بررسی و مقایسه اثر آگونیست‌های ایزوپروترنول، دوبوتامین و تربوتالین بر الگوی پروتئینی غدد بزاقی خوکچه هندی و خرگوش

دکتر مهدی صائب[1] دکتر محمودرضا اکبریان[2]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۱، ۵۶-۵۱، (۱۳۸۰)

داروهای مقلد سمپاتیک باعث هیپرپلازی و هیپرتروفی غدد بزاقی می‌شوند. ایزوپروترنول از طریق واکنش متقابل با رسپتورهای بتا-آدرنرژیک و دوبوتامین و تربوتالین به‌صورت اختصاصی‌تر با رسپتورهای بتا-یک و بتا-دو سطح سلولی غدد بزاقی واکنش می‌نمایند. در تحقیق حاضر یک گروه خوکچه هندی نر به‌مدت ۲۰ روز از طریق داخل صفاقی تحت‌تأثیر تجویز ۰/۱ میلی‌گرم ایزوپروترنول و دوگروه خرگوش سفید نر بالغ نیز به‌مدت ۱۵ روز به‌ترتیب تحت تجویز ۴۰ تا ۶۰ میلی‌گرم /کیلوگرم وزن بدن دوبوتامین و تربوتالین قرار گرفتند. به حیوانات گروههای کنترل آب مقطر استریل تزریق گردید. پس از پایان مدت مذکور حیوانات از طریق بیهوشی با اتر کشته و غدد بزاقی جدا، توزین و آزمایشات بیوشیمیایی روی عصاره غدد انجام گرفت. میانگین وزن غدد بناگوشی و تحت‌فکی تحت‌تأثیر ایزوپروترنول، دوبوتامین و تربوتالین در دو گروه حیوان در مقایسه با شاهد افزایش نشان می‌دهد ($P<0/01$ و $P<0/05$). در حالی‌که تجویز ایزوپروترنول باعث کاهش پروتئین تام و آمیلاز در غده بناگوشی خوکچه هندی می‌شود ($P<0/01$) ولی دوبوتامین و تربوتالین باعث افزایش پروتئین تام در غدد بناگوشی و تحت‌فکی خرگوش می‌گردند ($P<0/01$ و $P<0/05$). در خرگوش میانگین وزن و پروتئین تام غدد زیرزبانی تحت‌تأثیر دوبوتامین و تربوتالین در مقایسه با شاهد افزایش نشان نمی‌دهد. الکتروفورز عصاره غدد بناگوشی روی ژل آکریل‌آمید در حضور سدیم ددسیل‌سولفات نشان داد که در خوکچه هندی دو باند پروتئینی با وزن ملکولی ۵۲ و ۱۴ کیلودالتون در مقایسه با شاهد کمتر رنگ می‌گیرند، در حالی‌که در خرگوش تحت‌تأثیر دوبوتامین ۶ باند پروتئینی با وزن ملکولی حدود ۴۰، ۳۸، ۳۵، ۳۴، ۳۲ و ۲۷ کیلودالتون و تحت‌تأثیر تربوتالین ۴ باند پروتئینی با وزن ملکولی حدود ۴۰، ۳۸، ۳۵ و ۳۴ کیلودالتون در مقایسه با شاهد افزایش نشان می‌دهند. در غده تحت‌فکی خوکچه هندی تحت‌تأثیر ایزوپروترنول تراکم باندهای پروتئینی ۱۴/۸، ۱۶/۵ و ۵۲ کیلودالتون و در خرگوش نیز تحت‌تأثیر تربوتالین ۳ باند پروتئینی ۲۰، ۱۸ و ۱۶ کیلودالتون در غده تحت‌فکی و زیرزبانی در مقایسه با شاهد افزایش نشان می‌دهند. این اختلافات شدیداً نشان می‌دهد که احتمالاً تعداد رسپتورهای آدرنرژیک بتا در غده بناگوشی و تحت‌فکی دو حیوان متفاوت می‌باشند. احتمالاً به‌نظر می‌رسد که در خوکچه هندی رسپتورهای بتا-یک به‌طور عمده در غده بزاقی بناگوشی و رسپتورهای بتا-دو در غده تحت‌فکی به‌طور غالب وجود داشته باشند. همچنین در خرگوش تغییر بیشتر غده بناگوشی در اثر دوبوتامین را می‌توان به بیشتربودن گیرنده بتا-یک نسبت به گیرنده بتا-دو در این غده نسبت داد. همچنین این مشاهدات نشان می‌دهد که این باندهای پروتئینی ممکن است به گروه پروتئینهای غنی از پرولین تعلق داشته باشند.

واژه‌های کلیدی : ایزوپروترنول، دوبوتامین، تربوتالین، خوکچه هندی، خرگوش.

ایزوپروترنول با نام تجارتی ایزوپرول از خانواده کاتکول‌آمین، به‌عنوان یک بتا-آگونیست انتخابی و محرک قوی گیرنده‌های بتا-آدرنرژیک می‌باشد (۳۴). تزریق تکراری و طولانی مدت ایزوپروترنول به موش آزمایشگاهی و موش صحرایی باعث هیپرتروفی و هیپرپلازی غدد بزاقی بناگوشی و تحت‌فکی گردیده و به‌دنبال آن افزایش سنتز DNA و تقسیم سلولی صورت می‌گیرد (۲۶ و ۶). داروهای آدرنرژیک بتا-یک و بتا-دو مانند دوبوتامین و تربوتالین نیز اثرات خود را از طریق گیرنده‌های اختصاصی اعمال می‌نمایند (۴۰). همچنین نشان داده شده است که استفاده طولانی مدت از تربوتالین باعث بزرگ‌شدن ناپایدار غده تحت‌فکی در موش صحرایی می‌شود (۳). تحت‌تأثیر تزریق ایزوپروترنول به موش آزمایشگاهی به‌مدت ۱۷ روز وزن غدد بزاقی ۵ برابر وزن قبل از تزریق می‌گردد (۴۲). غدد بزاقی بویژه غدد بناگوشی گونه‌های مختلف پستانداران پروتئینهای خاصی را سنتز می‌نمایند که حاوی مقدار زیادی اسید آمینه پرولین، گلیسیرین و گلوتامین می‌باشند که ۷۰ تا ۸۸ درصد اسید آمینه‌های پروتئینهای مزبور را تشکیل می‌دهند، که به‌علت میزان زیاد اسید آمینه پرولین در این پروتئینها از آنها به‌عنوان پروتئینهای غنی از پرولین یا PRP_s (Proline-rich proteins) یاد می‌کنند (۳۵ و ۱۱). با روشهای بیوشیمیایی چندین PRP_s را از غدد بزاقی میمون (۳۶)، خرگوش (۳۷)، موش صحرایی (۱۶) و موش آزمایشگاهی جدا نموده‌اند. در غدد بزاقی جوندگان میزان PRP_s به‌طور طبیعی بسیار پایین می‌باشد، ولی تحت‌تأثیر تجویز طولانی‌مدت ایزوپروترنول مقدار آن شدیداً افزایش یافته، که همچنین باعث هیپرپلازی و هیپرتروفی واحدهای ترشح‌کننده نیز می‌شود (۳۳، ۳۱، ۲۹، ۱۷، ۱۶). تجویز طولانی‌مدت دوبوتامین به موش صحرایی نیز باعث افزایش سنتز PRP_s در غده بناگوشی و تحت‌فکی می‌شود (۷). حدود ۷۰ درصد پروتئینهای بزاق انسانی را PRP_s تشکیل می‌دهد که به سه گروه اسیدی، قلیایی و گلیکوزیدی تقسیم می‌گردند، در حالی‌که آمیلاز ۳۰ درصد باقیمانده پروتئینهای بزاق را تشکیل می‌دهد (۳۵، ۲۰، ۱۱). تجویز ایزوپروترنول به‌مدت ۷ تا ۱۰ روز به موش صحرایی باعث افزایش ۱۰ تا ۲۰ برابر میزان PRP_s قلیایی در غدد بناگوشی می‌شود (۳۲، ۱۶، ۵). وزن ملکولی این پروتئینها ۱۵ تا ۱۸ کیلودالتون می‌باشد. همچنین تحت تجویز طولانی‌مدت ایزوپروترنول به موش آزمایشگاهی توانسته‌اند ۵ نوع PRP_s قلیایی را از غده بزاقی بناگوشی جدا نمایند (۲۸ و ۵). ثابت شده است که مکانیسم تأثیر داروهای ایزوپروترنول در افزایش سنتز PRP_s از طریق فعال‌کردن گیرنده‌های بتا و تغییر در میزان c.AMP سلولی می‌باشد (۴۴، ۳۰، ۴). نقشهای مختلفی برای پروتئینهای PRP_s شناخته شده است، از آن جمله شدیداً به کلسیم پیوند شده و باعث نگهداری آن در بزاق می‌شود (۱۰)، به‌طور انتخابی به سطوح هیدروکسی آپاتیت جذب گردیده و در تشکیل پلیکل دندانی (Dental pellicle) شرکت می‌نمایند (۲۳). به‌علاوه این ترکیبات میکروارگانیسمهای حفره دهانی را آگلوتینه نموده و باعث لغزنده‌سازی بزاق می‌شوند (۱۵). تأثیر داروهای مقلد سمپاتیک برروی غدد بزاقی یکی از راههایی است که همواره برای مشخص‌کردن نقش گیرنده‌های سمپاتیک در ترشح بزاق به‌کار می‌رود. با توجه به نقش و اهمیت غدد بزاقی پستانداران در تولید بزاق و اعمال مختلفی که بزاق به عهده دارد. مطالعه تغییر ترکیب بزاق بویژه تغییر الگوی پروتئینی آن از اهمیت و ویژگی خاصی برخوردار است، زیرا تحت‌تأثیر بعضی از بیماریها و مواد شیمیایی مثل داروها، هورمونها و مواد سمی ترکیب بزاق تغییر می‌نماید. در چند سال اخیر تحقیقات وسیعی روی تأثیر داروی ایزوپروترنول روی غدد بزاقی حیوانات مختلف بویژه موش صحرایی و موش آزمایشگاهی صورت گرفته است. از طرف دیگر این تحقیقات تا حدود

۱) گروه آموزشی علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.
۲) دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.

جدول ۱ - مقایسه میانگین و انحراف معیار وزن، پروتئین تام و میزان آمیلاز غده بناگوشی و تحت فکی خوکچه هندی تحت‌تأثیر ایزوپروترنول با گروه شاهد

گروه	غده	فاکتور				
		وزن غده (میلی‌گرم)	A	پروتئین تام (میلی‌گرم/گرم) بافت	A	آمیلاز/گرم بافت $IU\times10^3$	A
ایزوپروترنول (n=۱۰)	بناگوشی	۹۲۱±۴۰*	۱۱۵	۷۹/۶±۳/۷	-۱۳	۱۷۵±۴۲/۶	-۳۵
	تحت‌فکی	۳۶۵±۳۲*	۶۵	۱۶۱/۶±۴/۵*	۲۷/۵	۴۹۳±۶۵/۸**	۳۲
شاهد (n=۱۰)	بناگوشی	۴۲۷±۳۲	۰	۹۱/۴±۳/۱*	۰	۲۶۶/۵±۳۰/۸*	۰
	تحت‌فکی	۲۲۰±۱۸	۰	۱۲۶/۷±۸/۲	۰	۳۷۳/۸±۵۹	۰

*) P<۰/۰۱، **) P<۰/۰۰۱، A) درصد افزایش یا کاهش نسبت به شاهد.

زیادی نقش توأم گیرنده‌های بتا-یک و بتا-دو را روی سنتز پروتئینهای غدد بزاقی و در نتیجه ترشح بزاق مشخص نموده است. لذا برای مشخص‌کردن نقش اختصاصی‌تر آگونیست‌های بتا-یک و بتا-دو بر الگوی پروتئینی غدد بزاقی خرگوش در این تحقیق از دو داروی دوبوتامین و تربوتالین و از داروی ایزوپروترنول بر الگوی پروتئینی غدد بناگوشی و تحت‌فکی خوکچه هندی استفاده گردید.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی جهت الکتروفورز از کمپانی سیگما و پروتئین استاندارد از شرکت فارماسیا تهیه گردید. داروهای ایزوپروترنول، دوبوتامین و تربوتالین از شرکت مرک تهیه شد. تعداد ۲۰ عدد خوکچه هندی نر هشت ماهه نژاد انگلیسی و تعداد ۳۰ قطعه خرگوش نر سفید بالغ از بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده پزشکی شیراز تهیه گردید. سیستم الکتروفورز مدل LKB Bromma 2003 و دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Shimadzo 160A می‌باشد. دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز در این تحقیق از درجه خلوص بالایی برخوردار می‌باشند.

۱ - آماده‌سازی حیوانات : دو گروه ده تایی خوکچه هندی با میانگین وزن اولیه ۷۲±۵۶۰ گرم و ۹۰±۷۳۰ گرم به‌مدت ۲۰ روز به‌ترتیب تحت تجویز آب مقطر استریل و ۰/۱ میلی‌گرم ایزوپروترنول از طریق داخل صفاقی قرار گرفتند. سه گروه ده‌تایی خرگوش نیز با میانگین وزن ۳۵۰±۱۱۰۰ گرم به‌مدت ۱۵ روز به‌ترتیب تحت تجویز آب مقطر استریل و ۶۰ و ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن دوبوتامین و تربوتالین قرار گرفتند. گروههای آزمایشی به‌طور مجزا در یک اطاق نگهداری شدند. آب و غذا در این مدت به‌صورت آزاد در اختیار حیوانات بود. پس از پایان مدت مذکور حیوانات از طریق بیهوشی با اتر کشته شدند. غدد بزاقی جدا، توزین و سپس در فریزر ۵۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

۲ - تهیه عصاره : یک گرم از غدد بزاقی را با نیتروژن مایع به حالت انجماد در آورده و پس از ساییدن توسط هموژنیزر دستی با چهار حجم بافر فسفات ۰/۰۲۵ مولار با pH=۷/۲ مخلوط کرده و در سانتریفوژ مدل MSE در ۴۰۰۰×g به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد (۱۷). از مایع رویی جهت تعیین مقدار پروتئین و انجام آزمایش الکتروفورز استفاده گردید.

۳ - آزمایشات بیوشیمیایی : پروتئین تام به‌روش لوری (۲۵)، SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) به روش لاملی (۲۴) و سنجش آمیلاز به روش کوفمان (۲۱) انجام شد. در این روش الکتروفورز دو لایه ژل متراکم‌کننده حاوی آکریل‌آمید و ژل جداکننده حاوی سدیم ددسیل سولفات در بافر تریس HCl به‌کار می‌رود. عصاره‌های غدد با بافر مرکاپتواتانول مخلوط و پس از جوش در حمام آبی در چاهکهای ژل قرار می‌گیرند. شدت جریان ثابت الکتروفورز ۲۵ میلی‌آمپر می‌باشد. رنگ‌آمیزی ژلها با کوماسی‌بلو حاوی اسید استیک و متانول صورت می‌گیرد. از مخلوط اسید استیک و متانول به‌عنوان محلول رنگ بر ژل استفاده می‌شود.

۴ - آنالیز آماری : جهت بررسی اختلاف میانگین وزن و میزان پروتئین تام غدد در هر یک از گروههای دوبوتامین و تربوتالین و شاهد از آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA One - Way) و Duncan's multiple range test استفاده گردید. جهت بررسی اختلاف میانگین وزن، میزان پروتئین تام و آمیلاز در هر یک از غدد بناگوشی و تحت‌فکی گروه شاهد با گروه ایزوپروترنول در خوکچه هندی از آزمون آماری t-student's استفاده گردید. نتایج برحسب Mean±SD گزارش شده است.

نتایج

در جدول ۱ تغییرات وزنی، پروتئینی و آمیلاز غدد بناگوشی و تحت‌فکی خوکچه هندی تحت‌تأثیر ایزوپروترنول و در جدول ۲ تغییرات وزنی و پروتئینی غدد بزاقی خرگوش تحت‌تأثیر داروهای دوبوتامین و تربوتالین بررسی و با گروه شاهد مقایسه گردیده است. در جداول میزان درصد افزایش یا کاهش تغییرات نیز در مقایسه با گروه شاهد مقایسه گردیده است. در تصویر یک الگوی الکتروفورزی پروتئینهای غدد بناگوشی و تحت‌فکی خوکچه هندی تحت‌تأثیر ایزوپروترنول با گروه شاهد مقایسه گردیده است. در شکل دو الگوی الکتروفورزی پروتئینهای غدد بزاقی خرگوش تحت‌تأثیر دوبوتامین و تربوتالین با گروه شاهد مقایسه گردیده است. تراکم باندهای پروتئینی در هر ناحیه با وزن ملکولی خاص خود (کیلودالتون) با فلش نشان داده شده است.

جدول ۲ - مقایسه میانگین و انحراف معیار وزن، پروتئین تام غدد بزاقی خرگوش تحت‌تأثیر دوبوتامین و تربوتالین در مقایسه با گروه شاهد

گروه	غده	فاکتور			
		وزن غده (میلی‌گرم)	A	پروتئین تام غده (میلی‌گرم)	A
دوبوتامین (n=۱۰)	بناگوشی	۱/۸۶±۰/۳۱*	۱۱۶	۲۱۴/۸±۹۲/۵*	۴۵۹
	تحت‌فکی	۰/۹۳±۰/۱۸	۸	۱۰۸/۶۸±۴۲**	۱۵۸
	زیرزبانی	۰/۰۸۶±۰/۰۲۸	۳۶	۱۰/۶±۶/۲	۳۶
تربوتالین (n=۱۰)	بناگوشی	۱/۳۸±۰/۱۹**	۶۰	۱۵۰/۸±۷۴**	۲۹۲
	تحت‌فکی	۱/۰۵±۰/۱۲**	۴۰	۹۲±۲۱/۸**	۱۱۸
	زیرزبانی	۰/۰۷۱±۰/۰۳۱	۱۲	۹/۶±۴/۸	۲۳
شاهد (n=۱۰)	بناگوشی	۰/۸۶±۰/۲۲	۰	۳۸/۴±۱۹	۰
	تحت‌فکی	۰/۷۵±۰/۰۹۲	۰	۴۲/۱±۱۷/۲	۰
	زیرزبانی	۰/۰۶۳±۰/۰۱۸	۰	۷/۸±۲/۲	۰

*) P<۰/۰۱، **) P<۰/۰۵، A) درصد افزایش یا کاهش نسبت به شاهد.

بحث

تحت‌تأثیر تجویز ایزوپروترنول به‌مدت ۲۰ روز وزن غده بناگوشی خوکچه هندی به بیش از دو برابر و غده تحت‌فکی به ۱/۵ برابر نسبت به گروه شاهد افزایش می‌یابد (جدول ۱). همچنین تحت تجویز دوبوتامین و تربوتالین به خرگوش نیز وزن غدد بناگوشی به‌ترتیب ۲ و ۱/۵ برابر نسبت به گروه شاهد افزایش نشان می‌دهد (جدول ۲). غده تحت‌فکی خرگوش نیز تحت‌تأثیر تربوتالین در مقایسه با شاهد ۴۰ درصد افزایش وزن نشان می‌دهد. روبی نوویج و همکاران (۱۹۹۷) گزارش نمودند که تزریق متوالی ایزوپروترنول به موش صحرایی باعث تغییرات مورفولوژیکی و هیستوشیمیایی مختلف بویژه در غدد بناگوشی می‌شود (۳۹). سلی و همکاران (۱۹۶۱)، اشنایر (۱۹۶۲) گزارش نمودند که تجویز طولانی‌مدت ایزوپروترنول به موش آزمایشگاهی و موش صحرایی باعث هیپرتروفی غدد بزاقی بناگوشی و تحت‌فکی می‌شود، به‌طوری که وزن غدد بزاقی در موش آزمایشگاهی تا ۵ برابر قبل از تزریق افزایش می‌یابد (۴۲ و ۴۱). کاواگوشی و همکاران (۱۹۹۷) گزارش نمودند که تجویز طولانی مدت ایزوپروترنول به موش آزمایشگاهی به‌ترتیب باعث افزایش وزن غدد بناگوشی و تحت‌فکی به میزان ۴ و ۲ برابر در مقایسه با شاهد می‌شود (۲۲). صائب و جوانمردی (۱۳۷۷) گزارش نمودند که تجویز دوبوتامین و تربوتالین به موش آزمایشگاهی به‌ترتیب باعث افزایش وزن غدد بناگوشی به میزان ۸۲ درصد و ۳۳ درصد در مقایسه با شاهد می‌شود (۲). همچنین صائب و همکاران (۱۳۷۸) گزارش نمودند که تجویز طولانی مدت ایزوپروترنول به خرگوش باعث افزایش وزن غدد بناگوشی و تحت‌فکی به میزان ۵ و ۱/۵ برابر در مقایسه با شاهد می‌شود (۱). بنابراین علت این افزایش وزن چنان‌که قبلاً نیز گزارش شده است هیپرتروفی و هیپرپلازی غدد بزاقی می‌باشد (۴۲ و ۳۱).

تحت‌تأثیر ایزوپروترنول میزان پروتئین تام و آمیلاز غده بناگوشی خوکچه هندی در مقایسه با غده تحت‌فکی بیش از دو برابر کاهش یافته است ($P<0/01$ و $P<0/001$). همچنین تحت‌تأثیر دوبوتامین و تربوتالین میزان پروتئین تام در غدد بناگوشی و تحت‌فکی خرگوش افزایش می‌یابد. تحت‌تأثیر دوبوتامین و تربوتالین میزان پروتئین تام غدد بناگوشی بیش از ۵ و ۳ برابر در مقایسه با شاهد افزایش نشان می‌دهد ($P<0/01$ و $P<0/05$). افزایش وزن غدد تحت‌فکی تحت‌تأثیر دوبوتامین و تربوتالین کمتر از غدد بناگوشی می‌باشد. فرناندز و همکاران (۱۹۷۴)، مهانشو و کارلسون (۱۹۸۳) گزارش نمودند که در اثر تجویز طولانی مدت ایزوپروترنول به موش صحرایی میزان پروتئین تام در غده هیپرتروفی شده بناگوشی و تحت‌فکی در مقایسه با گروه شاهد افزایش می‌یابد (۲۸ و ۱۶). تاکیدا (۱۹۷۸) گزارش نمود که حدود ۷۰ درصد اعصاب غده بناگوشی و تحت‌فکی در موش صحرایی، موش آزمایشگاهی، خرگوش و انسان از نوع آدرنرژیک و ۳۰ درصد باقیمانده از نوع کلینرژیک می‌باشند (۴۳). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که غدد بناگوشی و تحت‌فکی بیشتر تحت‌تأثیر عوامل آدرنرژیک هستند و گیرنده‌های آدرنرژیک در غدد بناگوشی و تحت‌فکی بیش از غده زیرزبانی می‌باشند. هنریکسون (۱۹۸۲) گزارش کرده است که گیرنده‌های آدرنرژیک بتا-یک و بتا-دو در سلولهای آسینار غدد بزاقی بناگوشی موش صحرایی دارای اثرات متفاوتی می‌باشد (۱۹). تحریک گیرنده‌های بتا-یک باعث ترشح میزان زیاد آمیلاز، در حالی‌که تحریک گیرنده‌های بتا-دو باعث افزایش تجمع c.AMP مربوط به پروتئینهای غنی از پرولین می‌گردد. با توجه به اینکه در اثر داروی ایزوپروترنول گیرنده‌های بتا-آدرنرژیک تحریک می‌شوند، لذا کم‌شدن میزان آمیلاز غده بناگوشی که عمدتاً در اثر گیرنده‌های بتا-یک می‌باشد (۱۹ و ۱۲) با گزارشات مربوط به مطالعاتی که قبلاً در حیوانات دیگر انجام گرفته مشابه می‌باشد. با توجه به آنچه ذکر گردید می‌توان احتمال داد که ساخت پروتئینها بویژه پروتئینهای غنی از اسید آمینه پرولین در اثر تحریک گیرنده‌های آدرنرژیکی بتا-دو می‌باشد و کاهش ساخت این گروه پروتئینی در غده بناگوشی خوکچه هندی احتمالاً به‌دلیل فقدان و یا کم‌بودن گیرنده‌های آدرنرژیکی بتا-دو در سطح این غده می‌باشد. دانیلسون و همکاران (۱۹۸۲) گزارش نمودند که تعداد گیرنده‌های بتا-یک غده بناگوشی بیش از بتا-دو می‌باشد (۱۳). بنابراین بیشتربودن تغییرات وزنی و پروتئینی در اثر دوبوتامین را می‌توان به بیشتربودن گیرنده‌های بتا-یک به بتا-دو در غده بناگوشی نسبت داد.

تحت‌تأثیر تجویز ایزوپروترنول الگوی پروتئینی غده تحت‌فکی خوکچه هندی در مقایسه با غده بناگوشی تغییر می‌نماید. همچنین تحت‌تأثیر دوبوتامین و تربوتالین ترکیب پروتئینی غده بناگوشی تغییر یافته و این تغییرات تحت‌تأثیر دوبوتامین بیش از تربوتالین می‌باشد. یکی از اثرات مهم تجویز طولانی مدت داروهای مقلد سمپاتیک بتا مانند ایزوپروترنول افزایش سنتز پروتئینهای غنی از پرولین در غدد بزاقی می‌باشد (۲۹ و ۲۷). هنریکسون (۱۹۸۲) گزارش نمود که داروهای انتخابی تحریک‌کننده گیرنده‌های بتا-یک و بتا-دو باعث تحریک ساخت DNA در غده بناگوشی موش صحرایی می‌شوند (۱۸). این محقق گزارش نمود که تحریک گیرنده‌های بتا-دو باعث افزایش مشخص در میزان c.AMP می‌گردد. منصوری و همکاران (۱۹۹۲) گزارش نمودند که میزان PRP_s در بزاق موش آزمایشگاهی بسیار پایین است (۲۷)، ولی می‌توان آن را به‌وسیله تزریق طولانی مدت ایزوپروترنول افزایش داد (۱۴). بدی (۱۹۹۳) گزارش نمود که ده روز تزریق دوبوتامین به موش صحرایی باعث افزایش مشخص در PRP_s موجود در غده بناگوشی می‌شود (۷). بنیک و کوئل (۱۹۷۱) چهار نوع PRP_s از غده بناگوشی انسان جدا کرده‌اند که وزن ملکولی بین ۹/۹ تا ۱۶/۳ کیلودالتون دارا می‌باشند (۹). مونزر و همکاران (۱۹۷۹) از غده بناگوشی موش صحرایی تحت تزریق طولانی مدت ایزوپروترنول PRP_sهای بازی با وزن ملکولی بین ۱۵ تا ۱۸ کیلودالتون جدا کرده‌اند (۳۳). مهانشو و همکاران (۱۹۸۵) گزارش نمودند که تحت‌تأثیر تجویز ایزوپروترنول به موش آزمایشگاهی پروتئینی با وزن ملکولی ۲۷ کیلودالتون در غده بناگوشی افزایش می‌یابد که همانند تأثیر دوبوتامین در این تحقیق است (۲۹). روبینسون و همکاران (۱۹۸۹) گزارش کرده‌اند که بزاق غدد تحت‌فکی و زیرزبانی حاوی یک PRP_s بازی غیرگلیکوزیله با وزن ملکولی ۱۶ کیلودالتون می‌باشد (۳۸). بنابراین احتمال دارد که باندهای پروتئینی ۱۴/۸ و ۱۶/۵ کیلودالتون در غده بناگوشی خوکچه هندی تحت‌تأثیر ایزوپروترنول و همچنین باندهای پروتئینی ۱۶ و ۱۸ کیلودالتون جداشده در غده تحت‌فکی و زیرزبانی خرگوش تحت‌تأثیر تربوتالین انواع خاصی از PRP_sهای قلیایی باشند. بنیک (۱۹۸۲) گزارش کرد که در موش صحرایی PRP_sهای اسیدی وزن ملکولی بین ۲۴/۵ تا ۷۱ کیلودالتون دارا می‌باشند (۱۱). همچنین این محقق یک PRP_s قلیایی با وزن ملکولی ۳۶/۴ کیلودالتون از غدد بزاقی موش صحرایی جدا نموده است. مهانشو و همکاران (۱۹۸۵) گزارش نمودند که در الکتروفورز عصاره غدد تحت‌فکی و بناگوشی موش صحرایی تحت تجویز طولانی مدت ایزوپروترنول PRP_sهایی با وزن ملکولی ۲۷، ۳۲، ۳۴ و ۳۸ کیلودالتون افزایش می‌یابد (۲۹). مهانشو و همکاران (۱۹۸۷) گزارش نمودند که در غدد بناگوشی و تحت‌فکی هامستر تحت تجویز طولانی مدت ایزوپروترنول و تانن یک PRP_s قلیایی با وزن ملکولی ۴۵ کیلودالتون و دو PRP_s اسیدی با وزن ملکولی ۳۸ کیلودالتون افزایش می‌یابند (۳۱). همچنین بدی و بدی (۱۹۹۵) از غده بناگوشی موش صحرایی تحت تجویز طولانی مدت ایزوپروترنول PRP_sهای قلیایی با وزن ملکولی بین ۱۴ تا ۴۵ کیلودالتون و PRP_sهای اسیدی با وزن ملکولی بین ۴۰ تا ۶۰ کیلودالتون جدا نموده‌اند (۸). بنابراین به‌نظر می‌رسد که احتمالاً باندهای ۳۲، ۳۴، ۳۵، ۳۸ و ۴۰ کیلودالتون در غده بناگوشی خرگوش تحت‌تأثیر تجویز دوبوتامین و تربوتالین انواع خاصی از

PRP_s می‌باشند که البته برای تأیید آن نیاز به خالص‌سازی و مشخص‌کردن ساختمان این پروتئینها می‌باشد. هنریکسون (۱۹۸۲) گزارش نموده است که تحریک گیرنده‌های بتا-یک باعث افزایش ترشح آمیلاز در غده بناگوشی موش صحرایی می‌شود (۱۹). با توجه به این اثر گیرنده‌های بتا-یک و تحریک گیرنده‌های بتا-دو در تحریک سنتز PRP_s به‌نظر می‌رسد که در غدد تحت‌فکی خوکچه هندی افزایش باند ۵۲ کیلودالتون آمیلاز مربوط به کاهش تخلیه غده و افزایش ذخیره آن در غده و لذا کاهش گیرنده‌های بتا-یک و افزایش پروتئینهای غنی از پرولین مربوط به افزایش گیرنده‌های بتا-دو در این غده می‌باشد. به‌دلیل کاهش باند آمیلاز و PRP_s در غده بناگوشی خوکچه هندی تحت‌تأثیر تجویز ایزوپروترنول به‌نظر می‌رسد که احتمالاً تعداد گیرنده‌های بتا-یک در غده بناگوشی از بتا-دو بیشتر می‌باشد که باعث تخلیه بیشتر غده گردیده است.

در کل می‌توان نتیجه گرفت که الگوی پراکندگی گیرنده‌ها در غدد تابع عصب‌دهی این غدد می‌باشد. در خرگوش غدد زیرزبانی که کمترین میزان اعصاب سمپاتیک را دریافت می‌کنند در اثر تجویز داروهای دوبوتامین و تربوتالین تغییرات چندانی از خود نشان نمی‌دهند. در غدد تحت‌فکی خرگوش با وجود بزرگ‌شدن غدد تغییر چندانی در الگوی پروتئینی ایجاد نشد که احتمالاً نشان می‌دهد که گیرنده‌های بتا در این غده نسبت به غده بناگوشی کمتر می‌باشد. غده بناگوشی که اعصاب سمپاتیک بیشتری را دریافت می‌کند بیشتر تغییر کرده‌اند و می‌توان نتیجه گرفت که گیرنده‌های بتا-یک و بتا-دو در غده بناگوشی بیشتر از غدد دیگر می‌باشند. همچنین تغییر بیشتر غدد بناگوشی در اثر دوبوتامین را می‌توان به بیشتربودن گیرنده بتا-یک نسبت به گیرنده بتا-دو در این غده نسبت داد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز که در انجام این تحقیق همکاری نموده‌اند و همچنین مرکز تحقیقات بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان و همچنین بخش بیوشیمی دانشکده دامپزشکی شیراز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. صائب، م.، شفیعا، س. و ساجدیانفرد، ج. تأثیر ایزوپروترنول بر الگوی الکتروفورزی پروتئینهای غدد بزاقی خرگوش. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دوره ششم، شماره ۳، صفحه : ۱۶۴-۱۵۷، (۱۳۷۸).

۲. صائب، م. و جوانمردی، ا. بررسی الگوی پروتئینی غدد بزاقی بناگوشی در موش آزمایشگاهی قبل و بعد از تزریق دوبوتامین و تربوتالین. مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی، سال دوم، شماره ۲، صفحه : ۱۶۱-۱۵۵، (۱۳۷۷).

3. Abe, K., Inove, H. and Ykota, Y. Effects of the selective β2-adrenergic agonists, procatrol and terbutaline on protein secretion by chronic isoproterenol administration. J. Dent. Res., 64: 886-890, (1985).

4. Ann, D.K., Lin, H.H. and Kousvelari, E. Regulation of salivary-gland-specific gene expression. Crit. Rev. Oral. Biol. Med., 8(3): 244-52, (1997).

5. Bannister, A., Divecha, N., Ashmore, M. and McDonald, C. Basic proline-rich proteins of murine glands. Eur. J. Biochem, 181: 371-379, (1989).

6. Bark, T. Further studies on the stimulation of deoxyribonucleic acid synthesis in the submandibular gland by isoproterenol. Lab. Invest., 22: 73-80, (1970).

7. Bedi, G.S. The effect of adrenergic agonists and antagonists on the expression of proteins in rat submandibular and parotid glands. Crit. Rev. Ora. Biol. Med., 4: 565-571, (1993).

8. Bedi, G.S. and Bedi, S.K. Purification and characterization of rat parotid glycoslated basic and acidic proline-rich proteins. Prep Biochem, 23(5): 119-32, (1995).

9. Bennich, A. and Connell, G.E. Purification and partial characterization of four proteins from human parotid saliva. Biochem. J., 123: 455-464, (1971).

10. Bennick, A., Mclaughlin, A.C., Grey, A.A. and Madapallimattam, G. The location and nature of calcium-binding sites in acidic proline-rich proteins. J. Biol. Chem., 265: 4741-4746, (1981).

11. Bennick, A. Salivary proline-rich proteins. J. Biochem, 45: 83-99, (1982).

12. Carlsso, B., Danielsson, A. and Henriksson, R. β1- and β2-adrenoceptor mediated secretion of amylase from incubated rat parotid gland. Acta Physiol Scand, 120: 429-435, (1984).

13. Danielsson, A., Henriksson, R., Lindstrom, P. and Sehlin, J. The importance of an intact sympathetic innervation for the differentiation of the β-adrenoceptor subtype in the rat parotid gland. Acta Physiol Scand, 115: 377-379, (1982).

14. Divecha, N., Mansouri, H., Peat, D., Cope, G.H., Patridge, L. and McDonald, C.J. Isoprenaline induced and constitutive members of a proline-rich protein subgroup from mouse parotid glands studied with monoclonal antibody NAL1. J. Mol. Endoecrinol., 3: 7-14, (1989).

15. Douglas, G.W.T. and Russell, R.R.B. The adsorption of salivary component to strains of bacterium streptococcus mutans. Arch. Oral. Biol. 29: 751-757, (1984).

16. Fernandez-Sorensen, A. and Carlson, D.M. Isolation of a proline-rich protein from rat parotid glands following isoproterenol treatment. J. Biochem. Biophy. Res. Commun, 60: 249-256, (1974).

17. Haghighat, M., Motamed, A., Vaseghi, T. and Aminlari, M. Isoprenaline induces biosynthesis of proline-rich proteins in the salivary glands of rat but not in sheep. Comp. Biochem. Physiol., 115(2): 165-168, (1996).

18. Heniksson, R., Carlson, B., Danielsson, A., Hellstrom, S. and Idahl, C.A. Effects of neonatal sympathetic differentiation on amylase secretion in the adult parotid gland: Differences in β1- and β2- adrenoceptor response. Eur J. Pharmacol. 78: 195-200, (1982).

19. Henriksson, R. β1- and β2- adrenoceptor agonists have different effects on rat parotid acinar cells. Am. J. Physiol., 21: 481-486, (1982).

20. Kauffman, D.L. and Keller, P.J. The basic proline-rich proteins in human parotid saliva from a single subject. Arch. Oral. Biol., 24: 249-256, (1979).

21. Kauffman, R.A. and Tietz, N.W. Recent advances in

measurement of amylase activity-a comparative study. Clin. Chem., 20: 846-853, (1980).

22. Kawaguchi, T., Murai, S., Saito, H. and Itoh, T. Changes in the noradrenaline and acetyl choline content of three major salivery glands and in the salivation and protein component patterns of whole saliva in chronically isoprenaline administered mice. Arch. Oral. Biol., 42(3): 225-34, (1997).

23. Kousvelari, E.E., Baratz, R.S., Burke, B. and Oppenheim, F.G. Immunochemical identification and determination of proline-rich proteins in salivary secretions, enemale pellicle, and glandular tissue specimens. J. Dent. Res., 59: 1430-1438, (1980).

24. Laemmli, U.K. Cleavage structural proteins during the assembely of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685, (1970).

25. Lowry, D.H., Rosenbrough, N.T., Farr, A.L. and Randall, A.J. Protein measurment by pholin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, (1951).

26. Malamud, D. and Basserga, R. On the mechanism of action of isoproterenol in stimulation DNA synthesis in salivary gland of rats and mice. Life Sci., 6: 1765-1769, (1967).

27. Mansouri, S.H., Cope, G.H., Divecha, N. and McDonald, C.J. Electron microscopic immunocytochemical localization of proline-rich proteins in normal mouse parotid salivary glands. Histochem. J., 24: 237-247, (1992).

28. Mehansho, H. and Carlson, D.M. Induction of protein and glycoprotein synthesis in rat submandibular glands by isoproterenol. J. Biol. Chem., 268: 6616-6620, (1983).

29. Mehansho, H., Clements, S., Shears, B.T., Smith, S. and Carlson, D.M. Induction of proline-rich glycoprotein synthesis in mouse salivary glands by isoproterenol and by tannis. J. Biol. Chem., 260: 4418-4423, (1985).

30. Mehansho, H., Butler, L.G. and Carlson, D.M. (Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interaction, induction and defense mechanism. Ann. Rev. Nutr., 7: 423-440, (1987).

31. Mehansho, H., Ann, D.K., Butler, L.G., Rogler, J. and Carlson, D.M. Induction of proline-rich proteins in hamster salivary glands by isoproterenol treatment and an unusual growth inhibition. J. Biol. Chem., 262: 12344-12350, (1987).

32. Muenzer, J. Properties of proline-rich proteins from parotid glands of isoproterenol treated rats. J. Biol. Chem., 254: 5629-5634, (1974).

33. Muenzer, J., Bildstein, C., Gleason, M. and Carlson, D.M. Purification of porline-rich proteins from parotid glands of isoproterenol-treated rats. J. Biol. Chem., 254: 6523-6528, (1979).

34. Nichols, H.B. and McDonald, L.E. Veterinary pharmacology and therapeutics. 5th ed. Iowa State University Press. PP: 89-100, (1982).

35. Oppenheim, F.G., Hay, D.I. and Franzblou, C. Proline-rich proteins from human parotid saliva, isolation and partial characterization. J. Biochem, 10: 4233-4238, (1971).

36. Oppenheim, F.G., Kousvelari, E.E. and Toxler, R.F. Immunological cross reactivity and structural homology between salivary proline-rich proteins in human and macaque monkey (macaca fascicularis) parotid saliva. Arch. Oral. Biol., 24: 595-599, (1979).

37. Rajan, A. and Bennick, A. Demonstration of proline-rich proteins in rabbit parotid saliva and partial characterization of some of the proteins. Arch. Oral. Biol. 28: 431-439, (1983).

38. Robinson, R., Kauffman, D.L., Waye, M.M.Y., Blum, M. and Bennick, A. Primary structure and possible origin of the non-glycosylated basic proline-rich protein of human submandibular/sublingual saliva. Biochem. J., 263: 497-503, (1989).

39. Robinovitch, M., Murry, R., Paricia, J., Johnson, D.A., Iversen, J. and Kauffman, D. Changes in rat parotid salivary proteins induced by chronic isoproterenol administration. J. Dent. Res., 55: 687-692, (1977).

40. Sans, J. and Galanti, N. effects of some drugs and unilateral parotidectomy upon secretion and cell proliferation in the mouse parotid gland. Cell. Mol. Biol., 25: 107-112, (1979).

41. Schneyer, C.A. Salivary gland changes after isoproterenol-induced enlargement. J. Phys., 203: 232-236, (1962).

42. Selye, H., Cantin, M. and Veilleux, R. Excessive stimulation of salivary gland growth by isoproterenol. Sci., 133: 44-45, (1961).

43. Takeda, M. Electron microscopy of the adrenergic and cholinergic never terminals in the mouse salivary glands. Arch Oral. Biol., 23: 852-864, (1978).

44. Zhou, J., Wright, P.S., Wong, E., Jessen, K., Morand, J.N., Carlson, D.M. Cyclic-AMP rugulation of mouse proline-rich protein gene expression; isoproterenol induction of AP-1 transcription factors in parotid gland. Arch Biochem. Biophy., 338(1): 97-103, (1997).

The effects of isoproterenol, dobutamine and terbutaline agonists on protein composition of guinea pig and rabbit salivary glands

Saeb, M.[1], Akbarian, M.R.[2]

[1]*Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran.* [2]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran.*

Long term administration of β-sympatheticomimetic drugs to

animals such as rat, mouse and hamster causes some significant changes in parotid and submandibular glands. These changes include hypertrophy and hyperplasia of glandular tissues, intial release of amylase from glands, prevention of amylase synthesis and increase in the synthesis of a new group of proteins called proline-rich proteins (PRP_s). Studies have shown that these changes induced by these drugs are mediated through interaction with the cell surface β-adrenergic receptors. In the present study, two groups of male guinea pig and three groups of male adult albino rabbits were selected. Guinea pigs were injected i.p with isoproterenol (0.1 mg/Anim) for 20 days. Rabbits treated for 15 consecutive days with β1- agonist dobutamine, 60 mg/kg body wt per day or by β2- agonist terbutaline 40 mg/kg body wt per day respectively. Sterile distilled water was used for controls. In the end of experiment animals sacrificed and salivary glands were extirpated and weighed, then gland extracts prepared. After using isoproterenol, both parotid and submandibular glands revealed a significant increare in weights ($P<0.01$). The weights of the parotid glands increased significantly after both dobutamine and terbutaline treatment ($P<0.01$). Submandibular gland weights also, were affected significantly by terbutaline ($P<0.05$). Biochemical studies indicated that isoproterenol decreases the amount of total protein and amylase in parotid gland ($P<0.01$), but on the other hand, in submandibular gland total protein and amylase increased ($P<0.01$, $P<0.001$). Dobutamine and terbutaline increased significantly the concentration of total protein in parotid and submandibular glands ($P<0.01$, $P<0.05$). Gland weights and total protein were not significantly affected by the two selective β-adrenergic agonists in sublingual glands. SDS-PAGE of isoproterenol treated submandibular gland showed protein bands with molecular weights of about 14.8, 16 and 52 kds which the first two bands probably belongs to a group of proline-rich proteins. SDS-PAGE of parotid glands of dobutamine and terbutaline treated animals revealed protein bands with molecular weights of about 40, 38, 35, 34, 32, 27 and 40, 38, 35, 34 kds respectively. SDS-PAGE of submandibular and sublingual of terbutaline treated animals showed protein bands with molecular weights of about 20, 18 and 16 kds respectively. These differences in guinea pig probably shows that the number of β1 and β2 adrenergic receptors may be varied in both parotid and submandibular secretory cells. On the other hand, it seems that in guinea pig β1 - receptors are mainly in parotid salivary gland but in submandibular gland β2-receptors are predominent. The present investigation in rabbit probably suggests that the β- adrenergic receptors may be higher in number in the rabbit parotid gland that in the submandibular or sublingual. On the other hand, β1 subtype is dominant in rabbit parotid gland. These observations, also, suggest that the proteins may probably belong to proline-rich proteins.

Key words : Isoproterenol, Dobutamine, Terbutaline, Guinea pig, Rabbit.