زیست‌شناسی جانوری، سال چهاردهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۰، صفحات ۴۶- ۳۷

مقاله پژوهشی

ارزیابی اثر سیموستاتین بر فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتاز در رده سلولی اندوتلیال عروقی (HUVEC)

سیده فاطمه حسینی[۱]، طاهره ناجی[۱*]، رحیم احمدی[۲]

۱- گروه داروسازی و علوم دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه فیزیولوژی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

[*]مسئول مکاتبات: naji_t@iaups.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2021.684771

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۵

چکیده

سیموستاتین دارویی است که در کاهش سطح کلسترول کاربرد وسیعی دارد. با توجه به نقش گسترده NO در سیستم‌های بیولوژیک بدن، می‌توان از آن به عنوان یکی از اهداف درمانی در بیماری‌های مختلف استفاده کرد. هدف از این پژوهش ارزیابی اثر سیموستاتین بر فعالیت آنزیم نیتریک اکسایدستاز در رده سلولی اندوتلیال عروقی HUVEC است. به منظور بررسی اثر سیموستاتین بر رده سلولی HUVEC از روش MTT استفاده شد. اثر سیموستاتین بر بیان ژن iNOS با استفاده از تکنیک Real-time PCR بررسی شد. تاثیر سیموستاتین بر سطح نیتریک اکساید در رده سلولی آندوتلیال عروقی (HUVEC) با استفاده از رنگ‌سنجی گریس بررسی شد. بیان ژن آنزیم INOS در گروه دریافت کننده غلظت ۵۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر سیموستاتین، در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری داشت و افزایش یافت ($P\leq$ ۰/۰۵). سطح نیتریک اکساید در غلظت‌های بالاتر از ۱۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر سیموستاتین در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت. ولی در غلظت‌های پایین‌تر (۱۶، ۳۱ و ۶۲ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری مشاهده شد و افزایش یافت ($P\leq$۰/۰۵). با توجه به ارتباط سطح آنزیم نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و اثرات آن بر به ویژه بیماری‌های قلبی- عروقی، و با توجه به تاثیر سیموستاتین بر افزایش بیان ژن نیتریک اکسابد سنتاز و سطح نیتریک اکساید استفاده از داروی سیموستاتین در بیمارانی که به خاطر اختلال در فعالیت نیتریک اکساید در سطح اندوتلیوم در معرض بیماری قرار می‌گیرند ممکن است سودمند باشد.

کلمات کلیدی: سیموستاتین، آنزیم نیتریک اکسایدستاز، رده سلولی اندوتلیال عروقی.

مقدمه

اختلال عملکرد سلول‌های آندوتلیال منجر به آسیب عروقی می‌گردد اما هنوز مکانیسم‌های زمینه‌ساز آن به روشنی مشخص نیست. در تحقیقات پیشین، مکانیسم‌های درگیر در اختلال عمل اندوتلیال ناشی از بیماری‌های قلبی- عروقی اشاره شده است که در بین آنها کاهش دسترسی به نیتریک اکساید از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. کاهش دسترسی به نیتریک اکساید به افزایش غیر فعال شدن نیتریک اکساید و یا اختلال در تشکیل آن نسبت داده شده است (۲۴، ۳۳). نیتریک اکساید در ایجاد اتساع عروقی، دارای نقش

بسزایی است. در بافت‌های مختلف (بافت عصبی، عروقی و ...) توسط آنزیمی از خانواده نیتریک اکسید سنتاز تولید می‌گردد. از جایی که نیتریک اکساید عامل مهمی برای هموستاز عروق و جریان خون است، نبود نیتریک اکساید اندوتلیالی با انقباض ماهیچه‌ای عروق و تجمع پلاکتی، رشد و تکثیر سلول‌های عضلات صاف و چسبندگی لکوسیت‌ها همراه بوده که نتیجتاً منجر به اختلال عملکرد عروقی می‌گردد (۹، ۲۰، ۲۵).

همچنین طبق نتایج مطالعات، موش‌هایی که فاقد ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی بودند، مشکل فشار خون و انفارکتوس مغزی وسیع بعد از انسداد داشتند. عملکرد مختل‌کننده آنزیم نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی در بسیاری از بیماری‌های انسانی و آزمایشی از جمله پرفشاری، اترواسکلروزیس و افراد با کلسترول بالا نیز مشاهده شده است (۱۹-۱۰).

سال‌ها پیش تحقیقات منجر به ایجاد دسته‌ی جدید داروهای مهار کننده HMG-CoA شد.

این دسته‌ی دارویی که به نام استاتین‌ها شناخته شده است در درمان هایپرلیپیدمی و بیماری‌های عروق کرونری موثر واقع گردید (۸، ١٤).

مکانیسم اثر این دسته دارویی برای کاهش کلسترول عموماً در کبد با جلوگیری از تبدیل HMG-CoA به موالونات می‌باشد (۱۲، ۱۱).

این دسته دارویی همچنین باعث کاهش سطح پلاسمایی LDL می‌شود (۲۷، ٣٤).

کلینیکال ترایال‌های گسترده‌ای در عصر اخیر نشان داده است که استاتین‌ها به مقدار قابل ملاحظه‌ای هم سطح کلسترول پلاسمایی را کاهش داده‌اند و هم انفارکتوس قلبی عروقی و مغزی را (٦، ۳۰).

فرضیه‌ای وجود دارد که می‌گوید با کاهش کلسترول خون تثبیت کردن و یا کاهش آترواسکلروزیس رخ می‌دهد اما تحقیقات اخیر این باور را به چالش کشیده و می‌گوید این تاثیرات مثبت متفاوت و بی‌ارتباط با کاهش سطح کلسترول است (۱۷، ٢٦).

این اثرات مثبت ممکن است به خاطر تاثیر استاتین بر آنزیم نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی باشد. وازواسپاسم مغزی به تاخیر افتاده یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در بیماران خونریزی مغزی تحت عنکبوتیه انوریزمال است علت این وازواسپاسم می‌تواند عدم هماهنگی در انقباض و انبساط عروقی باشد. اندوتلیوم عروق با تولید نیتریک اکساید تون عضلانی عضلات صاف را تنظیم می‌کند(۳۱). تحقیقی نشان داده است که درمان با سیموستاتین قبل و بعد از خونریزی تحت عنکبوتیه در موش‌ها منجر به کاهش وازواسپاسم مغزی و مشکلات نورولوژیکی می‌شود که ممکن است بتوان مکانیسم آن را به افزایش فعالیت eNOS نسبت داد درمان با سیموستاتین گرفتگی عروق مغزی در موش‌ها بعد از SAH کاهش داده و اثرات نورولوژیکال بهتری به همراه داشته که این نتایج با افزایش سطح پروتئین نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی در عروق مغزی همراه بوده که نشان می‌دهد بیشتر شدن فعالیت نیتریک اکساید سنتاز عامل این مشاهدات مثبت است (۲۳، ۲۵).

درمان پیشگیرانه با این دسته دارویی در موش‌ها جریان خون مغزی را افزایش می‌دهد. شدت سکته مغزی را کاهش می‌دهد. فعالیت و عملکرد نورونی را نیز بهبود می‌بخشد. افزایش آنزیم نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی به وسیله مهارکننده‌های کاهنده HMG-CoA ارتباطی به نقش آن در تغییر سطح کلسترول خون ندارد. همچنین در موش‌هایی که نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی وجود ندارد اثرات محافظت نورونی و بهبود جریان خون مغزی دیده نمی‌شود این یافته‌ها نشان می‌دهد که مهمترین مکانیسم مهارکننده‌های کاهنده HMG-CoA به عنوان

عامل حفاظتی در برابر سکته مغزی با افزایش اثر نیتریک اکساید سنتاز می‌باشد (٤، ۲).

در مدل آزمایشگاهی آترواسکلروزیس در موش‌های که فاقد نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی بودند دیده شد که فشار خون و سایز ضایعات آترواسکلروزیسی افزایش یافته (۷، ۱۸، ۲٤).

یک مطالعه روی موش‌ها نشان داده است که موستاتین که یک مهارکنندهHMG-CoA reductase است سطح پروتئین و mRNA نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی را افزایش داده وسعت انفارکتوس را کاهش داده مشکلات نورولوژیکی را کمتر کرده و بالاترین تاثیر در ١٤ تا ۲۸ روز درمان دیده شده اما سطح کلسترول تنها بعد از ۲۸ روز کاهش داشته و ارتباطی با کاهش وسعت ندارد که مشخص می‌کند که درمان پیشگیرانه با موستاتین فعالیت نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی را افزایش می‌دهد (۳، ١٦).

جالب است که اخیراً مشاهداتی بر تاثیر سیمواستاتین بر افزایش پروتئین eNOS و بیان mRNA در سلول‌های اندوتلیالی وریدی وجود داشته همچنین سیموستاتین جلوی مهار رونویسی وابسته به هایپوکسی را می‌گیرد اگرچه در سیستم آزمایشگاهی سیموستاتین تمایل به افزایش فعالیت کاتالیک eNOS و mRNA و سطح پروتئین نشان داده است (۱۱، ۲۹). اما یافته‌های تحقیق حاضر مستقیماً این مشاهدات را در سلول‌های اندوتلیالی حمایت نمی‌کند.

هریوانتو و همکاران در سال ۲۰۱۹ به تأثیر سیمواستاتین بر میزان نیتریک اکسید و سطح hs-CRP در بیماران مبتلا به سیروز کبدی پرداختندو مشاهده شد که تجویز سیموستاتین سطح نیتریک اکساید سرم را افزایش داده است (۱۳).

هوانگ و همکاران در سال ۲۰۱۹ به اثرات دو تایی مهارکننده HMG-CoA ردوکتاز، سیمواستاتین، بر آنژیوژنز از طریق مسیر وابسته به سنتز نیتریک اکسید اندوتلیال پرداختند (۱۷).

بر خلاف بهبود قابل توجه در دوز بالا مشاهده شده در موش نوع وحشی، سیمواستاتین با دوز کم هیچ اثر مفیدی در بازیابی جریان خون و تشکیل عروق جدید در موش‌های کمبود eNOS نداشت. یاماک و همکاران در سال ۲۰۱۸ به تأثیر استاتین‌ها بر بیان سیتوئین ۱ و بیان اکسید نیتریک اکسید اندوتلیال در بیماران جوان با سابقه انفارکتوس میوکارد زودرس پرداختند (۳۲، ۳٤). افزایش معنی‌داری در سطح SIRT1و کاهش معنی‌داری در سطح eNOS در کلیه ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها برای هر دو SNP در بیمارانی که در مقایسه با گروه کنترل استاتین درمانی دریافت کرده بودند، مشاهده شد. باسپینار و همکاران در سال ۲۰۱٦ نیز درمان استاتین بر عملکرد کلیوی و آدرنال و سطح اکسید نیتریک در بیماران مبتلا به فشار خون بررسی نمودند. اگرچه نتایج مطالعات پیشین در سیستم آزمایشگاهی نشان داده‌اند سیموستاتین تمایل به افزایش فعالیت کاتالیک eNOS و mRNA اما مستقیماً این مشاهدات را در سلول‌های اندوتلیالی حمایت نمی‌کند (۵، ۱۵).

از این رو هدف از این پژوهش بررسی تاثیر سیموستاتین بر فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و سطح نیتریک اکساید در رده سلولی اندوتلیال HUVEC است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به روش تجربی در محیط آزمایشگاه بر روی رده سلولی اندوتلیال عروقی HUVEC تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران انجام شد.

آماده‌سازی رده سلولی اندوتلیال عروقی HUVEC:

ابتدا دفریزه و سپس پاساژدهی رده سلولی اندوتلیال عروقی انجام شد. به منظور دفریز کردن، سلول‌ها از

تانک ازت ۱۹٦°C- خارج و کرایوویال‌های حاوی سلول از نیتروژن مایع خارج نموده و فوراً در ویال‌ها تا حدی باز شد تا گاز ازت خارج شود. سپس در مجدداً بسته و انتهای آنها در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و به آرامی به صورت دورانی حرکت داده شد تا بلور منجمد در دیواره داخلی ویال وجود نداشته باشد که نشان دهنده دفریزه شدن سلول‌ها است. سلول‌ها در محیط کشت DMEM کشت داده شد. پاساژ دادن سلول‌ها طی چند مرحله انجام می‌شود: ۱- خارج کردن (Out) محیط رویی؛ ۲- مرحله دوم: شستشو با بافر PBS به منظور جدا کردن سلول‌های بلند شده (سلول‌های مرده)، ۳- افزودن آنزیم ترپسین (۲-۱/۵ ml)، ٤- افزودن محیط کشت به سلول‌ها، ۵- تعیین درصد سلول‌های زنده با رنگ‌آمیزی سلول توسط تریپان بلو.

بررسی اثر سیمواستاتین بر رده سلولی اندوتلیال عروقی HUVEC با روش MTT: تست در طی ۳ روز متوالی انجام شد؛ در روز اول محلول MTT تهیه شد. در روز دوم سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از ماده تیمار شد. در گروه کنترل، هیچ گونه تیماری روی سلول‌ها صورت نگردید. چاهک‌های حاوی سلول‌های کنترل تنها با محیط کشت کامل پر شدند. در روز سوم رنگ MTT (غلظت ۰/۵ mg/well) اضافه شد و به مدت ٤ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط رویی چاهک‌ها با سمپلر برداشته شده و ۱۰۰ µl ایزوپروپانول به هر چاهک اضافه شد. چاهک به مدت ۲۰ دقیقه روی shaker قرار داده شد. در نهایت میزان شدت رنگ توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (G۹٦۰۲DNM-) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

آنالیز کمی بیان ژن با روش Real time-PCR: دستگاه Real time-PCR از یک سیستم اپتیکی شناسایی خاصیت فلوئوروسنتی (سایبرگرین) به منظور نتایج کمی بهره می‌برد. به دلیل خطاهای متعددی حین پروسه آزمایش و ناپایداری مواد اولیه، از کنترل داخلی (ژن رفرنس یا housekeeping) استفاده شد. با مقایسه بیان آنها با نمونه کنترل و تیمار می‌توان کاهش یا افزایش بیان را مشاهده نمود. از ژن رفرنس GAPDH بدین منظور استفاده شد.

اثر سیموستاتین بر آنزیم نیتریک اکسایدسنتاز: در این پروژه به وسیله این تکنیک غلظت IC50 سیموستاتین بر بیان ژن iNOS با در نظر گرفتن گروه کنترل بررسی شد. سپس RNA نمونه‌ها را استخراج و با رونویسی معکوس cDNA تهیه شد. سپس طبق پروتکل نمونه‌ها آماده شد و در دستگاه قرار داده شد.

استخراج RNA از سلول‌ها: استخراج RNA توسط کیت easy pure RNA kit انجام شد. در تکنیک PCR، نیاز به تکثیر قطعه ژن مورد نظر است. که این فرمان به زبان توالی نوکلئوتیدی منتقل می‌شود. توالی ژن iNOS از سایت http://www.ncbi-nlm.nih.gov پیدا شد و با استفاده از نرم‌افزارهای beacon designer, gene runner, primer express توالی نوکلئوتیدی مناسب پرایمر reverse و forward طراحی شد. از آنجایی که تکنیک PCR مناسب نمونه‌های DNA طراحی شده است و نمونه‌های پژوهش حاضر، RNA است، با رونویسی معکوس DNA مکمل یا C DNA تهیه شد.

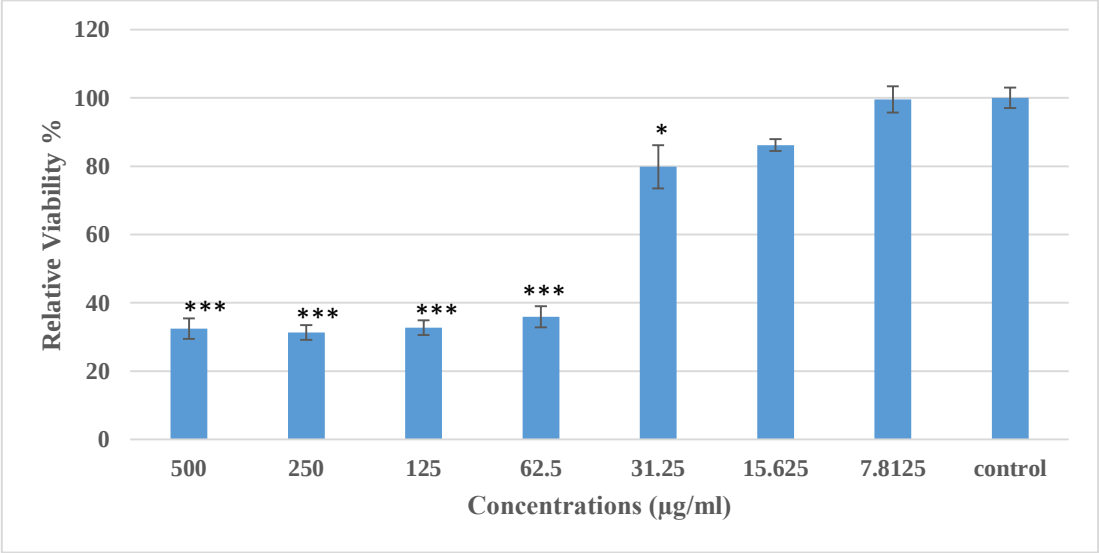
سنجش نیتریک اکساید: سنجش نیتریک اکساید توسط واکنش گریس انجام می‌شود. گریس یک آزمایش رنگ‌سنجی بوده که در آن ترکیبات رنگی پایدار آزو تولید شده است. شدت رنگ صورتی حاصل توسط الایزاریدر قابل اندازه‌گیری است که نشان‌دهنده میزان نیتریت در نمونه است.

آنالیز آماری داده‌ها: جهت معنی‌دار بودن نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری واریانس یک طرفهone way ANOVA مورد ارزیابی

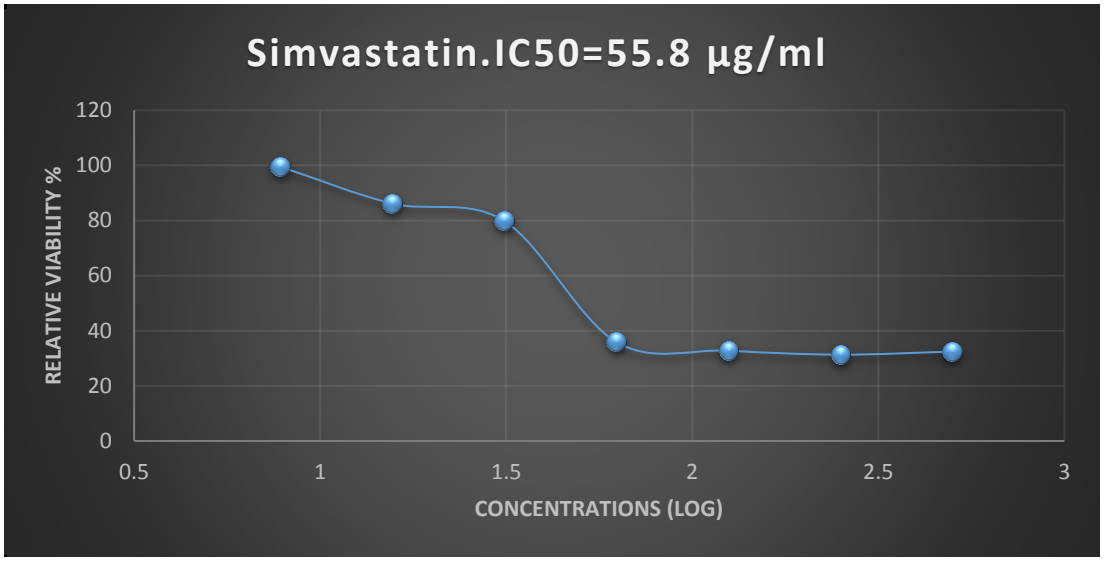
قرار گرفت. نتایج به صورت Mean±SD ارائه می‌گردد. معیار استنتاج آماری سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ است.

نتایج

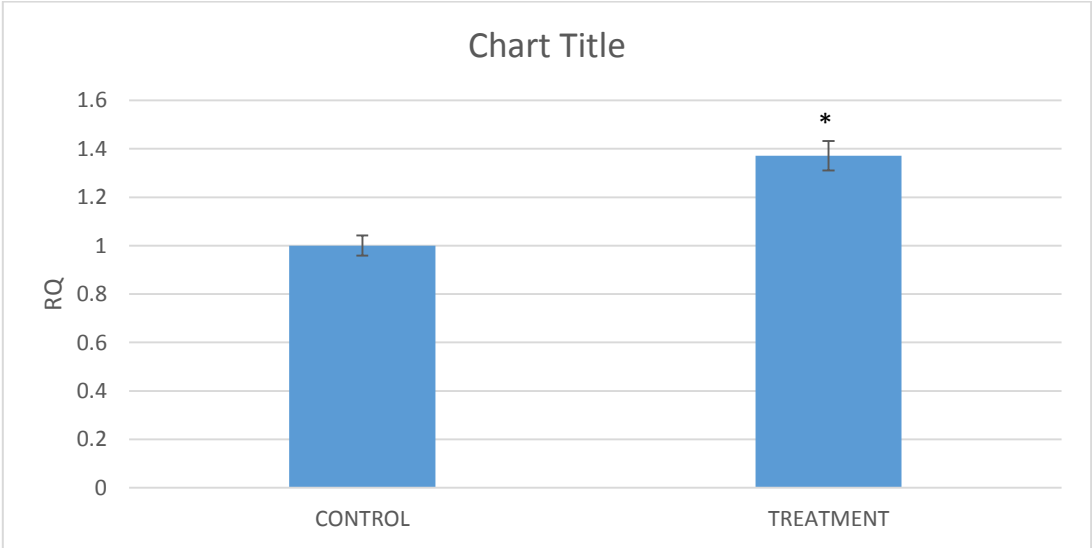
تاثیر غلظت‌های مختلف سیمواستاتین بر رده سلولی اندوتلیال عروقی HUVEC در نمودار ۱ نشان داده شده است. درصد زنده‌مانی سلول‌های اندوتلیال عروقی HUVEC با استفاده از تست MTT تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیمواستاتین در نمودار ۲ ارائه شده و غلظت IC50 (غلظتی که ۵۰٪ سلول‌ها زنده مانده‌اند) محاسبه شده است. با توجه به نمودار ۱، نتایج حاکی از آن است که با افزایش غلظت سیموستاتین، زنده‌مانی سلول‌های اندوتلیال عروقی HUVEC در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است (p <۰/۰۰۱). بیان ژن iNOS در رده سلولی HUVEC در مقایسه با گروه کنترل طبق نمودار ۳ افزایش یافت. سطح نیتریک اکساید در غلظت‌های بالاتر از ۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر سیمواستاتین در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت. ولی در غلظت‌های پایین‌تر ۱٦، ۳۱ و ٦۲ میکرولیتر بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری مشاهده شد و افزایش یافت.



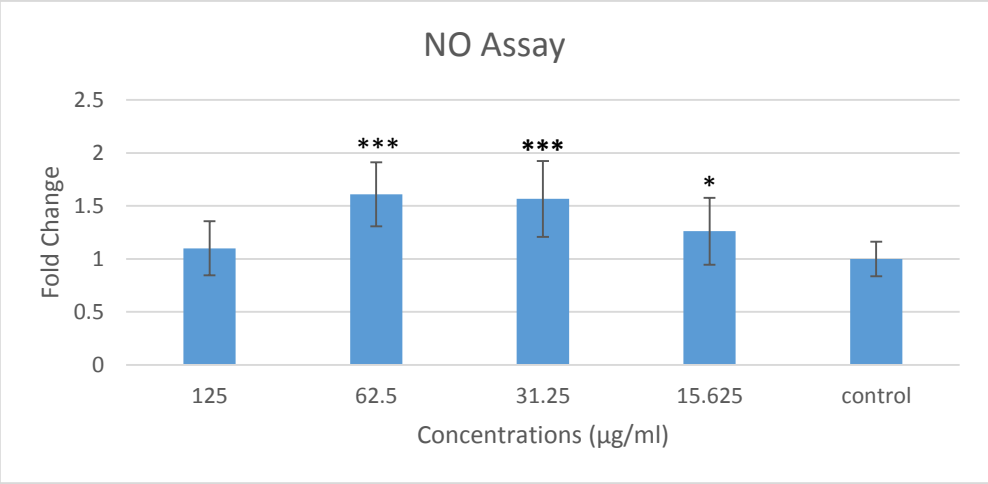
نمودار ۱- تعیین زنده مانی سلول‌های اندوتلیال عروقی HUVEC با استفاده از تست MTT تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیمواستاتین. *: p < ۰/۰۵ و ***: p < ۰/۰۰۱



نمودار ۲- درصد زنده مانی سلول‌های اندوتلیال عروقی HUVEC با استفاده از تست MTT تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیمواستاتین



نمودار ۳- میزان اثر سیمواستاتین بر بیان ژن INOS در رده سلولی HUVEC در مقایسه با گروه کنترل. ❋: $p < ۰/۰۵$



نمودار ٤ سنجش اثر دوزهای متفاوت سیمواستاتین بر سطح نیتریک اکساید. *: $p < ۰/۰۵$، ***: $p < ۰/۰۰۱$

بحث

در مطالعه حاضر برای اولین بار درصد میرایی سلول‌ها و اثرسمیت داروی سیموستاتین در رده HUVEC بررسی گردید. همچنین برای اولین بار تاثیر سیموستاتین بر بیان آنزیم iNOS و سطح نیتریک اکساید در HUVEC مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مشاهده شد که در غلظت IC50 سیموستاتین بیان ژن iNOS در رده سلولی HUVEC در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار یافت. همچنین سطح نیتریک اکساید در غلظت‌های پایین‌تر سیموستاتین ۶۲، ۳۱ و ۱۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری داشت و افزایش یافت. البته سطح نیتریک اکساید در غلظت‌های بالاتر از ۱۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر سیمواستاتین در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت. این مشاهده مطابقت دارد با نتیجه‌ی تحقیقی که در سال ۱۹۹۸ توسط هرناندز انجام گرفت که در آن سیموستاتین تمایل به افزایش فعالیت کاتالیک نیتریک اکسایدستاز اندوتلیالی و mRNA و سطح پروتئین نشان داده اما یافته‌های آنها مستقیماً این مشاهدات را در سلول‌های اندوتلیالی حمایت نمی‌کند (۱۵). همچنین این مشاهده حمایت می‌کند از تحقیقی که در سال ۲۰۱۹ توسط هوانگ و همکاران انجام گرفت مطابق این یافته‌ها مهمترین مکانیسم مهارکننده‌های کاهنده HMG-CoA به عنوان عامل حفاظتی در برابر سکته مغزی با افزایش اثر نیتریک اکساید سنتاز می‌باشد (۱۷). تحقیق حاضربا با تحقیقی که در سال ۲۰۰۱ توسط هوانگ و همکاران انجام گرفت همراستا می باشد. مطالعه روی موش‌ها نشان داده است که موستاتین که یک مهارکننده HMG-CoA reductase است سطح پروتئین و mRNA نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی را افزایش داده است (۱۳،۱۷).

همچنین این مشاهده با تحقیقی که در سال ۲۰۰۲ توسط مک گیرت و جانسون وهمکاران در سال ۲۰۰۷ انجام گرفت مطابقت دارد درمان با سیموستاتین گرفتگی عروق مغزی در موش‌ها بعد از SAH کاهش داده و اثرات نورولوژیکال بهتری به همراه داشته که این نتایج با افزایش سطح پروتئین نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی در عروق مغزی همراه بوده که نشان می‌دهد بیشتر شدن فعالیت نیتریک اکساید سنتاز عامل این مشاهدات مثبت است (۲۱، ۲۳).

مشاهده حاضر با تحقیق هریوانتو و همکاران در سال ۲۰۱۹ و پانزا در سال ۱۹۹۷ مطابقت دارد که به تأثیر سیمواستاتین بر میزان نیتریک اکسید و سطح hs-CRP در بیماران مبتلا به سیروز کبدی پرداختند. تجویز

سیموستاتین سطح نیتریک اکساید سرم را افزایش داده (28، 13). همچنین تحقیق حاضر با مشاهدات باسپینار و همکاران در سال ۲۰۱٦ هم خوانی دارد. آنها درمان استاتین بر عملکرد کلیوی و آدرنال و سطح اکسید نیتریک در بیماران مبتلا به فشار خون بررسی نمودند. اگرچه نتایج مطالعات پیشین در سیستم آزمایشگاهی نشان داده‌اند سیموستاتین تمایل به افزایش فعالیت کاتالیک eNOS و mRNA اما مستقیماً این مشاهدات را در سلول‌های اندوتلیالی حمایت نمی‌کند (۵).

همچنین این مشاهدات مطابقت دارد با تحقیق منسون و همکاران در سال ۲۰۱۸ در تحقیقی به بررسی افزایش و تقویت عملکرد اندوتلیال و فراهمی زیستی اکسید نیتریک توسط اسید ائیکوسپنتائنوئیک در ترکیب با استاتین پرداختند. داده‌ها نشان می‌دهد که درمان ترکیبی با EPA و ATM برای عملکرد اندوتلیال سودمند است (۲۲). البته مطالعاتی نیز انجام شده که یافته‌های ما را حمایت نمی‌کنند:

از جمله احمد در سال ۲۰۰٦ در پژوهشی نشان داد سیموستاتین با استفاده از مهار سنتز اکسید نیتریک اکسید القایی (iNOS) منجر به کاهش هایپرتروفی قلب در موش گردید. البته این تحقیق در سطح کاردیومیوسیت انجام شده و مطالعه ما سلول‌های اندوتلیالی وریدی را بررسی می‌کند نتیجتاً این یافته تناقضی با فرضیه ما ندارد (۱).

یاماک و همکاران در سال ۲۰۱۸ به تأثیر استاتین‌ها بر بیان سیتوئین ۱ و بیان اکسید نیتریک اندوتلیال در بیماران جوان با سابقه انفارکتوس میوکارد زودرس پرداختند. افزایش معنی‌داری در سطح SIRT1 و کاهش معنی‌داری در سطح eNOS در کلیه ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها برای هر دو SNP در بیمارانی که در مقایسه با گروه کنترل استاتین درمانی دریافت کرده بودند، مشاهده شد (۳۵). البته این تحقیق تاثیر سیموستاتین بر آنزیم نیتریک اکساید سنتاز ساب تایپ iNOS و مقدار نیتریک اکساید آزاد شده را بررسی نکرده است. البته که هیچ کدام از این تحقیقات در سطح سلول‌های اندوتلیالی انجام نشده و هیچ کدام به طور اختصاصی به بررسی تاثیر سیموستاتین بر آنزیم iNOS نپرداخته‌اند و از این جهت نتایج تحقیق حاضر در تحکیم این نظریه که استاتین‌ها می‌تواند برای مشکلات قلبی عروقی ناشی از اختلال عملکرد اندوتلیالی در تولید نیتریک اکساید مفید باشد حائز اهمیت است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که غلظت IC50 سیموستاتین باعث افزایش بیان نیتریک اکساید سنتاز (iNOS) در سلول‌های اندوتلیالی وریدی بند ناف انسان (HUVEC) می‌شود. همچنین دوزهای کم سیموستاتین باعث افزایش سطح نیتریک اکساید در HUVEC می‌شود. می‌طلبد که در مطالعات کلینیکی و حیوانی بررسی شود که آیا می‌توان از این دارو در اختلالات اندوتلیالی و بیماری‌های قلبی عروقی که منجر به کاهش عملکرد نیتریک اکسایدسنتاز و تولید نیتریک اکساید می‌شود بهره برد. این پژوهش برگرفته از پایان نامه دانشجویی با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1397.317 بوده و از منبع مالی خاصی برای انجام استفاده نشده است.

منابع

1. Ahmed A.M. 2017. Inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by simvastatin attenuates cardiac hypertrophy in rats. *Folia Morphologica*, 76(1): 15-27.

2. Albrecht E.W.J.A, Stegeman C.A, Heeringa P. 2003. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *Journal of Pathology*, 199: 8.

3. Amin-Hanjani S., Stagliano N.E., Yamada M. 2001. Mevastatin, an HMG-

12. Grünler J., Ericsson J., Dallner G. 1994. Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1212: 259-277.

13. Hariyanto B., Kusnanto P., Purwanto B. 2019. The Effect of Simvastatin on Nitric Oxide and hs-CRP Levels in patients with Liver Cirrhosis at Dr. Moewardi Hospital, Surakarta. *Indonesian Journal of Medicine*, 4(1): 9-14.

14. Hebert P. R, Gaziano J. M, Chan K. S, et al. 1997. American. *Medical Association*, 27: 313-321.

15. Hernández-Perera O., Pérez-Sala D., Navarro-Antolin J. 1998. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Co Areductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 101: 2711-2719.

16. Ho M.L, Chen Y.H., Liao H.J. 2009. Simvastatin increases osteoblasts and osteogenic proteins in ovariectomized rats. *European Journal of Clinical Investigation*, 39(4): 296-303.

17. Huang P.H, Chou R.H, Tsai H.Y. 2019. Biphasic effects of HMG-CoA reductase inhibitor, simvastatin, on angiogenesis through endothelial nitric-oxide synthase-dependent pathway. *Strait Circulation Journal*, 1(1): 7.

18. Ignarro L.J, Buga G.M, Wood K.S, 1987. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 84: 9265.

19. Ignarro L.J. 1990. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension*,16: 477-83.

20. Ignarro L.J. 1990. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice. *Stroke*, 32: 980-986.

4. Arnal J.F., Dinh-Xuan A.T., Pueyo M. 1999. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55: 1078-1087.

5. Baspınar O., Bayram F., Korkmaz S., 2016. The effects of statin treatment on adrenal and sexual function and nitric oxide levels in hypercholesterolemic male patients treated with a statin. *Journal of Clinical Lipidology*, 10(6): 1452-1461.

6. Blauw G.J., Lagaay A.M., Smelt A. H, 1997. New strategies for prevention of ischemic stroke: The life study. Speringer, 28: 946-950.

7. Bocan T.M.A, Mazur M.J, Muller E.Q. 1994. Antiatherosclerotic activity of inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in cholesterol-fed rabbits: a biochemical and morphological evaluation. *Atherosclerosis*, 111: 127-142.

8. Conde K., Roy S., Freake H.C., 1999. Atorvastatin and simvastatin have distinct effects on hydroxy methylglutaryl-CoA reductase activity and mRNA abundance in the guinea pig. *Lipids*, 34(12): 1327-1332.

9. Endres M, Laufs U, Huang Z, et al. 1998. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 95: 8880-8885.

10. Feron O., Dessy C., Moniotte S. 1999. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production bypromoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *Clinical Investigation Journal*, 103: 897-905.

11. Goldstein J.L, Brown M.S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343: 425-430.

cavernosum smooth muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 170(2): 843-850.

21. Johnson- Anuna L. N, Eckert G. P, Franke C 2007. Simvastatin protects neurons from cytotoxicity by up-regulating Bcl- 2 mRNA and protein. *Journal of Neurochemistry*, 101(1): 77-86.

22. Mason R. P, Dawoud H, Jacob R. F, et al. 2018. Eicosapentaenoic acid improves endothelial function and nitric oxide bioavailability in a manner that is enhanced in combination with a statin. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 103: 1231-1237.

23. McGirt MJ, Lynch JR, Parra A, et al. 2002. Simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase and ameliorates cerebral vasospasm resulting from subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 33: 2950-2956.

24. Meininger C.J., Marinos R.S., Hatakeyama K, et al. 2000. Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency, *Biochemistry Journal*, 349(1): 353-356.

25. Naoum J. J, Zhang S, Woodside K. J, et al. 2004. Aortic eNOS expression and phosphorylation in Apo-E knockout mice: differing effects of rapamycin and simvastatin. *Surgery*, 136(2): 323-328.

26. Packard C.J., Klein C.B. 1998. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation*, 97: 1440-1445.

27. Palmer R.M.J, Ferrige A.G, Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526.

28. Panza J.A. 1997. Endothelial dysfunction in essential hypertension. *Clinical Cardiology*, 20: 26-33.

29. Risé P., Ghezzi S., Carissimi R. 2007. Δ5 desaturase mRNA levels are increased by simvastatin via SREBP-1 at early stages, not via PPARα, in THP-1 cells. European *Journal of Pharmacology*, 571(2-3): 97-105.

30. Sacks F.M., Pfeffer M.A., Moye L.A., Rouleau J.L., Rutherford J.D. 1996. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *England Journal Medicine*, 335(14): 1001-1009.

31. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. 1994. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Simvastatin Survival Study Group. *Lancet*, 344: 1389-1383.

32. Shepherd J., Cobbe S.M., Ford I., 1995. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *England Journal of Medicine*, 333: 1301-1307.

33. Stockklauser-Farber K., Ballhausen T., Laufer A. 2000. Influence of diabetes on cardiac nitric oxide synthase expression and activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1535(1): 10-20.

34. Witztum J.L. 1996. Drugs used in the treatment of hyper lipoproteinemias. In Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, and A.G. Gilman, editors. McGraw-Hill, New York, 875-897.

35. Yamaç A. H, Kılıç Ü. 2018. Effect of statins on sirtuin 1 and endothelial nitric oxide synthase expression in young patients with a history of premature myocardial infarction. *Journal of Turkish Society Cardiology*, 46(3): 205-215.