مقاله اصیل پژوهشی

اثر محافظتی آتورواستاتین بر عضله میوکارد قلب در موش صحرایی با پرفشاری شریانی

محمدتقی محمدی[1]، زهرا جهانبخش[2]، رضا امینی[3]، شهناز شکرفروش[4]، بهزاد مصباح‌زاده[5]

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات قبلی نشان می‌دهند که پرفشاری شریانی، باعث هیپرتروفی و استرس اکسیداتیو در عضله قلب می‌شود. در پژوهش حاضر، به مطالعه اثرات درمانی داروی آتورواستاتین بر پاسخ استرس اکسیداتیو و هیپرتروفی قلب، در موش صحرایی با پرفشاری شریانی پرداخته شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار، به صورت تصادفی به چهار گروه شاهد، شاهد درمان‌شده با آتورواستاتین، پرفشار و پرفشار درمان‌شده با آتورواستاتین تقسیم شدند (n=۵). برای القای پرفشاری، از روش تنگی آئورت در بالای شریان‌های کلیه استفاده گردید. بعد از ۲۱ روز، تحت بیهوشی، فشار شریانی کاروتید ثبت شد و پس از اندازه‌گیری وزن قلب، بطن چپ آن جدا شد. پس از هموژن‌کردن بافت‌ها، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، غلظت گلوتاتیون (GSH) و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) میوکارد بطن چپ تعیین گردید.

یافته‌ها: در گروه‌های پرفشار، میانگین فشار شریانی و شاخص هیپرتروفی قلبی (وزن قلب به وزن بدن) به ترتیب به میزان ۷۰ و ۷۶ درصد افزایش داشت. فعالیت آنزیم SOD و CAT، در گروه پرفشار در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($P<۰/۰۵$)؛ همچنین پرفشاری شریانی سبب کاهش سطح گلوتاتیون میوکارد به میزان ۵۹٪ شده و میزان MDA را ۶۲٪ افزایش داد. درمان با آتورواستاتین فقط توانست از کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم CAT جلوگیری نماید.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد پرفشاری شریانی، منجر به استرس اکسیداتیو و هیپرتروفی در عضله میوکارد موش صحرایی می‌شود و درمان با آتورواستاتین ممکن است از استرس اکسیداتیو ناشی از پرفشاری در بافت قلب جلوگیری نماید.

واژه‌های کلیدی: آتورواستاتین، پرفشاری شریانی، استرس اکسیداتیو، هیپرتروفی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند (ویژه نامه قلب). ۱۳۹۱؛ ۱۹ (۶): ۵۰-۶۰

دریافت: ۱۳۹۱/۰۶/۲۹ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۹/۲۸

[1] نویسنده مسؤول، استادیار، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران.
آدرس: تهران- میدان ولیعصر (عج)- خیابان ملاصدرا- خیابان شیخ بهایی- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج).
تلفن: ۰۹۱۵۱۶۳۵۰۱۸ پست الکترونیکی: Mohammadi.mohammadt@yahoo.com
[2] دانشجوی دکترای، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران.
[3] کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران.
[4] استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، فارس، ایران.
[5] مرکز تحقیقات آترواسکلروز و عروق کرونر، دانشجوی دکترا، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

مقدمه

تولید بیش از حدّ طبیعی رادیکال‌های فعال اکسیژن[1] و تجمع این مواد واکنش‌پذیر، سبب بروز فرآیند استرس اکسیداتیو در بافت‌های بدن می شود. تشکیل این رادیکال‌ها سبب تخریب ماکرومولکول‌های حیاتی سلول‌ها، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و نهایتاً آسیب به بافت‌ها می‌شود (۱، ۲). بروز استرس اکسیداتیو در برخی از شرایط پاتولوژیک نظیر: پرفشاری شریانی[2]، نارسایی کلیه، دیابت ملیتوس و ایسکمی بافت‌های بدن، نقش اساسی در ایجاد آسیب‌های ناشی از این اختلالات بر عهده دارد (۳). پرفشاری شریانی، یک حالت پیچیده پاتوفیزیولوژیک بوده و به مرور زمان، باعث ایجاد تغییرات آسیب‌رسان در بافت‌های بدن از جمله قلب می‌شود (۴).

هیپرتروفی میوکارد، یکی دیگر از پیامدهای پرفشاری شریانی بوده که در صورت عدم کنترل، منجر به نارسایی قلب می‌شود (۵). به غیر از پاسخ فیزیولوژیک قلب به افزایش بار قلبی، زیادشدن غلظت بعضی از فاکتورها در گردش خون از جمله: اندوتلین، کاتکول آمین‌ها، و آنژیوتانسین-II، در این امر دخیل می‌باشند (۶). بر اساس مطالعات اخیر، تشکیل ROSها، در برخی از مدل‌های آزمایشگاهی پرفشاری شریانی افزایش یافته و منجر به بروز استرس اکسیداتیو در بافت‌های بدن می‌شود (۷). در حالت طبیعی بدن، بین تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، تعادل برقرار است. عدم تعادل در میزان تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، سبب به وجودآمدن استرس اکسیداتیو می‌شود (۱). سیستم آنتی‌اکسیدانی به واسطه سیستم آنزیمی، دفاع اصلی بدن در برابر آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد بوده که آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز[3] و کاتالاز، جزئی از آن به شمار می‌روند (۱)؛ از طرفی گلوتاتیون، مهمترین آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی بوده که با استرس اکسیداتیو مقابله می‌کند (۸).

نتایج تحقیق Ungvari نشان می‌دهد، القای پرفشاری شریانی با تنگی آئورت، سبب بروز استرس اکسیداتیو در اندام‌های فوقانی شده و میزان تولید آنیون سوپراکسید در عروق این اندام‌ها زیاد می‌شود (۷). همچنین در مطالعه دیگری که به واسطه تنگی آئورت در بالای شریان‌های کلیه فشار خون ایجاد شد، میزان بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله: SOD، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در دیواره آئورت افزایش داشته است (۲). این نتایج، تأییدکننده این مطلب بوده است که پرفشاری شریانی، سبب بروز استرس اکسیداتیو در بافت‌های در معرض فشار خون بالا شده است؛ با این حال در مورد خود بافت قلب و اینکه بین دو متغیر هیپرتروفی قلب و بروز پاسخ استرس اکسیداتیو چه رابطه‌ای وجود داشته است هنوز سؤالات اساسی وجود دارد.

استاتین‌ها جزء داروهای کاهنده کلسترول خون بوده که به واسطه مهار آنزیم ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوتاریل کوآنزیم-آ (HMG-CoA) ردوکتاز، سبب کاهش سنتز کلسترول در کبد می‌شوند. مطالعات اخیر، اثرات بسیار سودمندی از این داروها را در جلوگیری از اختلالات قلبی-عروقی در شرایط پاتولوژیکی همچون پرفشاری شریانی، مستقل از اثرات کاهندگی کلسترول خون گزارش کرده‌اند (۹). در مطالعه Lefer، سیمواستاتین، اثرات ضدّ التهابی قوی بر قلب حیوانات دیابتی داشته و از طریق افزایش تولید نیتریک‌اکساید، سبب محافظت قلب در برابر ایسکمی شد (۱۰)؛ همچنین مطالعه Yagi نشان داد که پیتاواستاتین، از صدمات ایجادشده توسط مواد اکسیدان به واسطه آنژیوتانسین-II، از به وجودآمدن فیبریلاسیون دهلیزی جلوگیری کرده است (۱۱). در مطالعات دیگری نیز پیتاواستاتین، از استرس اکسیداتیو ناشی از هیپوکسی بطن چپ جلوگیری کرد (۱۲) و حتی در مطالعه دیگری، استفاده از استاتین‌ها منجر به کاهش فشار خون سیستولیک و دیاستولیک شد (۱۳). بر اساس این مطالعات، به نظر می‌رسد استاتین‌ها بتوانند جلوی تغییرات آسیب‌رسان ایجادشده ناشی

[1] *Reactive oxygen species, ROS*
[2] *Arterial hypertension*
[3] *Superoxide dismutase, SOD*

از پرفشاری شریانی را مهار نمایند.

بر این اساس، مطالعه حاضر در نظر داشت تا اثرات پرفشاری شریانی را بر تغییر فعالیت آنزیم‌های درگیر در سیستم آنتی‌اکسیدانی و بروز استرس اکسیداتیو، در مدل پرفشاری ناشی از تنگی آئورت در موش صحرایی و اثرات داروی آتورواستاتین را در جلوگیری از تغییرات ایجادشده در سیستم آنتی‌اکسیدانی در طول پرفشاری شریانی را مورد مطالعه قرار دهد.

روش تحقیق

در این مطالعه تجربی، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (Wistar)، تهیه‌شده از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... در محدوده وزنی ۲۶۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها بر طبق مقررات اخلاقی کار با حیوانات، مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... انجام گردید. حیوانات در طی دوره آزمایش، در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی، رطوبت مناسب، درجه حرارت $۲۲\pm۲^{o}C$ و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند.

بری انجام تحقیق حاضر، حیوانات مورد آزمایش به صورت تصادفی در ۴ گروه (n=۵) به شرح زیر قرار گرفتند:

۱- گروه شاهد: حیوانات این گروه در روز اول، تحت جراحی شکم (برای القای کوآرکتاسیون آئورت شکمی) قرار گرفتند اما تنگی آئورت شکمی انجام نشد. حیوانات این گروه به عنوان شاهد جراحی مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-گروه شاهد درمان‌شده با آتورواستاتین (شاهد و آتورواستاتین): تمامی مراحل انجام آزمایش در این گروه، همانند گروه شاهد بود؛ با این تفاوت که حیوانات این گروه، روزانه به مدت ۲۱ روز، داروی آتورواستاتین (۲۰mg/kg) را به صورت خوراکی به روش گاواژ دریافت کردند.

۳- گروه پرفشار شریانی: حیوانات این گروه در روز اول، تحت جراحی شکم (برای القای کوآرکتاسیون آئورت شکمی) قرار گرفتند و تنگی آئورت شکمی در بالا شریان‌های دو کلیه صورت گرفت.

۴- گروه پر فشار درمان‌شده با آتورواستاتین (پرفشار و آتورواستاتین): تمامی مراحل انجام آزمایش در این گروه همانند گروه پرفشار شریانی بود؛ با این تفاوت که حیوانات این گروه، روزانه به مدت ۲۱ روز، داروی آتورواستاتین را (۲۰ mg/kg) به صورت خوراکی به روش گاواژ دریافت کردند.

برای القای پرفشاری شریانی، از روش تنگی آئورت شکمی[1] استفاده گردید (۱۴). برای انجام این کار، بعد از بیهوش‌کردن حیوان با ترکیب کتامین (۸۰mg/kg) و زایلازین (۱۰mg/kg)، سمت چپ شکم تراشیده شده و کاملاً ضدّ عفونی شد. با بازکردن شکم در ناحیه سمت چپ و کنار زدن سایر بافت‌ها و احشای شکم، آئورت شکمی در بالای دو شریان کلیه راست و چپ، از بافت‌های اطراف پاک‌سازی شده و برای ایجاد تنگی مناسب، با کمک نخ جراحی آماده شد. در این مرحله، در بالای محل جداشدن شریان‌های کلیوی، آئورت شکمی توسط یک نیدیل شماره G-۲۳ که قبلاً برای این کار آماده شده بود تنگ گردید؛ بدین صورت که ابتدا نیدل، به طور موازی با شریان آئورت شکمی قرار داده شد و با استفاده از نخ سیلک ۰-۳، گره محکمی ایجاد گردید؛ به طوری که جریان خون به طور کامل قطع شد؛ سپس نیدل با دقت و به آرامی از وسط گره خارج گردید. بر اساس تجربه، با این روش، تنگی حدوداً بالای ۹۰٪ ایجاد می‌شد و جریان خون اندام‌های تحتانی تا حدی که نکروز بافتی ایجاد نشود کاهش می‌یافت. بعد از حصول اطمینان از انسداد نسبی آئورت شکمی، کمی پودر پنی‌سیلین-G در محل جراحی پاشیده شد و ناحیه بازشده، توسط نخ بخیه دوخته شد و حیوان تا خاتمه بیهوشی در یک محیط گرم نگهداری گردید؛ سپس حیوان به محل نگهداری خود برگردانده شد. در پایان ۲۱ روز، برای حصول اطمینان از ایجاد

[1] *Abdominal aortic constriction*

پرفشاری شریانی بعد از بیهوشی، کاروتید مشترک، کانول‌گذاری گردید و فشار خون شریانی، از طریق واردساختن یک کانول به شریان کاروتید و با ترانسدیوسر فشار متصل به فیزیوگراف نارکو اندازه‌گیری شد.

در پایان ۲۱ روز فرایند آزمایش، تمامی حیوانات بعد از اندازه‌گیری وزن بدن، تحت بیهوشی قرار گرفتند و بعد از ثبت فشار خون شریانی، بافت قلب آنها جدا گردیده؛ وزن آن اندازه‌گیری شده و بطن چپ جدا و به سرعت به داخل نیتروژن مایع و سپس به فریزر $-۸۰^{o}C$ انتقال پیدا کرد. نسبت وزن قلب به وزن بدن، به عنوان ایندکس هیپرتروفی قلب (g/kg) محاسبه شد. در روز آزمایش، بافت‌های منجمدشده به دقت توزین و به نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفاتسالین، هموژنه شد. پس از آن، نمونه‌ها در دور ۱۴۰۰۰g و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. از محلول رویی، برای سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی مورد نظر استفاده شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز (SOD) از روش Winter bourn استفاده شد (۱۵). ۰/۲ میلی‌لیتر EDTA ۰/۱ مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر نیتروبلوتترازولیوم (NBT) ۱/۵ میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر بافت هموژنه (یا بافر برای کنترل)، به یک کووت اضافه شد و بعد از مخلوط‌کردن به مدت ۵ دقیقه، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس ۰/۰۵ میلی‌لیتر ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار در بافر فسفات پتـــــاسیم ۰/۰۶۷ مولار با pH مساوی ۷/۸ اضافه و به مدت ۱۲ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده شد؛ سپس جذب در طی ۵ دقیقه در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد. یک واحد فعالیت SOD، مقدار آنزیم مورد نیاز است تا ۵۰ درصد از سرعت احیای NBT مهار شود. فعالیت آنزیم، بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، از روش Abei استفاده شد (۱۶). به حجم معینی از عصاره بافتی، اتانول مطلق (۰/۰۱ml/ml) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ اینکوبه گردید. سپس تریتون X–100 ده درصد با غلظت نهایی یک درصد اضافه شد. این محلول، برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم به کار برده شد. واکنش، با اضافه‌کردن ۰/۰۵ میلی‌لیتر H_2O_2 ۳۰ میلی‌مولار به نمونه بافتی، در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH مساوی ۷ شروع شد؛ سپس جذب در طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. یک واحد فعالیت کاتالاز، مقدار یک میکرومول از H_2O_2 است که در یک دقیقه تجزیه می‌شود. فعالیت آنزیم، بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

برای سنجش میزان گلوتاتیون بافت، از روش Tietz استفاده شد (۱۷). غلظت مناسبی از نمونه هموژنه، با ۱۰ میکرولیتر اسید سولفوسالسیلیک ۵ درصد مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و به ۸۱۰ میکرولیتر دی‌سدیم‌فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد؛ سپس با اضافه‌کردن ۹۰ میکرولیتر معرف دی‌تیو–بیس-نیتروبنزوئیک اسید (DTNB) ۰/۴ درصد محلول در سیترات سدیم یک درصد، واکنش شروع گردید. تغییرات جذب، در طول موج ۴۱۲ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوتاتیون یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، منحنی استاندارد گلوتاتیون رسم شد و غلظت گلوتاتیون بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید. محلول استاندارد گلوتاتیون در غلظت‌های ۲۵– ۲۰۰ میکرومولار تهیه شد.

برای تعیین میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، از روش Satho استفاده شد (۱۸). به ۵۰۰ میکرولیتر بافت هموژنه ۱/۵ میلی‌لیتر، تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰ درصد اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید؛ سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته شد و ۲ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک ۰/۶۷ درصد اضافه و به مدت۳۰ دقیقه در بن‌ماری جوش قرار داده شد؛ سپس ۲ میلی‌لیتر ۱– بوتانل، به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید، به مدت ۱۵ دقیقه در

دور g۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ، در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید، با استفاده از ۱، ۱، ۳ و ۳ تترا اتوکسی‌پروپان به عنوان استاندارد، تعیین شده و غلظت مالون‌دی‌آلدئید بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. محلول استاندارد MDA، در غلظت‌های ۰/۲–۲۰ میکرومولار در اسید سولفوریک ۱۰ درصد تهیه شد.

برای تعیین غلظت پروتئین، از روش برادفورد استفاده شد (۱۹). حجم معینی از عصاره بافتی با رقت مناسب برداشته شده و به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول برادفورد با رقت ۳:۱ به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه اینکوبه گردید؛ سپس جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد، ابتدا محلول یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آلبومین سرم گاوی (BSA) تهیه شد؛ سپس غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آن ساخته شد و به عنوان غلظت‌های استاندارد استفاده گردید.

نتایج به دست‌آمده، به صورت میانگین±انحراف‌معیار نمونه (Mean±SEM) ارائه شده است. برای مقایسه داده‌های به دست‌آمده، از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۶) و با روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی استفاده شد و در تمام مقایسه‌ها، $P<0/05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار تلقی گردید.

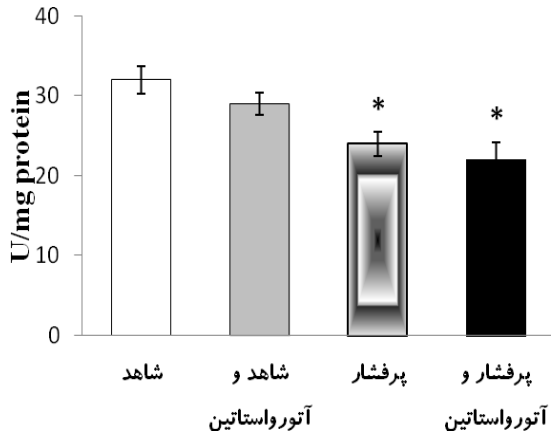
یافته‌ها

مقایسه میانگین متوسط فشار شریانی و ایندکس هیپرتروفی قلب در گروه‌های مورد مطالعه، در جدول یک ارائه شده است. اندازه‌گیری فشار متوسط شریانی در پایان ۲۱ روز تنگی آئورت، افزایش معنی‌داری را در گروه پرفشار شریانی (۷۰ درصد) در مقایسه با گروه شاهد پرفشار نشان داد. اما درمان با داروی آتورواستاتین، هیچ تغییر معنی‌داری در میزان فشار متوسط شریانی گروه شاهد درمان‌شده و گروه پرفشار درمان‌شده با آتورواستاتین به ترتیب در مقایسه با گروه شاهد و گروه پرفشار شریانی به وجود نیاورد. تنگی آئورت شکمی، همچنین سبب افزایش معنی‌دار ایندکس هیپرتروفی به میزان ۷۶ درصد، در گروه پرفشار شریانی در مقایسه با گروه شاهد پرفشار شد. اما درمان با داروی آتورواستاتین، هیچ تغییر معنی‌داری در میزان این ایندکس در گروه شاهد درمان‌شده و گروه پرفشار درمان‌شده به ترتیب در مقایسه با گروه شاهد و گروه پرفشار شریانی به وجود نیاورد.

نمودار یک، میزان فعالیت آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز (SOD) عضله میوکارد بطن چپ را بر حسب U/mg protein در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. نتایج ارائه‌شده در این نمودار، گویای این واقعیت است که ایجاد پرفشاری شریانی پس از ۲۱ روز، سبب کاهش فعالیت این آنزیم در حیوانات گروه پرفشار شریانی در مقایسه با گروه شاهد پرفشار شده است؛ به طوری که میزان فعالیت این آنزیم در گروه شاهد پرفشار و پرفشار شریانی به ترتیب ۱±۳۲ و ۱±۲۴ U/mg protein بود که از لحاظ مقایسه آماری این تغییرات معنی‌دار بود.

جدول ۱- تغییرات متوسط فشار شریانی و ایندکس هیپرتروفی قلب (نسبت وزن قلب به وزن بدن) در گروه‌های مورد مطالعه. داده‌ها به صورت Means±SEM نشان داده شده است.

متغیر / گروه	شاهد	شاهد و آتورواستاتین	پرفشار	پرفشار و آتورواستاتین
متوسط فشار شریانی (mmHg)	۱۲۱±۵	۱۳۳±۳	۱۷۱±۹*	۱۷۶±۴*
ایندکس هیپرتروفی قلب (g/kg)	۲/۶۷±./۰۲	۲/۹۱±۰/۰۷	۳/۴۸±۰/۲۱*	۳/۴۷±۰/۲۵*

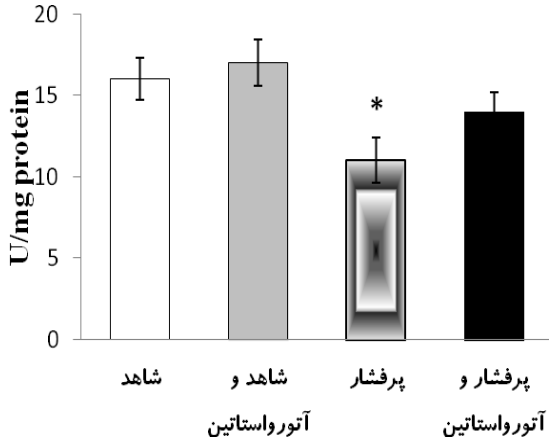


نمودار ۱- تأثیر پرفشاری شریانی بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز (SOD) بعد از گذشت ۲۱ روز از تنگی آئورت شکمی و اثر درمانی آتورواستاتین بر آن. داده‌ها به صورت Means±SEM نشان داده شده است.
* نشانگرتفاوت معنی‌دار با P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد.

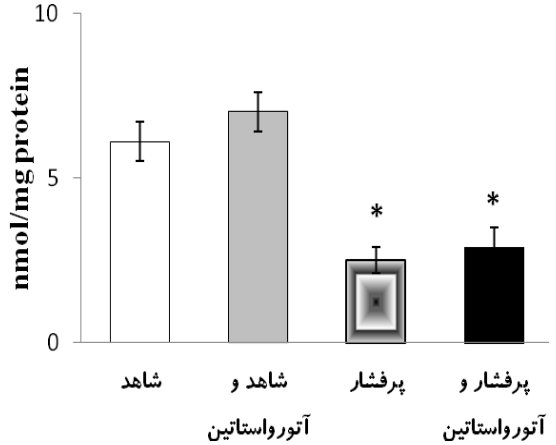
درمان با داروی آتورواستاتین به مدت ۲۱ روز، هیچ تغییر معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم در گروه شاهد درمان‌شده و گروه پرفشار درمان‌شده با آتورواستاتین به ترتیب در مقایسه با گروه شاهد و گروه پرفشار شریانی به وجود نیاورد.

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز عضله بطن چپ بر حسب U/mg protein، در حیوانات گروه پرفشار شریانی و گروه شاهد پرفشار، در نمودار ۲ ارائه شده است. ایجاد پرفشاری شریانی پس از ۲۱ روز سبب کاهش فعالیت این آنزیم (۳۱٪) در حیوانات گروه پرفشار شریانی شد. مقایسه آماری نتایج به دست‌آمده از دو گروه شاهد و گروه پرفشار شریانی، معنی‌دار بوده و میزان فعالیت این آنزیم در گروه شاهد پرفشار و گروه پرفشار شریانی به ترتیب برابر با ۱±۱۳ و ۱±۱۱ U/mg protein بود. درمان با داروی آتورواستاتین، از کاهش معنی‌دار فعالیت این آنزیم فقط در گروه پرفشار درمان‌شده جلوگیری کرد اما بر میزان فعالیت این آنزیم در گروه شاهد درمان‌شده در مقایسه با گروه شاهد، تغییری ایجاد نکرد.

نمودار ۳ تغییرات غلظت گلوتاتیون عضله میوکارد بر حسب nmol/mg protein در گروه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. همان‌طور که از نتایج ارائه‌شده بر می‌آید، میزان غلظت گلوتاتیون عضله میوکارد در حیوانات گروه پرفشار شریانی در مقایسه با گروه شاهد پرفشار، به طور معنی‌داری به میزان ۵۹٪ کاهش داشت. درمان با داروی آتورواستاتین به مدت ۲۱ روز، هیچ تغییر معنی‌داری در میزان غلظت گلوتاتیون در گروه شاهد درمان‌شده و گروه پرفشار درمان‌شده به ترتیب در مقایسه با گروه شاهد و گروه پرفشار شریانی به وجود نیاورد.

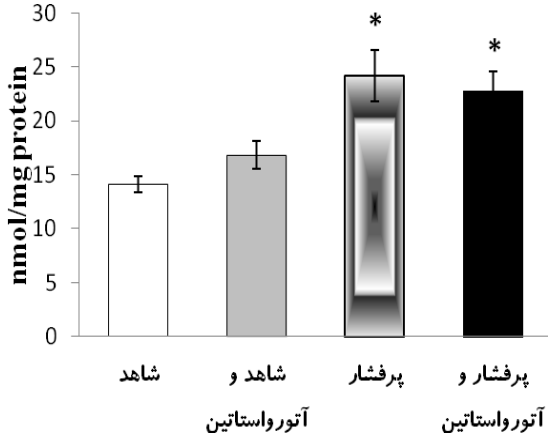


نمودار ۲- تأثیر القای پرفشاری شریانی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) بعد از گذشت ۲۱ روز از تنگی آئورت شکمی و اثر درمانی آتورواستاتین بر آن. داده‌ها به صورت Means±SEM نشان داده شده است. * نشانگر تفاوت معنی‌دار با P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد.



نمودار ۳- اثرات پرفشاری شریانی بر غلظت گلوتاتیون (GSH) بعد از گذشت ۲۱ روز از تنگی آئورت شکمی در حیوانات پرفشار شریانی و تأثیر درمانی آتورواستاتین بر آن. داده‌ها به صورت Means±SEM نشان داده شده است.
* نشانگرتفاوت معنی‌دار با P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد.

تغییرات غلظت MDA عضله میوکارد بر حسب nmol/mg protein در نمودار ۴ ارائه شده است. القای پرفشاری پس از ۲۱ روز، میزان غلظت MDA عضله میوکارد را در حیوانات گروه پرفشار در مقایسه با گروه شاهد، به طور معنی‌داری به میزان ۶۲٪ افزایش داد. درمان با داروی آتورواستاتین به مدت ۲۱ روز، هیچ تغییر معنی‌داری در میزان غلظت MDA گروه شاهد درمان‌شده و گروه پرفشار درمان‌شده به ترتیب در مقایسه با گروه شاهد و گروه پرفشار شریانی به وجود نیاورد.



نمودار ٤- تأثیر القای پرفشاری شریانی بر غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) بعد از گذشت ۲۱ روز از تنگی آئورت شکمی و اثر درمانی آتورواستاتین بر آن. داده‌ها به صورت Means±SEM نشان داده شده است. * نشانگرتفاوت معنی‌دار با P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد.

بحث

افزایش تولید گونه‌های آزاد اکسیژن (ROS)، علاوه بر آسیب به بافت قلب سبب تغییرات ساختاری و عملکردی میوکارد در شرایط پاتولوژیک می‌شود (۲۰). مطالعات انجام‌شده در راستای بیماری پرفشاری شریانی و افزایش تولید ROSها، نشان می‌دهند که تولید بیش از حد طبیعی این رادیکال‌های آزاد، می‌تواند علاوه بر آسیب به بافت قلب، از طریق دخالت در هیپرتروفی قلب، در ایجاد نارسایی قلبی نیز مؤثر باشد (۶، ۷)؛ بر این اساس، جلوگیری از تولید زیاد و تجمع این رادیکال‌ها در شرایط پاتولوژیک همچون پرفشاری شریانی، می‌تواند از تشدید آسیب‌های ناشی از این بیماری و نهایتاً بروز نارسایی قلبی جلوگیری به عمل آورد.

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد، تنگی آئورت شکمی در بالای شریان‌های کلیه، در طی ۲۱ روز توانست علاوه بر بالابردن فشار شریانی در اندام‌های فوقانی بدن به میزان ۷۰٪، سبب هیپرتروفی در بافت قلب (۷۶٪) شود (جدول ۱). تنگی آئورت شکمی در بالای شریان‌های کلیه منجر به افزایش ناگهانی و شدید فشار شریانی در قسمت‌های بالای تنگی می‌شود (۶، ۱۴). این افزایش فشار شریانی در قسمت‌های بالای تنگی آئورت شکمی، با توجه به مکانیسم‌های درگیر، به طور حاد و سریع اتفاق می‌افتد. یکی از پاسخ‌های سازشی قلب برای مقابله با پس‌بار زیاد، ایجاد هیپرتروفی است که در تحقیق حاضر، افزایش نسبت وزن قلب به وزن نهایی بدن حیوان، به عنوان شاخص هیپرتروفی در نظر گرفته شده است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد بعد از گذشت ۲۱ روز از القای پرفشاری شریانی، قلب در گروه‌های پرفشار، به میزان ۷۶ درصد دچار هیپرتروفی می‌شود (جدول ۱) که این نتایج با نتایج مطالعات قبلی از جمله مطالعه polizo هم‌خوانی دارد (۶). تغییر در میزان برخی فاکتورهای موجود در گردش خون و بافت قلب به‌خصوص ROSها، نقش مشارکتی در این امر دارند (۲۰). نتایج به دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که آتورواستاتین، در طی ۲۱ روز نتوانست بر میزان فشار خون و شاخص هیپرتروفی قلب به صورت معنی‌داری مؤثر باشد (جدول ۱). اگرچه در بعضی مطالعات، استفاده از داروهای استاتین توانسته است میزان فشار متوسط شریانی و هیپرتروفی ناشی از آن را کاهش دهد (۹، ۱۰)، ولی در مطالعه حاضر شاید به دلیل شدت بالای پرفشاری شریانی و تحمیل بار زیاد به قلب به‌طور مستقیم از طریق بالارفتن مقاومت آئورت شکمی و غیر مستقیم از طریق فعال‌شدن سیستم رنین–آنژیوتانسین محیطی، آتوروآستاتین نتوانسته است این اثرات را اعمال

نماید.

در نتایج به دست‌آمده از مطالعه حاضر، رابطه مستقیمی بین تغییرات فشار خون و هیپرتروفی قلب با میزان تغییرات آنزیم‌های درگیر در فرآیند تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و بروز استرس اکسیداتیو وجود داشت؛ چرا که در میزان فعالیت آنزیم‌های درگیر در فرآیند استرس اکسیداتیو از جمله کاتالاز و SOD (نمودار ۱ و ۲) و همچنین غلظت گلوتاتیون و MDA (نمودار ۳ و ۴) در پاسخ به پرفشاری شریانی، افزایش معنی‌داری وجود داشت. افزایش تولید ROSها (آنیون‌های سوپراکسید و هیدروکسیل) در برخی شرایط پاتولوژیک مثل پرفشاری شریانی، بسیاری از اعمال قلبی مانند: جریان‌های یونی، ساختار و عملکرد پروتئین‌ها، بیان ژن و مسیرهای سیگنالی بسیاری از فاکتورهای رشد را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۸). تحت شرایط فیزیولوژیک، اثرات سمی این رادیکال‌ها توسط آنزیم‌هایی چون: SOD، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز خنثی می‌شود (۱، ۲۰)؛ بر این اساس افزایش میزان تولید ROSها در برخی از شرایط پاتولوژیک، با تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ارتباط است (۲). در مطالعه حاضر، میزان فعالیت آنزیم SOD و کاتالاز بطن چپ در گروه پرفشار شریانی، کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت (نمودار ۱ و ۲). کاهش فعالیت این دو آنزیم منجر به افزایش تولید آنیون سوپراکسید شده و سبب بروز استرس اکسیداتیو می‌شود (۶). شواهد بسیار قوی وجود دارد که آنژیوتانسین-II را به عنوان فاکتور اصلی و مهم در بروز پرفشاری شریانی و هیپرتروفی قلب مطرح نموده‌اند که یکی از مسیرهای سیگنالی آن به واسطه فعال‌کردن ROSها می‌باشد (۲۱)؛ از طرفی چون آنزیم کاتالاز نقش مهمی در تبدیل هیدروژن پراکسید به آب دارد، کاهش فعالیت این آنزیم همانند SOD، احتمالاً در مطالعه حاضر سبب تجمع یون هیدروژن‌پراکسید و ایجاد استرس اکسیداتیو در حیوانات پرفشار شریانی شده است.

تغییر در مقدار گلوتاتیون، یکی دیگر از شاخص‌های استرس اکسیداتیو است که در تحقیق حاضر، میزان غلظت آن کاهش معنی‌داری در گروه پرفشار شریانی داشته است (نمودار ۳). از آنجا که گلوتاتیون به عنوان جمع‌آوری‌کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند (۶)، بنابراین کاهش غلظت آن، باعث تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده و منجر به بروز استرس اکسیداتیو در بافت قلب می‌شود. در مطالعه حاضر همچنین میزان MDA (شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها) عضله بطن چپ در گروه پرفشار شریانی، افزایش معنی‌داری داشت (نمودار ۴). در هنگام بروز استرس اکسیداتیو معمولاً میزان MDA افزایش پیدا می‌کند که نشان‌دهنده وجود القای استرس اکسیداتیو و میزان پراکسیداسیون لیپیدها است (۲۲). به هر حال کاهش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم SOD، کاتالاز و غلظت گلوتاتیون و همچنین افزایش میزان MDA بطن چپ در گروه پرفشار شریانی، دلیلی قاطع بر بروز پدیده استرس اکسیداتیو در عضله میوکارد حیوانات پرفشار می‌باشد.

استفاده از داروهای مهارکننده ROSها در طی دهه اخیر، توجه بسیاری از محققین را به خود جلب نموده است. استاتین‌ها یکی از این موارد بوده که نقش مهارکننده استرس اکسیداتیو آن در برخی شرایط پاتولوژیک، زمینه مطالعات گسترده را در حال حاضر به وجود آورده است (۲۳). کاربرد بالینی داروی آتورواستاتین، به واسطه کاهش کلسترول خون از طریق مهار آنزیم HMG Co-A ردوکتاز کبدی می‌باشد. در مطالعه حاضر، اثرات مفید این دارو مستقل از اثرات کاهندگی کلسترول خون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درمان با آتورواستاتین، در بین پارامترهای استرس اکسیداتیو فقط توانست از کاهش معنی‌دار آنزیم کاتالاز جلوگیری به عمل آورد (نمودار ۲). به نظر می‌رسد برای عملکرد کامل این دارو در جهت مهار استرس اکسیداتیو در مطالعه حاضر، به زمان بیشتری نیاز بود. با این حال در یک مطالعه استفاده از آتورواستاتین در سایر اختلالات پاتولوژیک، همانند بیماری‌های عروق کرونر قلبی توانست به

طور قوی‌تری جلوی استرس اکسیداتیو ایجادشده را حتی قوی‌تر از سایر استاتین‌ها مهار نماید (۲۴)؛ همچنین در مطالعه دیگری، آتورواستاتین توانست از طریق مهار فرآیند التهاب و استرس اکسیداتیو، باعث بهبود عملکرد قلب نارسا شود (۲۵). بر اساس مطالعات ذکرشده و نتایج مطالعه حاضر، می‌توان گفت که آتورواستاتین می‌تواند از طریق مهار فرآیند استرس اکسیداتیو، از آسیب‌های ایجادشده به واسطه رادیکال‌های آزاد در طی پرفشاری شریانی جلوگیری به عمل آورد.

به طور خلاصه نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، القای پرفشاری شریانی به واسطه تنگی آئورت شکمی در بالای شریان‌های کلّیه از طریق افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، سبب به وجودآمدن استرس اکسیداتیو در عضله قلبی و هیپرتروفی میوکارد می‌شود؛ همچنین نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که داروی آتورواستاتین، این توانایی را دارد که از تغییرات آنزیم‌ها و فاکتورهای درگیر در فرآیند به وجودآمدن استرس اکسیداتیو در حین پرفشاری شریانی، جلوگیری نماید. القای پرفشاری شریانی به روش کوآرکتاسیون آئورت شکمی، دارای مزایا و معایبی است. از جمله مزایای این تکنیک، بروز سریع و حاد پرفشاری شریانی است که تنها با یک جراحی انجام می‌شود؛ همچنین این پرفشاری منجر به هیپرتروفی سریع قلب می‌شود. از معایب آن نیز می‌توان به جراحی دشوار این تکنیک و خطر ایجاد عفونت اشاره کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد پرفشاری شریانی، منجر به استرس اکسیداتیو و هیپرتروفی در عضله میوکارد موش صحرایی می‌شود و درمان با آتورواستاتین ممکن است از استرس اکسیداتیو ناشی از پرفشاری در بافت قلب جلوگیری نماید.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... بابت تأمین هزینه‌های مالی این تحقیق و گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی این دانشگاه برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی این طرح، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع:

1- Scandalios JG. The rise of ROS. Trends Biochem Sci. 2002; 27 (9): 483-6.

2- Sindhu RK, Roberts CK, Ehdaie A, Zhan CD, Vaziri ND. Effects of aortic coarctation on aortic antioxidant enzymes and NADPH oxidase protein expression. Life Sci. 2005; 76 (8): 945-53.

3- Jacob MH, Pontes MR, Araujo AS, Barp J, Irigoyen MC, Llesuy SF, et al. Aortic-banding induces myocardial oxidative stress and changes in concentration and activity of antioxidants in male Wistar rats. Life Sci. 2006; 79 (23): 2187-93.

4- Mozaffari MS, Schaffer SW. Effect of hypertension and hypertension-glucose intolerance on myocardial ischemic injury. Hypertension. 2003; 42 (5): 1042-9.

5- Singal PK, Khaper N, Belló-Klein A, Bhayana M. Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure. Heart Fail Rev 4. 1999; 4: 353-60.

6- Polizio AH, Gorzalczany S, Taira C, Pena C. Aortic coarctation induces oxidative stress in rat tissues. Life Sci. 2006; 79 (6): 596-600.

7- Ungvari Z, Csiszar A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A. Chronic high pressure-induced arterial oxidative stress: involvement of protein kinase C-dependent NAD(P)H oxidase and local renin-angiotensin system. Am J Pathol. 2004; 165(1): 219-26.

8- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure. Circ J. 2008; 72 (A): A31-7.

9- Arboix A, Garcia-Eroles L, Oliveres M, Targa C, Balcells M, Massons J. Pretreatment with statins improves early outcome in patients with first-ever ischaemic stroke: a pleiotropic effect of statins or a beneficial effect of hypercholesterolemia? BMC Neurol. 2010; 10: 47.

10- Lefer DJ, Scalia R, Jones SP, Sharp BR, Hoffmeyer MR, Farvid AR, et al. HMG-CoA reductase inhibition protects the diabetic myocardium from ischemia-reperfusion injury. FASEB J. 2001; 15 (8): 1454-6.

11- Yagi S, Akaike M, Aihara K, Iwase T, Ishikawa K, Yoshida S, Sumitomo-Ueda Y, et al. Effect of low-dose (1 mg/day) pitavastatin on left ventricular diastolic function and albuminuria in patients with hyperlipidemia. Am J Cardiol. 2011; 107 (11): 1644-9.

12- Inamoto S, Yoshioka T, Yamashita C, Miyamura M, Mori T, Ukimura A, Matsumoto C, Matsumura Y, et al, Pitavastatin reduces oxidative stress and attenuates intermittent hypoxia-induced left ventricular remodeling in lean mice. Hypertens Res. 2010; 33 (6): 579-86.

13- Fonseca FA, Franca CN, Povoa RM, Izar MC. Statins and stroke: potential mechanisms for neurovascular protection. Rev Neurol. 2010; 51(9): 551-60.

14- Mohammadi MT, Shid Moosavi SM, Dehghani GA. Contribution of nitric oxide synthase (NOS) activity in blood-brain barrier disruption and edema after acute ischemia/reperfusion in aortic coarctation-induced hypertensive rats. Iran Biomed J. 2011; 15 (1-2): 22-30.

15- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J Lab Clin Med. 1975; 85 (2): 337-41.

16- Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984; 105: 121-6.

17- Tietz F. Enzymic method for quantitatve determination of nanogram amount of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Anal Biochem. 1969; 27 (3): 502-22.

18- Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin Chim Acta. 1978; 90 (1): 37-43.

19- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-54.

20- Tsutsui H, Kinugawa S, and Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. Cardiovasc Res. 2009; 81 (3): 449-56.

21- Reckelhoff JF, Romero JC. Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003; 284 (4): R893-912.

22- Gupta M, Singal PK. Higher antioxidative capacity during a chronic stable heart hypertrophy. Circ Res. 1989; 64 (2): 398-406.

23- Murrow JR, Sher S, Ali S, Uphoff I, Patel R, Porkert M, et al. The differential effect of statins on oxidative stress and endothelial function: atorvastatin versus pravastatin. J Clin Lipidol. 2012; 6 (1): 42-9.

24- Li J, Sun YM, Wang LF, Li ZQ, Pan W, Cao HY. Comparison of effects of simvastatin versus atorvastatin on oxidative stress in patients with coronary heart disease. Clin Cardiol. 2010; 33 (4): 222-7.

25- Castro PF, Miranda R, Verdejo HE, Greig D, Gabrielli LA, Alcaino H, et al. Pleiotropic effects of atorvastatin in heart failure: role in oxidative stress, inflammation, endothelial function, and exercise capacity. J Heart Lung Transplant. 2008; 27 (4): 435-41.

Original Article *Abstract*

Protective effects of atorvastatin on myocardium in hypertensive rats

Mohammad Taghi Mohammadi[1], Zahra Jahanbakhsh[2], Reza Amini[3], Shahnaz Shekarfroush[4], Behzad Mesbahzadeh[5]

Background and Aim: Previous studies have shown that arterial hypertension induces cardiac hypertrophy and myocardial oxidative stress. The aim of the present study was to assess the effects of treatment by atorvastatin, as an antioxidant, to prevent myocardial oxidative stress and cardiac hypertrophy in hypertensive rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 20 male Wistar rats were randomly divided into four equal groups, including sham, sham treated, hypertensive, and hypertensive treated. The rats were made acutely hypertensive by aortic constriction above the renal arteries. After 21 days, the carotid artery pressure of the subjects was recorded and, under anaesthesia their hearts were removed and weighed. Then, the left atrium of each was excised. After tissue homogenation, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, as well as glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels of myocardium were determined through biochemical methods.

Results: In the hypertensive groups, mean arterial hypertension and cardiac hypertrophy (heart weight/body weight, g/kg) increased70% and 76%, respectively. Aortic constriction significantly increased arterial pressure and cardiac hypertrophy index respectively SOD and CAT activities were significantly lower than in the sham animals ,$P<0.05$.Besides, arterial hypertension decreased GSH content of myocardium by 59% ,but it increased MDA level by 62%. Finally, it was found that atorvastatin treatment only prevented from the reduction of CAT activity.

Conclusion: Arterial hypertension induces cardiac hypertrophy concomitant with oxidative stress in rat myocardium. Treatment with atorvastatin can prevent hypertension-induced oxidative stress.

Key Words: Atorvastatin, Arterial hypertension, Oxidative stress, hypertrophy Hypertrophy

Journal of Birjand University of Medical Sciences (supplementary: cardiovascular). 2013; 19 (6): 50-60

Received: September 19, 2012 ***Accepted: December 18, 2012***

[1]*Corresponding Author, Assistant Professor, Department Of Physiology And Biophysics, Faculty Of Medicine, Baqiyatallah University Of Medical Sciences, Tehran, Iran Mohammadi.mohammadt@yahoo.com*
[2] *PhD student, Department of Physiology and biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*
[3] *M .Sc, Department of Physiology and biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*
[4] *Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Arsanjan Branch, Fars, Iran.*
[5] *Atherosclerosis and Coronary Artery Research Centre, PhD in Physiology , Department of Physiology and Pharmacology, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.*