مقاله اصیل پژوهشی

تأثیر آتورواستاتین بر پاسخ استرس اکسیداتیو مغز و آسیب نورونی ناشی از دیابت

نسترن فقیهی[1]، محمدتقی محمدی[2]، فاطمه سالم[3]

چکیده

زمینه و هدف: بر پایه یافته‌های اخیر، آتورواستاتین، بجز اثر کاهندگی کلسترول، دارای اثرات دیگری مانند: اثر ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی نیز می‌باشد. با توجه به نقش استرس‌اکسیداتیو و التهاب در ایجاد نوروپاتی دیابتی، مطالعه حاضر به‌منظور مطالعه تأثیر حفاظت نورونی و ضدّ استرس اکسیداتیو آتورواستاتین در بافت مغز حیوان دیابتی انجام گرفت.

روش تحقیق: در این مطالعه مداخله‌ای-تجربی، موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار، به‌صورت تصادفی، به چهار گروه (6تایی) شامل: نرمال، نرمال‌درمان، دیابتی و دیابتی‌درمان تقسیم شدند. موش‌های صحرایی، با تزریق داخل وریدی استرپتوزوتوسین (40mg/kg)، دیابتی شده و حیوانات درمان‌شونده، 8 هفته آتورواستاتین با دوز 40mg/kg/day دریافت کردند. در پایان آزمایش، نمونه خونی برای اندازه‌گیری گلوکز و اوره جمع‌آوری گردید. در نهایت، حیوان پس از بیهوشی عمیق، کشته شده و مغز حیوان برای اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و مطالعه بافت‌شناسی برداشته شد.

یافته‌ها: میزان اوره (130±10mg/dl) به‌طور معنی‌داری در حیوانات دیابتی (گلوکز خون >450mg/dl) در مقایسه با حیوانات نرمال (58±7mg/dl) افزایش داشت($P<0/05$)؛ همچنین دیابت، موجب افزایش MDA مغز حیوانات دیابتی (mol/mg proteinμ3/07±8/78) به همراه آسیب‌های بافتی گردید. آتورواستاتین به‌طور معنی‌داری اوره حیوانات دیابتی (0/2±0/7mg/dl) را در مقایسه با گروه نرمال کاهش داد. میزان MDA مغز، به‌طور معنی‌داری در گروه دیابتی درمان‌شده با آتورواستاتین کاهش یافت (0/31±0/92μmol/mg protein)، ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که آتورواستاتین، از ایجاد نوروپاتی ناشی از هیپرگلیسمی جلوگیری کرده و بروز استرس اکسیداتیو مغز در حین دیابت را مهار می‌نماید. به‌نظر می‌رسد، افزایش اوره خون، یکی دیگر از عوامل آسیب مغز می‌باشد که آتورواستاتین به‌واسطه کاهش آن، از ایجاد نوروپاتی جلوگیری می‌کند.

واژه‌های کلیدی: نوروپاتی دیابتی؛ آتورواستاتین؛ هیپرگلیسمی؛ اورمی؛ استرس اکسیداتیو

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1394؛ 22 (1): 48-58.

دریافت: 1393/11/11 پذیرش: **1394/01/22**

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛

[2] نویسنده مسؤول؛ دانشیار، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران؛
آدرس: تهران، اقدسیه، میدان ارتش، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، دانشکده پزشکی
تلفن: 09127713583 نمابر: 021-26127257 پست الکترونیکی: Mohammadi.mohammadt@yahoo.com، Mohammadi.mohammad.t@gmail.com

[3] کارشناس آزمایشگاه، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران.

مقدمه

دیابت شیرین، یکی از بیماری‌های غدد درون‌ریز بدن است که سبب اختلال در متابولیسم مواد سه‌گانه به‌ویژه کربوهیدرات و چربی می‌شود. این بیماری، از شیوع بالایی برخوردار می‌باشد و در حدود 370میلیون انسان در سراسر دنیا از این بیماری رنج می‌برند و پیش‌بینی شده است تا سال 2030، تعداد مبتلایان به این بیماری به 552 میلیون نفر خواهد رسید (1). افزایش قند خون، مشخصه اصلی این بیماری بوده و در طولانی‌مدت سبب آسیب به بافت‌های مختلف بدن می‌شود؛ از جمله این آسیب‌ها می‌توان به نفروپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی و آسیب‌های عروقی اشاره کرد (2، 3). از مهترین عوارض ناشی از دیابت شیرین، نوروپاتی دیابتی است که این آسیب، هم در سطح محیطی و هم در سیستم عصبی مرکزی روی می‌دهد. از مشخصه‌های اصلی آسیب‌های عصبی در حین دیابت، اختلال در عملکردهای شناختی، صدمه به حافظه و کاهش یادگیری است. یافته‌های اخیر در حیوانات آزمایشگاهی و دیابت نوع اول نشان می‌دهد که هیپرگلیسمی، منجر به اختلال در حافظه و یادگیری می‌شود (4)؛ همچنین کاهش میزان آستانه درد و به‌دنبال آن تخریب فیبرهای عصبی میلین‌دار و غیرمیلین‌دار، از صدمات دیگر دیابت می‌باشد که می‌تواند باعث کاهش کیفیّت زندگی این افراد گردد (5).

مطالعات گسترده‌ای، به نقش مهم افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS[1]) و برخی از محصولات نهایی گلیکوزیله‌شده (AGE[2]) در حین هیپرگلیسمی مزمن که باعث آسیب به بافت‌های بدن می‌شوند، تأکید کرده‌اند (6، 7). با توجه به اینکه بافت مغز دارای سیستم آنتی‌اکسیدانی بسیار ضعیفی نسبت به بقیّه بافت‌های بدن است و همچنین به‌دلیل مصرف اکسیژن بالا و دارابودن اسیدهای چرب غیراشباع فراوان، بافت مغز به‌شدّت در معرض آسیب‌های اکسیداتیو قرار می‌گیرد (8). در حدود 60درصد از جمعیت مبتلایان به دیابت، آسیب‌های نورونی به‌دلیل استرس اکسیداتیو به‌وجود می‌آید و عامل استرس اکسیداتیو، عامل اصلی پیشرفت و گسترش نوروپاتی در بیماران دیابتی به‌شمار می‌رود (6). در این رابطه، قشر مغز و هیپوکامپ، بیشتر از سایر مناطق مغز دچار استرس‌اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از هیپرگلیسمی می‌شوند (9). هیپرگلیسمی، مهم‌ترین دلیل القای استرس اکسیداتیو در حین دیابت بوده و از طریق مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی، منجر به تولید بیش از حدّ رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌گردد (6). افزایش تولید انواع رادیکال‌های آزاد همچون آنیون‌سوپراکساید و به‌دنبال آن فعال‌شدن سیگنال‌های مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی، در بافت مغز باعث مرگ نورون‌ها می‌گردد (8)؛ از طرفی پراکسیداسیون لیپیدها، آسیب به مولکول DNA، آزادسازی انواع میانجی‌های عصبی تحریکی همچون گلوتامات، آزادسازی سیتوکروم-C از میتوکندری و افزایش کلسیم داخل‌سلولی، بخشی از مکانیسم‌های مخرّب رادیکال‌های آزاد در شرایط مختلف بیماری‌های تخریبی بافت مغز بوده که منجر به ایجاد آسیب در نورون‌ها و سایر تغییرات آسیب- شناختی بافت مغز می‌گردد (8، 10)؛ همچنین قسمتی از آسیب نورونی در دیابت، به‌دلیل فعال‌شدن سیستم التهابی بافت مغز و افزایش تولید سایتوکاین‌های التهابی و پیش‌التهابی صورت می‌گیرد (4). در نهایت، هیپرگلیسمی مزمن باعث ایجاد آسیب در بافت کلیه و نفروپاتی شده و به‌دنبال آن غلظت موادّ سمی در خون زیاد می‌شود که از جمله این مواد سمّی می‌توان به اوره اشاره کرد (3). افزایش اوره خون که مادّه‌ای سمّی تلقّی می‌شود، عملکرد سلول‌های عصبی مغز را به‌شدّت تحت تأثیر قرار داده و باعث اختلال در اعمال شناختی مغز می‌گردد (11).

استاتین‌ها، داروهای کاهنده کلسترول به‌واسطه مهار آنزیم 3-هیدروکسی-3متیل-گلوتاریل‌کوآنزیم‌آ (HMG-CoA) ردوکتاز هستند که به‌طور گسترده در درمان

[1] *Reactive Oxygen Species*
[2] *Advanced Glycosylation End Product*

بیماری‌های دیس‌لیپیدمی و هیپرکلسترولمی به‌کار می‌روند (12). تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که استاتین‌ها با وجود تأثیرات سودمند بر کاهش کلسترول خون، دارای برخی اثرات ضدّ استرس اکسیداتیو، ضدّ التهاب و محافظتی نورونی در برخی شرایط پاتولوژیک هستند (13، 14). مصرف این داروها در همه بیماران دچار حوادث حاد کرونری حتّی بدون بالابودن سطح لیپیدهای سرم، تأثیر مثبت در بهبودی این بیماران داشته است (15). Sever و همکاران در بررسی خود نشان داده‌اند که آتورواستاتین، از حوادث سکته مغزی در بیماران دارای فشار خون بالا با سطح کلسترولی متوسط یا حتی کمتر، جلوگیری کرده است (16)؛ همچنین در مطالعه Kilic و همکاران، در مدل ایسکمی ایجادشده به‌وسیله بستن شریان میانی مغز در موش سوری، رزوواستاتین به‌صورت داخل صفاقی با دوز 20mg/kg، توانسته است، میزان ضایعه ایجادشده ناشی از ایسکمی مغز را کاهش دهد (17). از بررسی نتایج این مطالعات می‌توان استنباط نمود که استفاده از داروهای گروه استاتین‌ها، می‌تواند در جهت کاهش عوارض هیپرگلیسمی و آسیب‌های نورونی در حین دیابت مزمن، مفید واقع گردد.

بر این اساس، مطالعه حاضر در نظر داشت تا تأثیر داروی آتورواستاتین- به‌عنوان طولانی‌اثرترین و چربی‌دوست‌ترین استاتین- با کمک ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدّ التهابی آن بر میزان استرس اکسیداتیو بافت مغز و تغییرات آسیب‌شناختی که در حین هیپرگلیسمی در بافت عصبی روی می‌دهد، در مدل تجربی دیابت نوع اول در موش صحرایی مورد مطالعه قرار دهد.

روش تحقیق

در تحقیق حاضر که یک مطالعه مداخله‌ای-تجربی بود، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (Wistar) تهیه‌شده از مرکز پژوهشی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله در محدوده وزنی 200-250 گرم استفاده شد. در تمامی آزمایش‌ها، شرایط پروتکل کار با حیوانات آزمایشگاهی تعیین‌شده توسط کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله رعایت گردید. حیوانات، بدون داشتن محدودیتی از نظر مصرف آب و غذا، در شرایط استاندارد 12ساعت روشنایی و تاریکی با درجه حرارت 2±22درجه سانتی‌گراد در طی آزمایش نگهداری شدند.

برای ایجاد دیابت قندی نوع اول، از استرپتوزوتوسین (STZ) استفاده شد. حیوانات توسط داروی ترکیبی کتامین (80mg/kg) و زایلازین (10mg/kg) بیهوش گردیدند؛ سپس به‌مقدار 40 میلی‌گرم به‌ازای یک کیلوگرم وزن بدن موش، محلول از پیش‌تهیه‌شده استرپتوزوتوسین، از راه ورید جانبی دُم تزریق شد. 5روز بعد از تزریق، حیوانات دچار علائم پرنوشی و پرادراری گردیدند (18)؛ بنابراین میزان قند ادرار حیوان توسط نوار آنزیمی مشخص شد و حیواناتی که دفع گلوکز بالا در ادرار را نشان دادند، به‌عنوان حیوان دیابتی انتخاب و وارد دوره آزمایش گردیدند. لازم به ذکر است که شروع درمان با آتورواستاتین، 5روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین و پس از حصول اطمینان از القای دیابت انجام گرفت.

برای انجام پژوهش حاضر، حیوانات مورد آزمایش، به‌صورت تصادفی در 4گروه (24سر) به این شرح قرار گرفتند: 1) گروه کنترل نرمال (N): این گروه شامل موش‌های صحرایی سالم بودند که در طول آزمایش، هیچ دارویی مصرف نکرده و تنها یک میلی‌لیتر آب مقطر روزانه به‌مدّت 2ماه از طریق گاواژ دریافت کردند؛ 2) گروه نرمال دریافت‌کننده آتورواستاتین (N+T): حیوانات این گروه همانند گروه کنترل نرمال بود، با این تفاوت که به‌مدّت 2ماه داروی آتورواستاتین را به‌مقدار 40mg/kg به‌صورت روزانه از طریق گاواژ دریافت کردند؛3) گروه کنترل دیابتی (D): دیابت نوع اول در حیوانات این گروه، با تزریق درون‌وریدی استرپتوزوتوسین القا گردید. پس از 5روز از ثابت‌شدن علایم دیابت (پرنوشی و پرادراری)، از حیوانات این گروه به‌عنوان

کنترل دیابتی استفاده شد. حیوانات این گروه در طول آزمایش، هیچ دارویی مصرف نکرده و تنها یک میلی‌لیتر آب مقطر، روزانه به‌مدّت 2ماه از طریق گاواژ دریافت کردند؛ 4) گروه دیابتی مصرف‌کننده آتورواستاتین (D+A): این گروه شامل موش‌های صحرایی نر دیابتی بودند که در طی دوره آزمایش، با داروی آتورواستاتین با دوز 40mg/kg به‌صورت روزانه از طریق گاواژ تیمار شدند.

در انتهای دوره آزمایش، قبل از قربانی‌کردن حیوانات و پس از ایجاد بیهوشی عمیق در آنها، نمونه خون برای اندازه‌گیری گلوکز و اوره خون، از قلب حیوان جمع‌آوری شد. سرم خون توسط دستگاه سانتریفیوژ با دور 3000rpm جدا گردید. از سرم‌های جداشده، پارامترهای بیوشیمیایی اوره و گلوکز سرم توسط کیت‌های شرکت پارس‌آزمون، مورد سنجش قرار گرفت.

در روز 60، تمام حیوانات، تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند و مغز آنها جدا شد و سپس نیمکره راست مغز به‌سرعت به‌داخل نیتروژن مایع و سپس فریزر 80- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. در روز آزمایش، بافت مغز منجمدشده، به‌دقّت توزین و به نسبت 1:10 در بافر فسفات‌سالین، هموژنیزه شد و پس از آن، نمونه‌ها در 14000g و 4درجه سانتی‌گراد به‌مدّت 15دقیقه سانتریفوژ شدند. از محلول رویی برای سنجش مالون‌دی‌آلدئید مورد نظر استفاده شد.

برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها، میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، از روش Satho استفاده شد (19). به 500میکرولیتر بافت هموژنه، 1/5میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) 10درصد اضافه و به‌مدّت 10دقیقه سانتریفیوژ گردید؛ سپس 1/5میلی‌لیتر از مایع رویی، برداشته و 2میلی‌لیتر اسیدتیوباربیتوریک 0/67درصد به آن اضافه شد و به‌مدت30دقیقه در بن‌ماری جوش قرار داده شد؛ سپس 2میلی‌لیتر 1-بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید، به‌مدّت 15دقیقه در 4000g سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی صورتی‌رنگ توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر (CECIL-2501, England) در طول موج 532 نانومتر قرائت شد. غلظت MDA، با استفاده از 1، 1، 3 و 3 تترا اتوکسی‌پروپان به‌عنوان استاندارد، تعیین و MDA بر حسب میکرومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. محلول استاندارد MDA در غلظت‌های 0/2-20 میکرومولار در اسیدسولفوریک 10درصد تهیه شد.

برای تعیین غلظت پروتئین، از روش برادفورد استفاده شد (20). حجم معینی از عصاره بافتی با رقّت مناسب برداشته و به حجم 1 میلی‌لیتر رسانده شد؛ سپس 2میلی‌لیتر از محلول برادفورد با رقّت 3:1 به آن اضافه شد و به‌مدّت 10دقیقه اینکوبه گردید؛ سپس در طول موج 595 نانومتر، جذب آن قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد، ابتدا محلول یک‌میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آلبومین سرم گاوی (BSA) تهیه شد؛ سپس غلظت‌های 5، 10، 20، 40، 60 و 80 میکروگرم در میلی‌لیتر از آن ساخته و به‌عنوان غلظت‌های استاندارد استفاده شد.

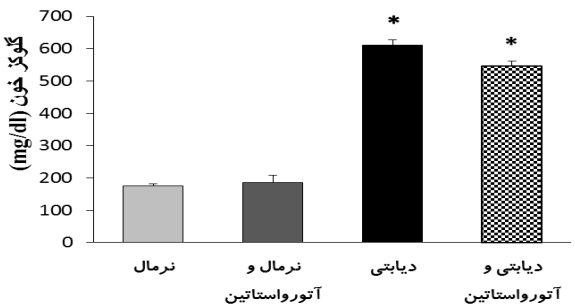
برای مطالعه میکروسکوپی، ابتدا نمونه مورد نظر (نیمکره چپ مغز) به‌مدّت دو هفته، برای تثبیت، در فرمالین 10درصد قرار گرفت و سپس بقیه مراحل به شرح زیر انجام شد. ابتدا مراحل پاساژ بافت و بعد قالب‌گیری با پارافین، طبق روش‌های معمول آماده‌سازی بافت انجام شد. بعد از آن، مرحله برش‌گیری به‌وسیله دستگاه میکروتوم با ضخامت 5میکرومتر انجام گرفت؛ سپس مقاطع تهیه‌شده، در محل مورد نظر بر روی لام انتقال داده شد و برش‌ها با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E)، رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت، برش‌های تهیّه‌شده، آب‌گیری و شفاف‌سازی شد و فرآیند مانت‌کردن انجام گردید. در آخر، لام‌های تهیّه‌شده، با دقّت و توسط دستگاه میکروسکوپ نوری (Nikon) مورد ارزیابی قرار گرفت و با استفاده از دوربین مخصوص میکروسکوپ متصل به کامپیوتر (CMEX)، از نقاط مورد نظر (نواحی قشر مغز)، تصویر تهیه شد و

شاخص‌های آسیب نورونی در نواحی مختلف مغز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج آماری به‌دست‌آمده در این تحقیق به‌صورت میانگین±خطای استاندارد میانگین (Mean±SEM) ارائه شده است. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS (ویرایش 21) استفاده گردید. با توجه به این نکته که داده‌های مورد نظر، از توزیع نرمال برخوردار بودند، از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey برای مقایسه داده‌ها استفاده شد. در تمامی موارد، اختلاف بین گروه‌ها با $P<0/05$ معنی‌دار تلقی شده است.

یافته‌ها

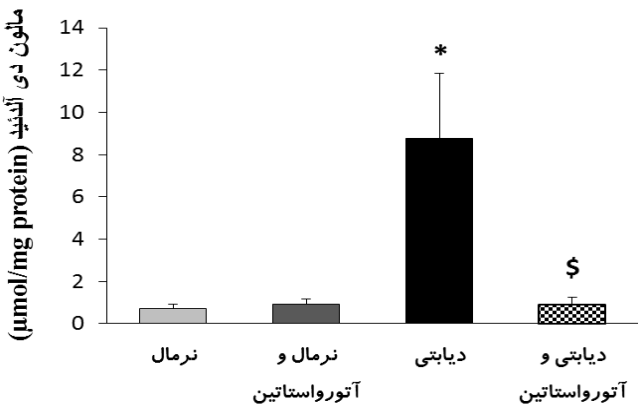
غلظت گلوکز خون در گروه‌های آزمایشی در پایان دوره آزمایش، در نمودار یک ارائه شده است. سطح گلوکز خون حیوانات گروه کنترل نرمال، در پایان آزمایش 175±6mg/dl بود. دریافت آتورواستاتین به‌مدّت 60 روز، تأثیر معنی‌داری بر میزان گلوکز خون حیوانات نرمال تیمارشده در مقایسه با حیوانات نرمال تیمارنشده نداشت؛ به‌طوری‌که غلظت گلوکز خون حیوانات نرمال دریافت‌کننده آتورواستاتین، برابر 186±22mg/dl بود. القای دیابت، گلوکز خون حیوانات دیابتی را به‌طور قابل‌ملاحظه و معنی‌داری در مقایسه با حیوانات گروه نرمال افزایش داد که میزان آن در پایان آزمایش برابر با 610±17mg/dl بود ($P<0/05$).



نمودار 1- تغییرات غلظت گلوکز خون بر حسب میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر (mg/dl) در پایان آزمایش در گروه‌های مختلف آزمایشی. داده‌ها به‌صورت Means±SEM نمایش داده شده است.* : نشانگر تفاوت معنی‌دار با $P<0/05$ در مقایسه با گروه نرمال.

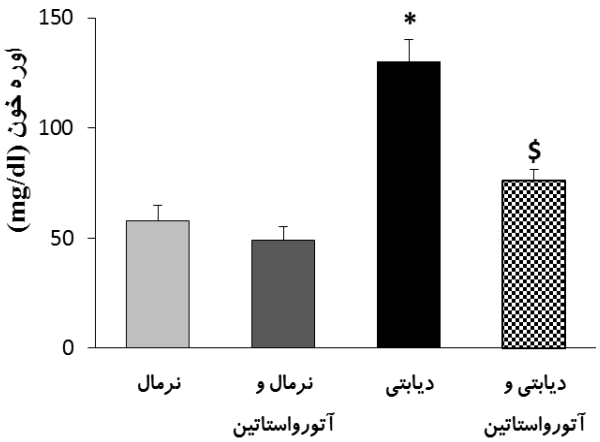
در حیوانات دیابتی دریافت‌کننده آتورواستاتین، سطح گلوکز، اندکی پایین‌تر از حیوانات دیابتی بود اما این کاهش، تغییر معنی‌داری در مقایسه با گلوکز خون حیوانات دیابتی نداشت (546±15mg/dl).

تغییرات غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) بافت مغز، به‌عنوان نشانگر پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در پایان دوره آزمایش، در نمودار 2 نشان داده شده است. سطح MDA بافت مغز حیوانات گروه نرمال، بسیار اندک و برابر با 0/71±0/20µmol/mg protein بود که درمان با آتورواستاتین، تأثیری بر میزان MDA بافت مغز در حیوانات نرمال دریافت‌کننده آتورواستاتین در مقایسه با حیوانات گروه نرمال تیمارنشده نداشت (0/92±0/24µmol/mg protein). در حیوانات دیابتی، میزان غلظت MDA بافت مغز، به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نرمال افزایش داشت که میزان آن 8/78±3/07µmol/mg protein بود ($P<0/05$). درمان با آتورواستاتین در حیوانات گروه دیابتی درمان‌شده، غلظت MDA بافت مغز را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با حیوانات کنترل دیابتی کاهش داد که میزان آن برابر با 0/92±0/31µmol/mg protein بود ($P<0/05$).



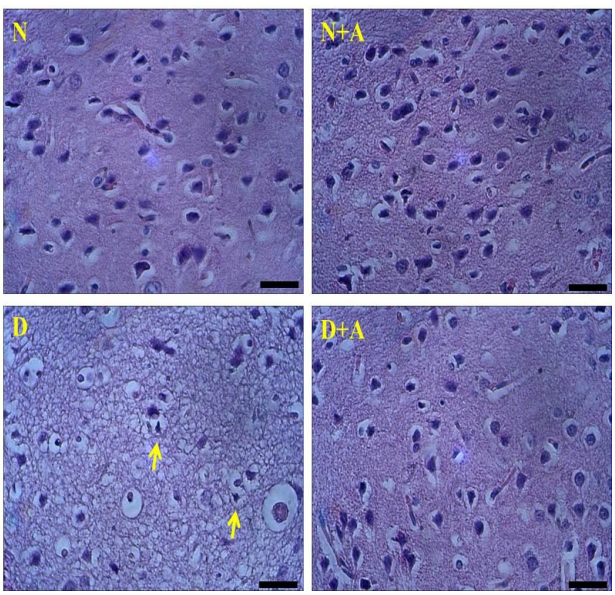
نمودار 2- تغییرات غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) بافت مغز (µmol/mg protein) در پایان آزمایش در گروه‌های مختلف آزمایشی. داده‌ها به‌صورت Means±SEM نمایش داده شده است.*: نشانگر تفاوت معنی‌دار با $P<0/05$ در مقایسه با گروه نرمال. $: نشانگر تفاوت معنی‌دار با $P<0/05$ در مقایسه با گروه دیابتی.

نمودار 3، تغییرات غلظت اوره خون در پایان آزمایش در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. در حیوانات گروه نرمال، میزان اوره خون 58±7mg/dl بود و مصرف آتورواستاتین در طول آزمایش، تأثیری بر اوره حیوانات سالم درمان‌شده در مقایسه با حیوانات گروه نرمال درمان‌نشده نداشت؛ به‌طوری‌که میزان آن در حیوانات گروه نرمال تحت درمان با آتورواستاتین 49±6mg/dl بود. غلظت اوره خون در حیوانات گروه دیابتی، در طی دیابت، به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه نرمال افزایش پیدا کرد و میزان آن 130±10mg/dl بود (P<0/05). درمان با داروی آتورواستاتین به‌مدّت 60روز در طی دیابت توانست میزان اوره خون حیوانات دیابتی تحت درمان را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دیابتی کاهش دهد (76±5mg/dl)(P<0/05).



نمودار 3- تغییرات غلظت اوره خون بر حسب میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر خون (mg/dl) در پایان آزمایش در گروه‌های مختلف آزمایشی. داده‌ها به‌صورت Means±SEM نمایش داده شده است.*: نشانگر تفاوت معنی‌دار با P<0/05 در مقایسه با گروه نرمال. $: نشانگر تفاوت معنی‌دار با P<0/05 در مقایسه با گروه دیابتی.

شکل یک، بخش‌هایی از قشر مغز را در گروه‌های آزمایشی نشان می‌دهد که با استفاده از هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شده است. نورون‌ها و سایر سلول‌های این ناحیه به‌همراه بافت عصبی آن، در گروه نرمال و نرمال دریافت‌کننده آتورواستاتین، سالم و طبیعی هستند (N و N+A). این سلول‌ها، بافتی منسجم با نظم خاصی را تشکیل داده‌اند که در بافت پارانشیم مغز (نوروپیل) قرار گرفته‌اند. بررسی مقاطع تهیه‌شده حیوانات گروه دیابتی نشان می‌دهد که در مقایسه با گروه نرمال، تخریب نورونی به‌همراه واکئولیزه‌شدن بافت عصبی در ناحیه قشر به‌مقدار زیادی صورت گرفته است و چروکیدگی و متراکم‌بودن هسته‌ها، نشان‌دهنده نورون‌های پیکنوتیک و نکروزشده می‌باشند (D)؛ در صورتی که در حیوانات تیمارشده، دریافت آتورواستاتین در طی آزمایش، از آسیب‌های نام‌برده جلوگیری کرده است، به‌طوری‌که وضعیت نورون‌ها و بافت عصبی همانند: حیوانات گروه نرمال، طبیعی به‌نظر می‌رسند (D+A).



شکل 1- تصویر میکروسکوپ نوری تهیه‌شده از مقاطع عرضی ناحیه قشر مغز در پایان آزمایش با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E). در تصویر به‌دست‌آمده از حیوانات گروه نرمال (N) و نرمال دریافت‌کننده آتورواستاتین (N+A)، نورون‌ها و بافت عصبی سالم دیده می شود؛ در حالی که در گروه دیابتی (D)، نورون‌های آسیب‌دیده با هسته‌های متراکم و چروکیده (نورون‌های پیکنوته و نکروتیک) به‌همراه واکئولیزه‌شدن بافت عصبی، به‌وضوح مشاهده می‌شود. میزان این آسیب، در گروه دیابتی درمان‌شده (D+A) به‌میزان زیادی کاهش یافته است (Scale bars=100µm، 400X).

بحث

هیپرگلیسمی، آغازگر و فعّال‌کننده سیگنال‌هایی است که

در پاتوژنز بیماری دیابت قندی کنترل‌نشده، نقش اساسی داشته و باعث ایجاد آسیب‌های شدید در بافت‌های مختلف بدن به‌خصوص سیستم عصبی می‌شود (3، 9). با توجه به این واقعیّت که بافت عصبی، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ضعیفی داشته، بروز القای استرس اکسیداتیو و سایر پارامترهای تغییریافته در طی هیپرگلیسمی ناشی از دیابت همچون افزایش اوره، می‌تواند سبب آسیب به نورون‌ها و بافت عصبی گردد (4، 21). بر این اساس، در مطالعه حاضر برای القای نوروپاتی دیابتی، از مدل آزمایشگاهی دیابت نوع اول با قند خون بالای 500mg/dl استفاده گردید (نمودار 1). به‌دنبال هیپرگلیسمی ایجادشده، تغییرات آسیب‌شناختی گسترده همراه با افزایش MDA بافت مغز- نشانگر پراکسیداسیون لیپیدها- صورت گرفت (نمودار 2 و شکل 1)؛ همچنین افزایش اوره پلاسما به‌دلیل آسیب به بافت کلّیه، در طی هیپرگلیسمی ایجاد شد (نمودار 3). در مقابل، استفاده از داروی آتورواستاتین، از افزایش پراکسیداسیون لیپیدها به‌مقدار زیادی جلوگیری به‌عمل آورد و از بروز آسیب‌های بافت شناسی به‌مقدار زیادی جلوگیری کرد (شکل 1 و نمودار 3). این یافته‌ها به خوبی نشان می‌دهند که درمان با آتورواستاتین قادر است از ایجاد و پیشرفت نوروپاتی در شرایط هیپرگلیسمی کنترل‌نشده جلوگیری نماید.

در تحقیق حاضر، تزریق داخل وریدی استرپتوزوتوسین، باعث تخریب درصد زیادی از سلول‌های بتای پانکراس شده و با کم‌کردن تولید انسولین به‌همراه کاهش سطح پلاسمایی آن، سبب افزایش قند خون شده است؛ از سوی دیگر درمان با داروی آتورواستاتین در تحقیق حاضر نتوانست بر میزان گلوکز خون حیوانات دیابتی، تأثیر معنی‌داری داشته باشد (نمودار 1). بر اساس نتایج تحقیق قبلی ما، آتورواستاتین بر میزان گلوکز خون حیوانات دیابتی بی‌تأثیر است (22). هر چند در بررسی نتایج مطالعات انجام‌شده در این زمینه، تناقض‌های هم مشاهده می‌شود، ولی اکثر محققین بر این عقیده استوارند که داروی آتورواستاتین و سایر استاتین‌ها، بر گلوکز خون بی‌تأثیرند و یا حتی در موارد اندک برخی محقّقین اعتقاد دارند که این داروها باعث تشدید دیابت هم می‌شوند (13).

بیماری نوروپاتی دیابتی، یک عارضه مهم در بیماری دیابت نوع 1 و 2 محسوب می‌شود. در طی این عارضه، قسمت‌های مختلف مغز از جمله: تالاموس، هیپوتالاموس، هیپوکامپ و مخچه، دچار آسیب شده و به‌طور ملموسی اختلالات شناختی به‌همراه آسیب بر حافظه و یادگیری به‌وجود می‌آید (9)؛ همچنین بر اساس نتایج یافته‌های محققین، سنتز و آزادسازی بسیاری از میانجی‌های عصبی ازجمله: نوراپینفرین و سروتونین در برخی از قسمت‌های مغز، به‌طور ملموسی کاهش می‌یابد (4، 9). مهم‌ترین عامل آسیب به بافت عصبی و نورون‌ها، افزایش گلیکوزیله‌شدن پروتئین‌ها و لیپیدهای مغز می‌باشد (23). همچنین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌همراه متابولیسم غیر طبیعی نورون‌ها در حین هیپرگلیسمی، باعث اختلال در عملکرد صحیح نورون‌ها می‌شود (6). در مطالعه حاضر، هیپرگلیسمی مزمن توانست میزان پراکسیداسیون لیپیدی یا MDA را که حاصل افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد، به‌مقداری زیادی افزایش دهد (نمودار 2). از آنجایی که بافت مغز دارای سیستم آنتی‌اکسیدانی بسیار ضعیفی است و میزان مصرف اکسیژن و اسیدهای چرب غیر اشباع این بافت در مقایسه با سایر بافت‌ها بالا است، سیستم عصبی به‌شدّت در معرض آسیب‌های اکسیداتیو قرار می‌گیرد (8). در نهایت، افزایش رادیکال‌های آزاد منجر به تحریک مرگ برنامه‌ریزی‌شده نورونی و فعال‌شدن سیستم التهاب در بافت مغز شده و از رشد نورون‌ها جلوگیری می‌کند (6) که شدت آسیب ایجادشده، در نتایج آسیب‌شناختی مطالعه حاضر مشهود است (شکل 1). یکی دیگر از عواملی که می‌تواند باعث آسیب به بافت مغز گردد، افزایش اوره خون است که در حین دیابت به‌مقدار زیادی افزایش پیدا می‌کند (21). این تغییر (افزایش اوره خون)، در مطالعه ما نیز به‌خوبی بروز کرد (نمودار 3) که علت آن آسیب به بافت کلیه و کاهش فیلتراسیون گلومرولی است که در حین

هیپرگلیسمی کنترل‌نشده روی می‌دهد (3). اوره یکی از مهلک‌ترین و خطرناک‌ترین سموم در خون بوده و در صورت افزایش غلظت آن در خون، باعث سمیّت در بافت عصبی و اختلال در عملکرد نورون‌ها می‌شود (21). افزایش بیش از حد اوره، در موارد شدیدتر می‌تواند منجر به تشنّج و کما و در برخی شرایط، باعث آسیب به بافت کلیه گردد (11).

مطالعات گسترده‌ای، به نقش مهم افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، محصولات نهایی گلیکوزیله‌شده و التهاب در حین هیپرگلیسمی مزمن که باعث آسیب به بافت عصبی و نورون‌ها می‌شوند، تأکید کرده‌اند (9، 23). از آنجایی که طبق یافته‌های مطالعات اخیر، آتورواستاتین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی و ضدّ التهاب در سیستم‌های بیولوژیک بدن عمل می‌نماید (14، 24)، شاید بتوان با استفاده از آتورواستاتین، میزان رادیکال‌های آزاد و تشکیل التهاب در سیستم عصبی را مهار کرد. در مطالعه حاضر، درمان با آتورواستاتین در طی دیابت توانست از شدّت آسیب به نورون‌ها و تخریب بافت عصبی، به‌مقدار گسترده‌ای جلوگیری نماید (شکل 1). در راستای این نتایج، آتورواستاتین به‌میزان زیادی سطح MDA بافت مغز (به‌عنوان نشانگر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدها) را که در حیوانات دیابتی به‌دلیل هیپرگلیسمی مزمن و شدید، افزایش یافته بود، کاهش داد (نمودار 2). به نظر می‌رسد در مطالعه حاضر، آتورواستاتین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت عصبی، توانسته است سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدهای مغز را کاهش داده و از تغییرات آسیب‌شناختی مغز جلوگیری نماید؛ چرا که در مطالعه حاضر، آتورواستاتین بر گلوکز خون مؤثّر نبوده است. این تأثیرات آتورواستاتین، در برخی از مطالعات در بافت‌هایی مثل: پانکراس و قلب به اثبات رسیده است (22، 25)؛ از طرفی شواهد بسیار قوی وجود دارد که داروی آتورواستاتین به‌عنوان یک عامل ضدّ التهاب عمل کرده و از فعال‌شدن و نفوذ ماکروفاژها به بافت مغز جلوگیری می‌کند و سبب مهار سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های پیش‌التهابی می‌شود (26). در نهایت طبق نتایج مطالعات، آتورواستاتین از طریق افزایش نیتریک‌اکساید اندوتلیالی، باعث بهبود عملکرد عروق مغز می‌شود (27)؛ از طرفی در مطالعه حاضر، تیمار با آتورواستاتین توانست میزان اوره پلاسما را به مقدار زیادی کاهش دهد (نمودار 3). همان‌طور که نتایج مطالعات نشان می‌دهند، اوره یک ماده سمّی و خطرناک برای بافت عصبی می‌باشد و در صورت افزایش مقدار خونی آن، آسیب به نورون‌ها، با کاهش سرعت هدایت ایمپالس‌های عصبی و نقص در سیستم‌های حسی و حرکتی ظاهر می‌گردد (11، 21). به هر حال، آنچه نتایج تحقیق ما نشان می‌دهد، این است که کاهش میزان اوره خون در طی درمان با داروی آتورواستاتین در طی هیپرگلیسمی، روش دیگری است که این دارو می‌تواند از آسیب به بافت مغز جلوگیری نماید.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که آتورواستاتین قادر است از آسیب نورونی، تخریب بافت عصبی و در نهایت نوروپاتی دیابتی در طی هیپرگلیسمی کنترل‌نشده جلوگیری کرده و با کاهش میزان رادیکال‌های آزاد، بروز استرس اکسیداتیو بافت مغز را مهار نماید. به‌نظر می‌رسد، افزایش اوره خون، یکی دیگر از عوامل آسیب مغز در طی دیابت قندی کنترل نشده بوده که آتورواستاتین به‌واسطه کاهش آن، از ایجاد نوروپاتی و آسیب به نورون‌ها جلوگیری کرده است.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله که مقدّمات و وسایل مورد نیاز این تحقیق را فراهم نموده‌اند، قدردانی می‌شود؛ همچنین از کارشناس‌گروه مربوطه، خانم کفایت بغلانی که در انجام پروژه حاضر ما را یاری کردند، صمیمانه تشکر می‌گردد.

منابع:

1- Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. Lancet. 2011; 378(9785): 31-40.

2- Luitse MJ, Biessels GJ, Rutten GE, Kappelle LJ. Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. Lancet Neurol. 2012; 11(3): 261-71.

3- Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. Clin Sci (Lond). 2013; 124(3): 139-52.

4- Zenker J, Ziegler D, Chrast R. Novel pathogenic pathways in diabetic neuropathy. Trends Neurosci. 2013; 36(8): 439-49.

5- Arnold R, Kwai NVC, Krishnan AV. Mechanisms of axonal dysfunction in diabetic and uraemic neuropathies. Clin Neurophysiol. 2013; 124(11): 2079-90.

6- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol. 2003; 17(1): 24-38.

7- Yamagishi S, Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. Oxid Med Cell Longev. 2010; 3(2): 101-8.

8- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007; 39(1): 44-84.

9- Sytze Van Dam P, Cotter MA, Bravenboer B, Cameron NE. Pathogenesis of diabetic neuropathy: focus on neurovascular mechanisms. Eur J Pharmacol. 2013; 719(1-3): 180-6.

10- Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. Oxid Med Cell Longev. 2012; 2012: 428010.

11- Said G. Uremic neuropathy. Handb Clin Neurol. 2013;115:607-12.

12- 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.

13- Koh KK, Sakuma I, Quon MJ. Differential metabolic effects of distinct statins. Atherosclerosis. 2011; 215(1): 1-8.

14- Mohammadi MT, Amini R, Jahanbakhsh Z, Shekarforoush S. Effects of atorvastatin on the hypertension-induced oxidative stress in the rat brain. Iran Biomed J. 2013;17(3):152-7.

15- Scandinavian Simvastatin survival study group. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with heart disease: the Scandinavian Simvastatin study (4S). Lancet. 1994; 344(8934): 1383-9.

16- Sever PS, Dahl?f B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomized controlled trial. Lancet. 2003; 361(9364): 1149-58.

17- Kilic U, Bassetti CL, Kilic E, Xing H, Wang Z, Hermann DM. Post-ischemic delivery of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor rosuvastatin protects against focal cerebral ischemia in mice via inhibition of extracellular-regulated kinase-1/-2. Neuroscience. 2005; 134(3): 901-6.

18- Mohammadi MT, Pirmoradi L, Mesbah F, Safaee A, Dehghani GA. Trophic actions of oral vanadium and improved glycemia on the pancreatic beta-cell ultrastructure of streptozotocin-induced diabetic rats. JOP. 2014; 15(6): 591-6.

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

20- 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.

21- Seifter JL, Samuels MA. Uremic encephalopathy and other brain disorders associated with renal failure. Semin Neurol. 2011; 31(2): 139-43.

22- Mohammadi MT, Ramezani Binabaj M, Mirjalali MH, Ghaedniaye Jahromi M, Jafari M, Salem F. Effect of Atorvastatin on Pancreatic Oxidative Stress in Streptozotocin-induced Diabetic Rat. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism (IJEM). 2013; 15(2): 197-204. [Persian]

23- Babizhayev MA, Strokov IA, Nosikov VV, Savel'yeva EL, Sitnikov VF, Yegorov YE, et al. The Role of Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: Generation of Free Radical Species in the Glycation Reaction and Gene Polymorphisms Encoding Antioxidant Enzymes to Genetic Susceptibility to Diabetic Neuropathy in Population of Type I Diabetic Patients. Cell Biochem Biophys [serial online] 2014, Nov 27.

24- Pathak NN, Balaganur V, Lingaraju MC, Kant V, Latief N, More AS, et al. Atorvastatin attenuates neuropathic pain in rat neuropathy model by down-regulating oxidative damage at peripheral, spinal and supraspinal levels. Neurochem Int. 2014; 68: 1-9.

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.

26- Tu Q, Cao H, Zhong W, Ding B, Tang X. Atorvastatin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through anti-inflammatory and antioxidant effects. Neural Regen Res. 2014; 9(3): 268-75.

27- Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; 20(1): 61-9.

Abstract *Original Article*

Effect of atorvastatin on hyperglycemia-induced brain oxidative stress and neuropathy induced by diabetes

Nastaran Faghihi[1], Mohammad Taghi Mohammadi[2], Fatemeh Salem[3]

Background and Aim: Based on recent studies, atorvastatin has some pleiotropic actions such as anti-inflammatory and anti-oxidant effects independent of lipid lowering effects. Regarding the critical role of oxidative stress and inflammation in inducing diabetic neuropathy, the current study aimed at examining the neuroprotective and anti-oxidative stress effects of atorvastatin atthe brain tissues in diabetes experimental models.

Materials and Methods: Twenty-four male Wistar rats were randomly divided into 4 equal groups . including normal, normal treated, diabetic and diabetic treated. The diabetic group were made diabetic by an intravenous injection of streptozotocin (40mg/kg) and the treated group received 40mg/kg/day atorvastatin for 8weeks. At the end of the experiment, blood samples from the subjects were derived to measure their blood glucose and urea. Finally, the rats were killed under deep anesthesia and their brains were removed in order to measure malondialdehyde (MDA) and to make histopathological assessment.

Results: Uncontrolled hyperglycemia (blood glucose >450 mg/dl) significantly increased blood urea in the diabetic group (130±10 mg/dl) compared with the normal group (58±7 mg/dl), ($P<0.05$). Also, hyperglycemia increased brain MDA of the diabetic group (8.78±3.07µmol/mg protein) associated with histopathological damages. Atorvastatin significantly decreased blood urea of the diabetic rats (76±5 mg/dl) accompanied by histopathological damages. Finally, the content of brain MDA significantly decreased in diabetic rats treated with atorvastatin (0.92±0.31µmol/mg protein)($P<0.05$).

Conclusion: The findings of the present study reveal that atorvastatin is able to prevent hyperglycemia-induced diabetic neuropathy and inhibit brain oxidative stress during diabetes. It is probable that reduction of urea is one of the reasons for atorvastatin prevention of hyperglycemia-induced neuropathy.

Key Words: Diabetic neuropathy; Atorvastatin; Hyperglycemia; Uremia; Oxidative stress

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2015; 21 (1): 48-58.

Received: January 31, 2015 ***Accepted: April 11, 2015***

[1] *Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran;*
[2] *Corresponding Author, Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran Mohammadi.mohammadt@yahoo.com, Mohammadi.mohammad.t@gmail.com*
[3] *Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran;*