مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية
المجلد ٦ - العدد ١ من ٤٩ إلى ٥٦

جمادى الأول ١٤٠٣هـ
آذار ١٩٨٣م

تغيرات فعالية أنزيم الدوبامين - بيتا - هيدروكسيلاز المصلية خلال نمو جرذان مرتفعي الضغط وراثياً

الدكتور سليمان عفاره
كلية الطب

آ - مدخل

- انزيم الدوبامين - بيتا - هيدروكسيلاز Dopamine-B-hydroxylase
- ارتفاع الضغط الشرياني التجريبي الوراثي

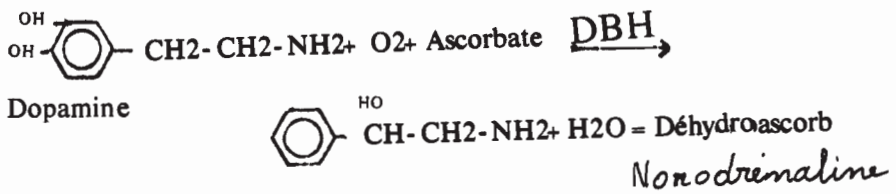
ب - وضع طريقة معايرة دقيقة لتحديد فعالية الدوبامين - بيتا - هيدروكسيلاز في مصل الجرذ

ج - دراسة تغيرات فعالية الدوبامين - بيتا - هيدروكسيلاز المصلية عند الجرذان مرتفعي الضغط وراثياً .

د - المناقشة والاستنتاج

آ ـ مدخل

الدوبامين ـ بيتا ـ هيدروكسيلاز Dopamine- bêta- hydroxylase أو الـDBH هو الانزيم المسؤول عن إنجاز المرحلة النهائية في عملية التصنيع الحيوي للنور أدرونالين Noradrenaline أي تحوّل الدوبامين Dopamine الى نور أدره نالين وذلك بادخال جذر هيدروكسيل في الموضع بيتا على الدوبامين كما يوضح لنا ذلك الشكل رقم (١)



شكل رقم (١)

لقد خُصَّ هذا الأنزيم بأهمية كبيرة أثناء دراسة الجهاز العصبي الودي من قبل فرق البحث العلمي وذلك بعكس الانزيمات الأخرى التي تتدخل في عملية التصنيع الحيوي للكتكول امينات Catécholamines هذه الأهمية تعود إلى الميزات التالية التي ينفرد بها انزيم الـDBH عن بقية الانزيمات الأخرى التي تتدخل في عملية التصنيع الحيوي للكتكول امينات

١ ـ توضع هذا الانزيم في الحبيبات المحبة للكروم Chromaffines للب الكظر وفي حويصلات النهايات العصبية الودية .

٢ ـ التحرر المتواقت لهذا الأنزيم والكتكول امينات من النهايات العصبية الودية بعد تحريض عصبي ودي .

٣ ـ أخيراً وجود هذا الأنزيم في الدوران الدموي .

لقد أشار المؤلفان Weinshilboum et Axelrod منذ عام ١٩٧١ الى وجود انزيم الـDBH في الدوران الدموي . أعقب هذا الاكتشاف عدد كبير من الأعمال التي كُرِّست لدراسة فعالية هذا الأنزيم في المصل أو المصورة . وقد اجمعت تلك الدراسات على امكانية اعتبار فعالية هذا الانزيم في الدوران الدموي كأحد الدلائل التي تحدد مستوى الفعالية الودية .

اعتماداً على تلك المعطيات بدا لي ان تحديد هذه الثابتة «أي فعالية الدوبامين ـ بيتاهيدروكسيلاز في المصل» ذو أهمية كبيرة لدراسة الدور الذي يمكن أن يلعبه الجهاز العصبي الودي في نماذج مختلفة لارتفاع الضغط الشرياني التجريبي ، والتي لن اشير في هذا المقال إلا لواحدٍ منها وهو ارتفاع الضغط الشرياني ذو المنشأ الوراثي عند الجرذ .

أرى من الأهمية ان اشير ايضاً الى انني قمت بقياس معايير حيوية أخرى للفعالية الودية بالاضافة الى تحديد فعالية الـDBH المصلية .

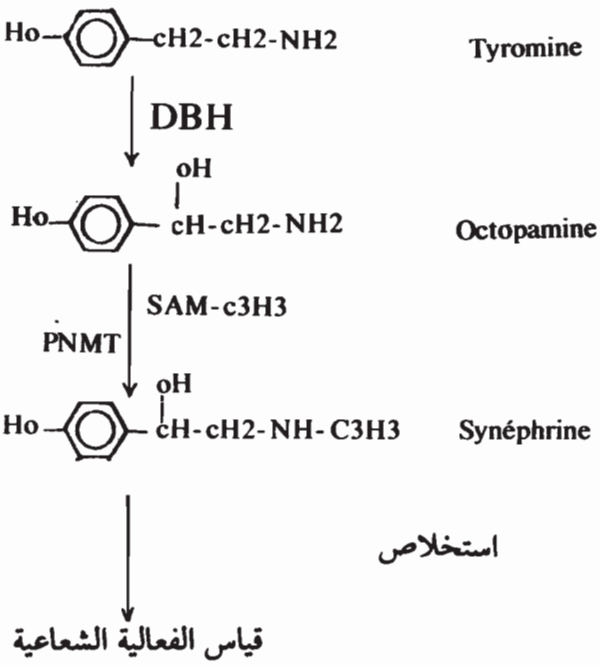
إن اختيارنا ، ارتفاع الضغط الشرياني التجريبي ذو المنشأ الوراثي ، كنموذج للدراسة يعود إلى أهمية هذا النموذج التجريبي ، إذ انه هو الأقرب من بين النماذج الاخرى الى الحالة المرضية عند الانسان المسماة بارتفاع الضغط الشرياني الاساسي . اما الانماط التجريبية الاخرى لارتفاع الضغط الشرياني فيتم احداثها بالتأثير على عضوٍ ما أو آلية معينة لتنظيم الضغط الشرياني وبالتالي فاننا نحصل على ارتفاع ضغط شرياني تجريبي مشابه لارتفاع الضغط الشرياني الثانوي عند الانسان .

وللحصول تجريبياً على سلالة حيوانية يتميز افرادها بارتفاع ضغط شرياني عفوي ، يتم في بداية الامر عذل الحيوانات ذوي الضغط الشرياني المرتفع من بين عدد كبير من الحيوانات وبتزاوج الأفراد المتقاربة ولفترة زمنية طويلة تمتد عدة سنوات مع الاستمرار بالانتخاب في كل جيل نحصل على سلالة حيوانية متميزة بارتفاع ضغط شرياني عفوي .

ب ـ وضع طريقة معايرة دقيقة لتحديد فعالية الدوبامين ـ بيتا ـ هيدروكسيلاز في مصل الجرذ .

إن فعالية انزيم الدوبامين ـ بيتا ـ هيدروكسيلاز في مصورة أو مصل الجرذ أقل بـ ٦٠ إلى ٢٠٠ مرة مما هي عليه عند الانسان ، لذا كان واضحاً لنا منذ البداية انه لابد من طريقة معايرة اكثر حساسية من الطريقة اللونية المستخدمة لتحديد فعالية الـDBH عند الانسان . من أجل هذا فقد اتجهنا نحو الطرق الانزيمية الشعاعيةRadioenzymatiques لما لهذه الطرق من حساسية كبيرة . ولقد وضعت تجريبياً طريقة معايرة دقيقة لتجديد فعالية انزيم الـDBH في مصل الجرذ مستقاة من طريقة شعاعية للمؤلفMolinoff عام ١٩٧١ .

وهي طريقة ذات تفاعلين انزيميين ، يوضح لنا الشكل رقم (٢) مبدؤها ، فخلال التفاعل الأول يحول انزيم الـDBH الموجود في المصل التيرامينTyramine المضاف الى وسط التفاعل بكمية كبيرة الى اكتوبامينOctopamine وذلك بادخال جذر هيدروكسيل على السلسلة الجانبية للتيرامين ، وناتج التفاعل أي الـOctopamine يستخدم كركازة لانزيم ناقل لجذر الميتل هوPhényléthanolamine-N-méthyltransférase أوPNMT مضاف بكمية زائدة الى وسط التفاعل فيتحول الى مشتق N ميتيل هو السنفرينSynéphrine وذلك بتثبيت جذر متيل موسوم بالهيدروجين الثلاثي على الوظيفة الامينية للأكتوبامين ، مصد الجذر الميتلي مركب معطي للمتبل هوS-Adénosylméthionine أوSAM . بعد ايقاف التفاعل يستخلص السنفرين من وسط الحضن بواسطة محل عضوي مؤلف من التلوين والكحول الايزواميلي ثم نقيس الفعالية الشعاعية للسنفرين المستخلص .



شكل رقم (٢) يبين مبدأ قياس فعالية الدوبامين ـ بيتا ـ هيدروكسيلز ـ بالطريقة الشعاعية الأنزيمية

ان تشكل السنفرين خلال التفاعل الثاني يتناسب مع كمية الأكتوبامين الناتجة عن التفاعل الأول وبتعبير آخر يتناسب مع فعالية انزيم الـDBH .

لقد حددنا تجريبياً الشروط المختلفة لانجاح طريقة المعايرة هذه

١ ـ التركيز المناسب من كبريتات النحاس في وسط التفاعل ، حيث ان شاردة النحاس هي عامل مساعد لظهور فعالية الانزيم لكن زيادتها في وسط التفاعل تثبط فعل الانزيم لذا لا بد من تحديد تركيز كبريتات النحاس في وسط التفاعل حسب كل حالة . فقمنا بهذا التحديد .

ـ في عدد كبير من تحديدات المصل المستخدم .

ـ باستخدام جرذان ذات اعمار مختلفة .

ـ حسب سلالة الجرذان الخاضعة للدراسة .

٢ ـ خطية التفاعل الثاني حسب تركيز الاوكتوبامين .

٣ ـ زمن الحضن المناسب لتحقيق التفاعل الأول والثاني .

٤ ـ التمديد المناسب للمصل

٥ ـ كمية التيرامين المضافة الى وسط التفاعل الأول .

ج ـ دراسة تغيرات فعالية الدوبامين بيتا هيدروكسيلاز المصلية عند جرذان مرتفعي الضغط وراثياً .

لقد اخترنا لتحقيق دراستنا هذه جرذان مرتفعي الضغط وراثياً منحدرين من السلالة الليونية والمعروفين عالمياً تحت اسم جرذان «LH» أو(LyonHyperteusive) وجرذان ذوي ضغط شرياني طبيعي منحدرين من نفس السلالة والمعروفين عالمياً تحت اسم جرذان «LN» Lyon Normoteusive) لقد تم عزل الجرذان مرتفعي الضغط والجرذان ذوي الضغط الطبيعي في نفس الوقت ، في نفس الشروط وبنفس الطريقة وبالنتيجة فقد حصلنا على حيوانات مراقبةٍ حقيقية ودون أي التباس .

أجرينا الدراسة على حيوانات ذكور وذلك لتجنب قدر الامكان أي تغير حيوي دوري . ووضعت تلك الحيوانات في شروطٍ ثابتة من حيث درجة الحرارة (٢٢±١ درجة مئوية) والاضاءة (دورة ظلمة وضوء ١٢ ساعة ـ ١٢ ساعة) والرطوبة (٥٠± ١٠٪) كما تلقت نفس الغذاء المخبري الحاوي على ٢٪ كلور صوديوم .

كانت اعمار الجرذان الخاضعة للدراسة ٥ ، ٩ و ٢١ اسبوع ، ثلاثة اعمار ثبت بالملاحظة والتجريب انها تغطي تطور ارتفاع الضغط الشرياني عند هذه السلالة من الجرذان .

لقد قسنا الضغط الشرياني عند الجرذ عن طريق الشريان الذيلي بطريقة غير مباشرة وهي طريقة تخطيط الامتلاء الدموي Plethysmographique وتم القياس عند الحيوان غير المخدر والمتروك بشكل حر . لقد تم اخذ العينات الدموية عن طريق البذل القلبي مباشرة بعد قتل الجرذ . وحفظ المصل لحين المعايرة بالدرجة -٨٠ مئوية .

النتائج :

يلخص لنا الجدول التالي أهم النتائج التي حصلنا عليها خلال هذه الدراسة .

فلقد لاحظنا زيادة ذات مدلول للضغط الشرياني الدموي عند الجرذان مرتفعي الضغط وراثياً (جرذان LH) بالمقارنة مع جرذان المراقبة ذوي الضغط الشرياني الطبيعي (جرذان LN) وذلك منذ الاسبوع الخامس للعمر . تصبح هذه الزيادة اكثر وضوحاً في الاسبوع التاسع وفي الاسبوع الحادي والعشرين . هذا وقد لاحظنا ان وزن الجرذان مرتفعي الضغط وراثياً كان اعلى من وزن الجرذان ذوي الضغط الطبيعي في الاعمار الثلاثة المدروسة الا ان هذا الفارق لم يكن ذو مدلول احصائي سوى عند الجرذان التي عمرها ٢١ اسبوعاً .

العمر بالأسابيع	مجموعة الجرذان	الضغط الشرياني الدموي ملمتر زئبقي	فعالية الـDBH المصلية نانومـــول/ مليلتر/ ساعة	وزن الجرذان غ	عدد الجرذان
٥	LN	٢,٣±١٠٣	١,٠٧±١٥,١٤	٤±٨٧	٩
	LH	**١,٨±١١٥	*١,٤٩±١٩,٣٦	٩±٩١	٩
٩	LN	٣,١±١٢١	٠,٤٤±٤,٥٨	٨±٢١٦	١٤
	LH	***٥,٥±١٤٦	٠,٤٧±٤,٨٧	٩±٢٣٣	١٤
٢١	LN	٤,٩±١٢٩	٠,٢٦±٢,٩٨	٨±٣٢٠	٧
	LH	***٤,٢±١٧٤	٠,٣٨±٣,٢٩	***١٠±٣٩٠	٧

جدول يبين الضغط الشرياني ، فعالية الدوبامين ـ بيتا ـ هيدروكسيلاز المصلية والوزن لكل مجنوعة مدروسة

LN = مجموعة الجرذان ذات الضغط الطبيعي

LH = مجموعة الجرذان ذات الضغط المرتفع

لقد تم التعبير عن القيم بالوسطي± SEM

* احتمال خطأ اقل من ٠,٠٥

** احتمال خطأ أقل من ٠,٠١

*** احتمال خطأ أقل من ٠,٠٠١

أما بالنسبة لفعالية انزيم الـDBH في المصل فكانت النتائج على النحو التالي :

ـ زيادة هذه الفعالية الانزيمية عند الجرذان مرتفعي الضغط وراثياً (جرذان LH) والتي اعمارها خمسة اسابيع بالمقارنة مع جرذان المراقبة (جرذان LN) بنسبة ٢٨٪

ـ لم تعد هذه الزيادة ذات مدلول احصائي في الاعمار ٩ و ٢١ اسبوع

ـ ان القيم المطلقة لفعالية انزيم الـDBH في مصل الجرذان تتناقص مع تقديم عمر الجرذ عند مجموعتي الجرذان وهي ظاهرة طبيعية معروفة عند الجرذ .

د ـ المناقشة والاستنتاج :

لقد اظهر عدداً من المؤلفين ان المصدر الرئيسي لانزيم الـDBH في الدوران الدموي هو النهايات العصبية الودية حيث يتم تحرره بآن واحد مع النور أدره نالين بأليه الاكسوسيتوز Exocytose بعد تحريض عصبي ودي . بناء على ذلك وكما اسلفنا في بداية هذا المقال يمكن

اعتبار مستوى فعالية انزيم الـDBH في مصل الجرذ كدليل للفعالية الودية وخاصة في حال تغيرات طويلة الأمد .

لقد أظهرت نتائجنا زيادة فعالية هذا الأنزيم في مصل الجرذان مرتفعي الضغط وراثياً (جرذان LH) بالمقارنة مع جرذان المراقبة (جرذان LN) وذلك في عمر مبكر «خمسة اسابيع» واختفاء هذه الزيادة مع تقدم عمر الجرذان . وبالتالي فان هذه النتائج توحي بوجود فرط للفعالية الودية في بداية تمركز ارتفاع الضغط الشرياني عند الجرذان مرتفعي الضغط وراثياً .

إذاً يمكن الاستنتاج بان الجهاز العصبي الودي يلعب دوراً هاماً في الاليات المبكرة المسببة لظهور ارتفاع الضغط الشرياني في هذا النموذج التجريبي والقريب من إرتفاع الضغط الشرياني الأساسي عند الانسان .

المراجع :

AFFARA Sulaiman

thèse de doctorat d'état es sciences pharmacentiques

Présentée à la Faculté de pharmacie

Lyon- France 1981