید بر فعالیت حرکتی عضله صاف ژژنوم موش سوری انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی از ۲۳ سر موش با یک زمینه ژنتیکی C57/BL6 به وزن‌های ۲۵-۲۰ گرم استفاده شد. ابتدا حیوانات بیهوش شدند و سپس به وسیله تزریق داخل صفاقی دوز بالای سدیم پنتوباریتون (80 mg/kg) کشته شدند. سپس قسمتی از ژژنوم جدا شد و در محلول کربس گازدهی شده با اکسیژن قرار گرفت. قطعات ژژنوم جدا شده به طول تقریبی ۴ سانتی‌متر به طور افقی در حمام بافتی قرار گرفتند. فعالیت حرکتی بافتی به صورت تغییرات فشار از بخش آنالی توسط ترانسدوسر فشار اندازه‌گیری شد. اثرات سدیم هیدروژن سولفید در غلظت‌های مختلف (۱۰۰-۳۰۰۰ میکرومول) به مدت ده دقیقه روی فعالیت حرکتی قطعات جدا شده بررسی گردید.

یافته‌ها: کاربرد سدیم هیدروژن سولفید (پیش‌ساز هیدروژن سولفید) در حمام بافت در حالت وابستگی به دوز، سبب مهار فعالیت حرکتی شد و تفاوت معنی‌داری بین موش‌های دارای گیرنده وانلوتیدی و فاقد گیرنده وانلوتیدی مشاهده نشد. در حضور تترودوتوکسین (یک میکرومول) سدیم هیدروژن سولفید سبب کاهش در تنوس پایه ($n=5$ ، $P<0.05$ و $19/5$ درصد) و مهار انقباض حاصل از 30 میکرومول بتانکول و مهار انقباض حاصل از 30 میکرومول بتانکول ($n=5$ ، $P<0.05$ و 55 درصد) گردید.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که هیدروژن سولفید مهار کننده مهم فعالیت حرکتی در ژژنوم موش سوری است.

کلید واژه‌ها: هیدروژن سولفید، فعالیت حرکتی، روده کوچک، موش سوری

* نویسنده مسؤول: دکتر رضا رحمتی، پست الکترونیکی: rahmati.r@gmail.com

نشانی: گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گرگان، دانشکده پزشکی؛ گروه فیزیولوژی، تلفن: ۳ و ۴۴۲۱۶۵۱ (۰۱۷۱)، نمابر: ۴۴۲۱۲۸۹

وصول مقاله: ۸۸/۱۰/۳۰، اصلاح نهایی: ۸۸/۴/۲، پذیرش مقاله: ۸۸/۵/۳

مقدمه

هیدروژن سولفید یک گاز سمی است که در مقادیر زیاد در لوله گوارش به وسیله مکانیسم‌های درون‌زا و در مقادیر خیلی زیاد توسط باکتری‌های کولون تولید می‌شود (۱ و ۲). در حالی که فعالیت بیولوژیکی واسطه‌گازی از قبیل نیتریک اکسید به طور وسیعی طی سالیان درازی مورد بررسی قرار گرفته است؛ فعالیت بیولوژیکی هیدروژن سولفید به عنوان گاز فعال بیولوژیکی دیگر مورد توجه کمتری واقع شده است. هیدروژن سولفید به عنوان یک نورومدولاتور گازی بعد از نیتریک اکسید معرفی شده که اثرات عمده‌ای بر روی بافت‌های تحریک‌پذیر از قبیل اعصاب و عضلات صاف دارد (۳-۶). در مطالعه‌ای مشخص شد که هیدروژن سولفید دارای اثر تحریکی بر روی انقباضات مٹانه است و این عمل از طریق اعصاب حساس به کاپسایسین صورت می‌گیرد (۷). مطالعات در مورد اثر هیدروژن سولفید بر روی عضله صاف از بافت‌های عروقی و غیرعروقی تا حدودی متناقض است و شامل فعالیت‌های انقباضی و شل شدن هر دو می‌شود. این یافته نشان می‌دهد که فعالیت‌های انقباضی و شل شدن از طریق اعصاب یا عضلات صاف می‌تواند صورت گیرد (۹-۶).

اثرات هیدروژن سولفید بر روی فعالیت‌های حرکتی لوله گوارش مورد ارزیابی قرار نگرفته است. این مطالعه به منظور ارزیابی اثر هیدروژن سولفید بر فعالیت حرکتی ژژنوم موش سوری در محیط آزمایشگاه انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از ۲۳ سر موش با یک زمینه ژنتیکی C57/BL6 به وزن‌های ۲۵-۲۰ گرم که از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه شفیلد تهیه شده بودند؛ استفاده گردید. به علاوه از موش‌هایی که گیرنده و انلوپیدی آنها به وسیله روش‌های نو ترکیبی هومولوگی (۱۰) حذف شده بود؛ به منظور ارتباط اثر گیرنده و انلوپیدی در پاسخ‌های انقباضی هیدروژن سولفید نیز استفاده شد. کلیه نکات اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه شفیلد رعایت گردید. ابتدا حیوانات بیهوش شدند و سپس به وسیله تزریق داخل صفاقی دوز بالای سدیم پنتوباریتون (۸۰ mg/kg) کشته شدند. بعد از لاپاراتومی با استفاده از یک تهیه بافتی،

فعالیت حرکتی قطعات جدا شده از موش‌های سوری ثبت گردید. ۴ سانتی‌متر از بافت ژژنوم انتخاب و سریعاً به یک حمام بافتی حاوی محلول کربس گازدهی شده با اکسیژن با pH ۷/۴ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. بعد از قرار دادن بافت به طور افقی در محفظه، دو طرف بافت به طور محکم به دو کاتتر بسته شد و یک اتساع نسبتاً ثابت ۲/۵ سانتی‌متر آب بر آنها اعمال شد. ثبت انقباضات ژژنوم به صورت تغییرات فشار روده تحت شرایط ایزوولومتریکی با استفاده از ترانس‌دیوسر فشار متصل شده به بخش آنالی بافت صورت گرفت. بعد از قرار دادن بافت در محفظه، بافت به طور مداوم در تمام طول آزمایش با یک سرعت جریان ثابت ۴/۵ میلی‌لیتر در دقیقه از طریق لوله متصل شده به پمپ پرفیوژن شده. بعد از ۳۰ دقیقه تثبیت بافت و ایجاد کمپلکس‌های حرکتی خودبه‌خودی هیدروژن سولفید از سدیم هیدروژن سولفید تولید شد و اثرات آن بر روی فعالیت حرکتی روده ایزوله در موش‌های دارای گیرنده و انلوپیدی و فاقد گیرنده و انلوپیدی بررسی شد.

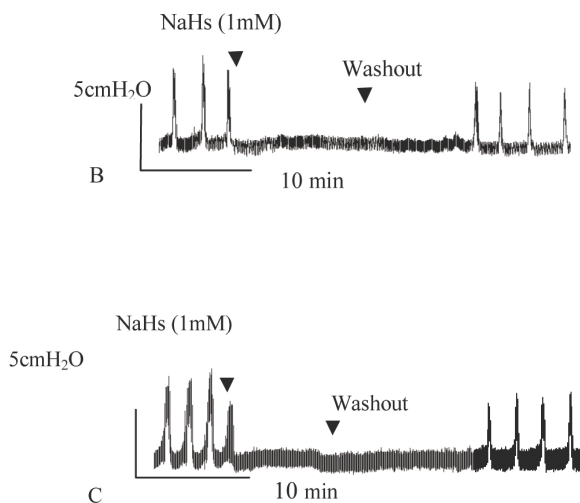
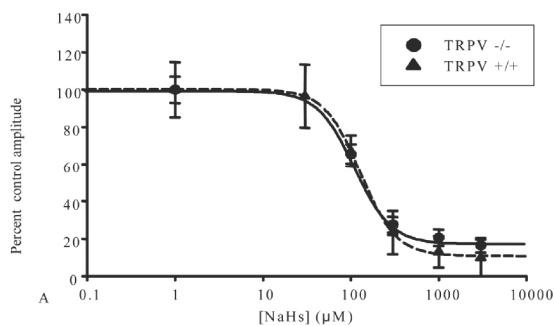
از ترکیب محلول کربس بر حسب میلی‌مول در لیتر به صورت زیر استفاده شد:

۴/۶۱ KCL	۲۱/۹۰ NaHCO ₃
۱۱۵/۴۸ NaCl	۱۰/۱۰ glucose
۱/۱۶ MgSO ₄	۲/۵۰ CaCl ₂
۱/۱۴ NH ₂ PO ₄	

مواد مورد استفاده شامل سدیم هیدروژن سولفید (NaHS)، تترودوتوکسین (TTX) و بتانکول هیدروکلراید بود که از شرکت سیگما فراهم گردید. سدیم هیدروژن سولفید برای ۱۰ دقیقه پرفیوژن شد و آنتاگونیست‌ها تترودوتوکسین (TTX) و بتانکول هیدروکلراید ۳۰ دقیقه قبل از سدیم هیدروژن سولفید مورد استفاده قرار گرفتند.

سدیم هیدروژن سولفید مستقیماً به داخل حمام بافتی در سطح سروزی در غلظت‌های مختلف (۳۰۰۰-۱۰۰ میکرومول) به مدت ۱۰ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. یک فاصله ۱۵ دقیقه‌ای بین هر تست هیدروژن سولفید در نظر گرفته شد. در برخی آزمایش‌ها، برای اثبات یک مسیر عصبی موثر در تشکیل کمپلکس‌های حرکتی و همچنین اثرات ناشی از سدیم

انقباضات تونیک که به وسیله ۳۰ میکرومول بتانکول ایجاد گردید؛ به میزان ۵۵ درصد کاهش داد ($n=5$ و $P<0.05$) (نمودار ۲D). بنابراین نقش انتقال وابسته به نورونی در تغییرات فعالیت حرکتی در ارتباط با هیدروژن سولفید غیرمحمول به نظر می‌رسد.



نمودار ۱: (A) منحنی دوز - پاسخ سدیم هیدروژن سولفید. کاربرد سدیم هیدروژن سولفید سبب مهار وابسته به دوز در دامنه انقباضات در بافت‌های موش‌های دارای گیرنده وانلوییدی و فاقد گیرنده وانلوییدی می‌شود. منحنی پاسخ بین موش‌های دارای گیرنده وانلوییدی و فاقد گیرنده وانلوییدی تفاوت معنی‌داری ندارند. (B) اثر کاربرد داخل سروزی سدیم هیدروژن سولفید بر روی کمپلکس‌های حرکتی در موش سوری دارای گیرنده وانلوییدی. (C) اثر کاربرد داخل سروزی سدیم هیدروژن سولفید بر روی کمپلکس‌های حرکتی در موش فاقد گیرنده وانلوییدی

هیدروژن سولفید، تترودوتوکسین به محلول‌های کنترل اضافه گردید.

نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شد. برای مقایسه نتایج در هر یک از گروه‌ها قبل و بعد مداخله، از آزمون آماری تی زوج و برای مقایسه گروه‌ها با هم از آزمون ANOVA استفاده گردید. سیگنال‌های به‌دست آمده از طریق دستگاه مبذل آنالوگ به دیجیتال (CED 1401+ Cambridge Electronic Design, Cambridge UK) به کامپیوتر منتقل شد و با استفاده از نرم‌افزار SPSS-15 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری کلیه آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثرات کاربرد سدیم هیدروژن سولفید بر روی کمپلکس‌های حرکتی روده:

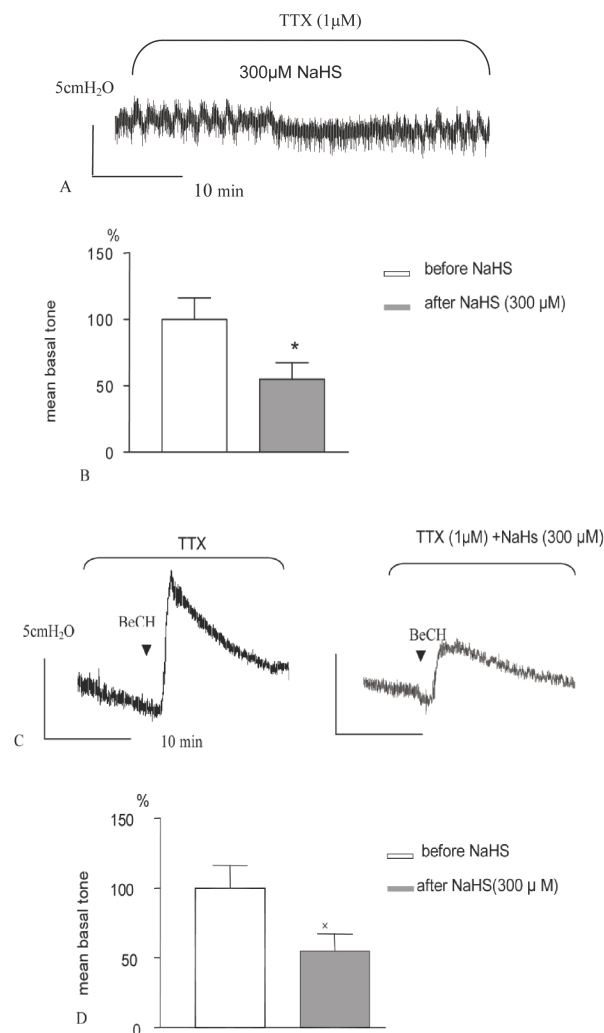
کاربرد داخل سروزی NaHS در موش‌های دارای گیرنده وانلوییدی و فاقد گیرنده وانلوییدی به صورت وابسته به دوز پاسخ‌های حرکتی روده را مهار کرد و اختلافی بین آنها مشاهده نشد (نمودار ۱A). در دوزهای بالا (میکرومول ۳۰۰-۳۰۰۰ NaHS به طور کامل از تولید دوره‌ای پاسخ‌های حرکتی جلوگیری کرد و بین آنها با دوزهای کمتر از ۳۰۰ در هر دو گروه تفاوت معنی‌داری به دست آمد ($P<0.001$). بنابراین اثر مهاری NaHS در غلظت ۳۰۰ میکرومول به ماکزیم رسید. مهار اثر NaHS نیز در طی چند ثانیه شروع شد و اثرات مهاری NaHS بعد از شستشوی بافت در هر دو گروه از بافت‌های دارای گیرنده وانلوییدی و فاقد گیرنده وانلوییدی بعد از چند دقیقه برگشت پذیر شد (نمودار ۱B و ۱C).

اثر TTX بر روی اثرات ناشی از NaHS:

اضافه کردن TTX بر روی سطح سروزی بافت در موش‌های سوری سبب مهار پاسخ‌های کمپلکس‌های حرکتی دوره‌ای و تبدیل آنها به انقباضات با دامنه بسیار پایین گردید (نمودار ۲A). کاربرد NaHS (۳۰۰ میکرومول) در حضور TTX (۱ میکرومول) سبب کاهش در تنوس پایه ($P<0.05$) و ۱۹/۵ درصد) گردید (نمودار ۲B). NaHS همچنین انقباضی را که به وسیله کاربرد بتانکول (۳۰ میکرومول) به وجود آمد را مهار نمود (نمودار ۲C). در حضور TTX (۱ میکرومول)

الگوی فعالیت حرکتی مشابهی را نشان داده است (۱۱ و ۱۲). در مطالعه حاضر هیدروژن سولفید سبب ایجاد مهاری در کمپلکس‌های حرکتی روده باریک به صورت وابسته به دوز در موش‌های سوری گردید. در تحقیق Gallego هیدروژن سولفید سبب مهار کمپلکس‌های حرکتی در روده بزرگ موش‌های صحرایی و انسان گردید (۱۳). در مطالعه حاضر اثر مهاری هیدروژن سولفید در موش‌های سوری دارای گیرنده‌های وانلوییدی و غیروانلوییدی مشابه است. این موضوع نشان می‌دهد که نورون‌های آوران موجود در دستگاه گوارش که دارای گیرنده‌های وانلوییدی هستند؛ احتمالاً در پاسخ به هیدروژن سولفید دخالت ندارند. با این وجود بررسی دیگری نشان می‌دهد که هیدروژن سولفید بر روی فعالیت حرکتی مثانه در موش‌های صحرایی نقش تحریکی دارد و این اثر به وسیله نورون‌های آوران موجود در مثانه صورت می‌گیرد (۷). کمپلکس‌های حرکتی به وسیله TTX مهار می‌شوند. تترودوتوکسین سم عصبی است که از پتانسیل عمل جلوگیری می‌کند؛ بدون این که فعالیت تحرکی سلول‌های عضلانی صاف را تحت تاثیر قرار دهد. بنابر این ماهیت فعالیت کمپلکس‌های حرکتی عصبی است. بتانکول برای تقلید اثرات استیل کولین که به صورت درون‌زا در عضلات صاف برای ایجاد انقباض آزاد می‌شود؛ به کار می‌رود. بتانکول گیرنده‌های موسکارینی بر روی عضلات صاف را در جهت انقباضات عضلانی تحریک می‌کند (۱۴).

در مطالعه حاضر و همچنین مطالعه دیگری مشخص شده است که بتانکول انقباضات لوله گوارش را افزایش می‌دهد (۱۴). گیرنده‌های موسکارینی نوع ۳ و ۲ به عنوان انواع گیرنده‌های عمده موسکارینی عضلات صاف ایلوم خوکچه هندی یافت می‌شوند (۱۵ و ۱۶). در مطالعه حاضر در حضور TTX هیدروژن سولفید سبب کاهشی در تنوس پایه گردید و انقباضی را که به وسیله بتانکول ایجاد شد؛ مهار کرد. به نظر می‌رسد که عمل بتانکول به صورت مستقیم بر روی گیرنده‌های عمده موسکارینی عضلات صاف انجام می‌شود. این یافته مجدداً تایید می‌کند که مکانیسم‌های عصبی در پاسخ مهاری به هیدروژن سولفید دخالت ندارند. از آنجایی که اثر مهاری هیدروژن سولفید در حضور TTX ادامه می‌یابد؛ احتمال



نمودار ۲: (A) اثر هیدروژن سولفید (۳۰۰ میکرومول) بر روی انقباضات در حضور تترودوتوکسین (۱ میکرومول) در روده موش. (B) یافته‌های گروهی نشان‌دهنده اثر کاربرد سروزی هیدروژن سولفید (۳۰۰ میکرومول) بر روی تنوس پایه در ژژونوم است (n=5). (C) تصویرها نشان‌دهنده انقباضات ناشی از بتانکول در حضور تترودوتوکسین بدون سدیم هیدروژن سولفید (سمت چپ) و همراه با سدیم هیدروژن سولفید در ژژونوم موش است. (D) یافته‌های گروهی نشان می‌دهد که در حضور تترودوتوکسین (۱ میکرومول) سدیم هیدروژن سولفید (۳۰۰ میکرومول) سبب یک کاهش در تنوس پایه می‌شود و انقباضات ناشی از بتانکول (۳۰ میکرومول) را به میزان ۵۵ درصد مهار می‌کند ($P < 0.05$).

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که در هر دو گروه از بافت‌های دارای گیرنده‌های وانلوییدی و فاقد گیرنده‌های وانلوییدی کمپلکس‌های حرکتی مشابه بوده و در یک جهت دهانی به دمی یا آنالی منتقل می‌شوند. در مطالعات دیگر نیز روده موش‌های صحرایی و موش‌های کوچک سفید آزمایشگاهی

مهار کننده مهم فعالیت حرکتی در روده موش است و می توان آن را در ردیف مواد مهار کننده گازی قرار داد. اثرات هیدروژن سولفید مستقل از گیرنده و انلوییدی بوده و ممکن است؛ به وسیله مکانیسم غیر عصبی بر روی عضلات صاف اعمال شود. اگرچه این یافته های جدید دلیل اولیه ای برای نقش هیدروژن سولفید در روده فراهم می کند؛ اما این که دقیقاً چه مکانیسم هایی این اثرات را واسطه گری می کنند؛ جای بررسی بیشتری دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه برای اخذ درجه دکترای فیزیولوژی بود. بدین وسیله از وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی به خاطر حمایت مالی پژوهش سپاسگزاری می گردد.

References

1. Wang R. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal*. 2003 Aug;5(4):493-501.
2. Deplancke B, Finster K, Graham WV, Collier CT, Thurmond JE, Gaskins HR. Gastrointestinal and microbial responses to sulfate-supplemented drinking water in mice. *Exp Biol Med* (Maywood). 2003 Apr;228(4):424-433.
3. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J*. 2002 Nov;16(13):1792-1798.
4. Teague B, Asiedu S, Moore PK. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br J Pharmacol*. 2002 Sep;137(2):139-145.
5. Zhao W, Wang R. H(2)S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Aug;283(2):H474-H480.
6. Qu K, Lee SW, Bian JS, Low CM, Wong PT. Hydrogen sulfide: neurochemistry and neurobiology. *Neurochem Int*. 2008 Jan;52(1-2):155-165.
7. Patacchini R, Santicoli P, Giuliani S, Maggi CA. Hydrogen sulfide (H₂S) stimulates capsaicin-sensitive primary afferent neurons in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol*. 2004 May;142(1):31-34.
8. Chahl LA. Hydrogen sulphide: an endogenous stimulant of capsaicin-sensitive primary afferent neurons? *Br J Pharmacol*. 2004 May;142(1):1-2.
9. Zhong G, Chen F, Cheng Y, Tang C, Du J. The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase. *J Hypertens*. 2003 Oct;21(10):1879-1885.

دارد که عمل هیدروژن سولفید بر روی نورون ها نبوده و در سطح غشاء سلول عضلانی اعمال گردد. در تحقیق Bhatia روی عضلات صاف عروقی، هیدروژن سولفید آزاد سازی نیتریک اکسید را تسهیل کرد و به مهار انقباضات عضلات صاف توسط آزاد سازی نیتریک اکسید کمک نمود (۱۷). اگرچه مخاط لوله گوارش به طور طبیعی کارایی لازم را برای سم زدایی هیدروژن سولفید دارد؛ با این حال در صورتی که مخاط لوله گوارش (در حالت التهاب) صدمه ببیند و یا در جایی که (در حالت رشد بالای باکتریایی) تولید باکتریایی آن افزایش یابد؛ می توان فرض نمود که هیدروژن سولفید ممکن است؛ حرکت روده را تحت تاثیر قرار دهد.

نتیجه گیری

یافته های این مطالعه نشان داد که هیدروژن سولفید یک

10. Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*. 2000 May 11;405(6783):183-187.
11. Abdu F, Hicks GA, Hennig G, Allen JP, Grundy D. Somatostatin sst(2) receptors inhibit peristalsis in the rat and mouse jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Apr;282(4):G624-G633.
12. Bian X, Ren J, DeVries M, Schnegelsberg B, Cockayne DA, Ford AP, et al. Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X₃ subunit. *J Physiol*. 2003 Aug 15;551(Pt 1):309-322.
13. Gallego D, Clavé P, Donovan J, Rahmati R, Grundy D, Jiménez M, et al. The gaseous mediator, hydrogen sulphide, inhibits in vitro motor patterns in the human, rat and mouse colon and jejunum. *Neurogastroenterol Motil*. 2008 Dec;20(12):1306-1316.
14. Eglen RM, Hegde SS, Watson N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol Rev*. 1996 Dec;48(4):531-565.
15. Eglen RM, Watson N. Selective muscarinic receptor agonists and antagonists. *Pharmacol Toxicol*. 1996 Feb;78(2):59-68.
16. Malagelada JR, Rees WD, Mazzotta LJ, Go VL. Gastric motor abnormalities in diabetic and postvagotomy gastroparesis: effect of metoclopramide and bethanechol. *Gastroenterology*. 1980 Feb;78(2):286-293.
17. Bhatia M, Wong FL, Fu D, Lau HY, Mochhala SM, Moore PK. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *FASEB J*. 2005 Apr;19(6):623-625.