مطالعه اثرات محافظتی رزوراترول بر انفارکتوس تجربی میوکارد ایجاد شده توسط ایزوپروترنول در موش صحرایی

داریوش مهاجری[1*]، علیرضا منادی[2]، غفور موسوی[3]، امیرپرویز رضایی صابر[3]

۱- استاد گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۲- دانشیار گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۳- استادیار گروه آموزشی علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: mohajeri@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۳/۶/۳۰ پذیرش نهایی: ۹۳/۱۱/۱۸)

چکیده

انفارکتوس میوکارد که خصوصیات مکانیکی، الکتریکی، ساختاری و بیوشیمیایی سیستم قلب را تحت تاثیر قرار می‌دهد، یکی از دلایل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته به‌شمار می‌رود. هدف این مطالعه ارزیابی اثرات محافظتی رزوراترول در برابر انفارکتوس حاد میوکارد ایجاد شده توسط ایزوپروترنول در موش صحرایی می‌باشد. بدین منظور، تعداد ٤٠ سر موش صحرایی نر ویستار به‌طور تصادفی به چهار گروه برابر شامل: ۱-گروه شاهد، ۲- تیمار با رزوراترول، ۳- تیمار با ایزوپروترنول و ٤- تیمار با ایزوپروترنول به‌علاوه رزوراترول تقسیم شدند. ایزوپروترنول (۸۵ mg/kg) در دو روز متوالی به فاصله ٢٤ ساعت به طور زیرجلدی و رزوراترول (۲۰ mg/kg) به طور داخل صفاقی به مدت ۳۰ روز متوالی تزریق شد. در پایان، نمونه خون جهت اندازه‌گیری بیومارکرهای قلب شامل کراتین کیناز-MB و لاکتات دهیدروژناز اخذ شد. سپس همه موش‌ها جهت آسیب‌شناسی بافتی و تعیین وضعیت آنتی‌اکسیدانی عضله قلب، با سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز آسان‌کُشی شدند. در مشاهدات ریزبینی، عضله قلب گروه تیمار با ایزوپروترنول دچار تغییرات شدید دژنراتیو و نکروز شده بود، در حالی‌که رزوراترول آسیب نکروتیک قلب را کاهش داد. مقادیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز قلب در گروه تیمار با ایزوپروترنول به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) کاهش یافت ولی در گروه تیمار با رزوراترول به‌علاوه ایزوپروترنول به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) افزایش یافت. رزوراترول مقدار مالون‌دی‌آلدئید را که در اثر تیمار با ایزوپروترنول افزایش یافته بود، به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش داد. نتایج نشان داد رزوراترول با خواص آنتی‌اکسیدانی خود قلب موش‌های صحرایی را از آسیب ایسکمیک ناشی از ایزوپروترنول محافظت می‌کند.

کلید واژه‌ها: ایزوپروترنول، انفارکتوس قلب، رزوراترول، موش صحرایی.

مقدمه

سکته‌های قلبی و عواقب ناشی از آن یکی از دلایل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته به شمار می‌رود (Levy and Feinleib, 1984). انفارکتوس میوکارد پدیده پیچیده‌ای است که خصوصیات مکانیکی، الکتریکی، ساختاری و بیوشیمیایی سیستم قلب را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Petrich *et al*., 1996). انفارکتوس میوکارد موقعی رخ می‌دهد که نکروز عضله قلب به دلیل عدم تعادل طولانی مدت بین اکسیژن‌رسانی و میزان تقاضای عضله قلب برای اکسیژن رخ دهد (Lopez and Murray, 1998). در میان مکانیسم‌های مختلف، تجمع رادیکال‌های آزاد در پاتوفیزیولوژی انفارکتوس حاد میوکارد موثر قلمداد شده است (Zhou *et al*., 2008). ایزوپروترنول (Isoproterenol) یک آگونیست بتا-آدرنوسپتور است که با ایجاد عدم تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها در میوکارد باعث سکته قلبی می‌شود (Rajadurai and Prince, 2006; Rathore *et al*., 1998). درمان‌های رایج برای انفارکتوس میوکارد شامل استفاده از مهار کننده‌های آنژیوتانسین کانورتینگ آنزیم (Angiotensin Converting Enzyme, ACE)، آنتاگونیست‌های گیرنده بتا-آدرنرژیک و عوامل ضد پلاکتی می‌باشد. به هر حال، با توجه به میزان مرگ و میر بالا در پی انفارکتوس قلب، عوامل موجود و در دسترس برای دارودرمانی این عارضه و کنترل تلفات ناشی از آن کافی به نظر نمی‌رسد. از سوی دیگر، مواد بیولوژیک شاخه‌ای از فارماکوتراپی مدرن بیماری‌ها را تشکیل می‌دهند. اگر چه عوامل دارویی متنوعی برای درمان انواع بیماری‌ها وجود دارد، لکن اغلب بیماران قادر به تحمل اثرات جانبی داروهای شیمیایی نیستند و از سوی دیگر اکثر مواد بیولوژیک با منشا طبیعی اثرات جانبی بسیار اندکی روی بیماران به جای می‌گذارند. بنابراین استفاده از درمان‌های جدید و تکمیلی برای درمان سکته‌های قلبی و کنترل عوارض از آن به خصوص در کشورهای پیشرفته مورد بحث می‌باشد (Nandave *et al*., 2007). آنتی‌اکسیدان‌های متعددی برای ارزیابی اثرات محافظتی احتمالی آنها در برابر انفارکتوس حاد میوکارد مورد آزمایش قرار گرفته‌اند (*Buttros et al., 2009; Suchalatha and Shyamala, 2004*). آنتی‌اکسیدان‌ها تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش داده و بدینوسیله باعث محافظت از میوسیت‌ها می‌شوند (Peer *et al*., 2008).

رزوراترول (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) یک فیتوآلکسین طبیعی است (Jeandet et al., 1991; Oktem *et al*.2010) که حداقل در ۲۷ گونه گیاهی یافت می‌شود (Jeandet *et al*., 1991). تحقیقات نشان داده است که رزوراترول دارای اثرات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد دیابتی می‌باشد (Su *et al*., 2006; Collodel *et al*., 2011). نشان داده شده است که اثرات کاهش در پراکسیداسیون لیپیدی رزوراترول بسیار قوی-تر از سایر فنول‌ها نظیر اپی‌کاتچین (epicatechin)، کاتچین (catechin) و کوئرستین (quercetin) می‌باشد (Shingai et al., 2011). همچنین نشان داده شده است که رزوراترول آسیب DNA را توسط پاکسازی رادیکال‌های هیدروکسیل کاهش می‌دهد. در مطالعه دیگری مشخص شده است که رزوراترول آپوپتوز سلوهای زایای بیضه را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (Uguralp *et al*., 2005).

با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی رزوراترول، گمان می‌رود این ماده بتواند بافت عضله قلب در انفارکتوس ایجاد شده در اثر رزوراترول محافظت کند. در هر صورت با توجه به بررسی منابع، مطالعه‌ای در رابطه با اثرات محافظتی رزوراترول در برابر انفارکتوس میوکارد ایجاد شده در اثر رزوراترول در موش صحرایی وجود ندارد. بنابراین، تحقیق حاضر برای اولین بار جهت ارزیابی اثرات محافظتی رزوراترول در برابر انفارکتوس حاد میوکارد ایجاد شده در اثر رزوراترول در موش صحرایی طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده و در سال ۱۳۹۳ در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام شد. در این مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی بود.

برای انجام این مطالعه، از تعداد ٤٠ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵±۲۰۰ گرم و در محدوده سنی ۷-٦ هفته استفاده شد. شرایط تغذیه و نگه‌داری برای تمام گروه ها یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای ۲±۲۱ درجه سلسیوس بود. جیره غذایی یکسان و آب نیز به‌طور آزاد در دسترس قرار گرفته و پس از یک هفته عادت به شرایط جدید، آزمایش شروع شد. همه تیمارها بین ساعات ۱ تا ٦ بعد از ظهر اجرا شد.

موش‌ها به‌طور تصادفی به ٤ گروه مساوی تقسیم شدند.

گروه اول (Control) به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و نرمال سالین را به میزان ۱۰ ml/kg به شکل داخل صفاقی به مدت ۳۰ روز دریافت کرد. گروه دوم (RES) رزوراترول (Sigma Chemicals, St Louis, US) را به میزان ۲۰ mg/kg در ۱۰ ml/kg نرمال سالین به شکل تزریق داخل صفاقی و به مدت ۳۰ روز دریافت کرد (Yulug *et al.*, 2013). گروه سوم (ISO) ایزوپروترنول (Sigma Chemicals, St Louis, US) را در دو روز اول (روزهای ۱ و ۲ مطالعه) به فاصله ٢٤ ساعت با تزریق زیرجلدی با دز ۸۵ mg/kg و نرمال سالین (۱۰ ml/kg) را از راه داخل صفاقی به مدت ۳۰ روز دریافت کرد (Li *et al.*, 2006). گروه چهارم (RES+ISO) ایزوپروترنول (۸۵ mg/kg) را به فاصله ٢٤ ساعت در روزهای ۱ و ۲ از راه تزریق زیرجلدی و رزوراترول (۲۰ mg/kg) را به مدت ۳۰ روز از راه داخل صفاقی دریافت کرد.

٢٤ ساعت پس از آخرین تیمار موش‌ها وزن‌کشی شده و نمونه خون جهت ارزیابی بیومارکرهای قلب شامل کراتین کیناز-MB (CK-MB) و لاکتات دهیدروژناز از سینوس پشت کره چشم (Retro-orbital plexus) اخذ گردید. نمونه‌های خون با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و اندازه‌گیری مارکرها به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از کیت‌های تجارتی (Randox Laboratories Ltd, UK) انجام شد.

سپس همه موش‌ها هم‌زمان با ایجاد دررفتگی در مهره‌های گردن (Cervical dislocation) به راحتی کشته شدند. قلب موش‌ها جدا و وزن آنها اندازه‌گرفته شد. برای تعیین وضعیت آنتی‌اکسیدانی، قسمتی از عضله قلب سریعاً جدا و در سالین بسیار سرد شستشو و هموژنات ۱۰٪ در ۱/۱۵٪ (w/v) کلرور پتاسیم تهیه شد. هموژنات با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت

۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و محلول رویی جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی از طریق اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA ;malondialdehyde) و همچنین برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (superoxide dismutase; SOD)، کاتالاز (catalase; CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX glutathione peroxidase;) مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه و میزان MDA با استفاده از کیت‌های تجاری موجود (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China) و طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده کیت انجام شد. مقدار MDA بافتی به صورت نانومول مالون‌دی‌آلدئید (nmol) در میلی‌گرم پروتئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به صورت واحدهای قراردادی در میلی‌گرم پروتئین عنوان گردید.

پراکسیداسیون چربی در عضله قلب با روش رنگ سنجی (colorimetrically) به وسیله اندازه‌گیری TBARS (thiobarbituric acid reacting substances) طبق روش فراگا و همکاران (۱۹۸۸) انجام شد (Fraga *et al.*, 1988).

به‌طور خلاصه: ۰/۱ میلی لیتر هموژنات بافتی با ۲ میلی‌لیتر معرف (Thiobarbituric acid)TBA-(trichloroacetic acid)TCA-Hcl (۳۷٪ TBA، ۰/۲۵ مول HCL و ۱۵٪ TCA، به نسبت ۱:۱:۱) مخلوط و پس از ۱۵ دقیقه قرارگیری در بن ماری جوش، خنک گردید و در ۳۵۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. شدت جذب محلول رویی شفاف در ۵۳۵ nm در مقابل بلانک اندازه‌گیری گردید. مقادیر به صورت نانومول بر ۱۰۰ گرم بافت بیان شدند.

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز توسط روش نیشیکیمی و همکاران تعیین گردید (Nishikimi *et al.*, 1972). در حدود ۵ میکروگرم از پروتئین‌های تام هر یک از هموژنات‌های قلب با بافر پیروفسفات سدیم، فنازین متوسولفات (phenazine methosulfate; PMT) و نیترو-بلو تترازولیوم (Nitro-blue Tertazolium; NBT) مخلوط گردید. واکنش با افزودن نیکوتین‌آمیدآدنین دی‌نوکلئوتید (Nicotinamide-adenine dinucleotide; NADH) آغاز شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه انکوبه و با افزودن ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال متوقف گردید. شدت جذب مخلوط رنگزای تشکیل شده در ٥٦٠nm اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به صورت غلظت آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰ درصد در ۱ دقیقه، تحت شرایط مطالعه، تعیین گردید.

فعالیت کاتالاز توسط روش کلایبورن و بر اساس تجزیه پراکسید هیدروژن در ٢٤٠nm، مورد سنجش قرار گرفت (Claiborne 1985). به طور خلاصه، مخلوط مورد سنجش متشکل از ۱/۹۵ میلی لیتر بافر فسفات (۰/۰۵ M, pH= ۷)، ۱ میلی لیتر پرکسید هیدروژن (۰/۰۱۹ M) و ۰/۰۵ میلی لیتر PMS (۱۰٪) در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر بود. تغییرات در جذب، در ٢٤٠nm اندازه‌گیری شد. در نهایت نتیجه به شکل "فعالیت کاتالاز در دقیقه" محاسبه گردید.

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از روش روتروک و همکاران (Rotruck et al., 1973) و بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت.

$H_2O_2 + 2GSH$ (گلوتاتیون احیاء) $\rightarrow 2H_2O +$ GSSG(گلوتاتیون اکسید)

گلوتاتیون پراکسیداز، در هموژنات بافتی، گلوتاتیون را اکسیده کرده که به طور هم زمان پراکسید هیدروژن به آب احیاء می‌گردد. این واکنش پس از ۱۰ دقیقه توسط تری‌کلرواستیک اسید متوقف و گلوتاتیون باقیمانده توسط محلول دی‌تیوبیس نیتروبنزوئیک اسید (Dithiobis nitrobenzoic acid; DTNB) مجدداً فعال گردیده و منجر به تشکیل ترکیب رنگی می‌گردد که با اسپکتروفتومتر در ٤٢٠nm اندازه‌گیری می‌شود. مخلوط واکنش‌گر متشکل از ۰/۲ میلی‌لیتر اتیلن دی‌آمین تترا-استیک اسید (ethylenediamine tetra-acetic acid; EDTA) ۰/۸mM، ۰/۱ میلی‌لیتر آزید سدیم (sodium azide) ۱۰mM، ۰/۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۲/۵mM و ۰/۲ میلی‌لیتر هموژنات بود که در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد متوقف و لوله‌ها با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۳ میلی لیتر دی سدیم هیدروژن ۰/۸ mM و ۰/۱ میلی‌لیتر DTNB ۰/۰٤ درصد به محلول شناور افزوده شد و بلافاصله رنگ حاصله در ٤٢٠nm اندازه‌گیری شد. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز به صورت میلی گرم پروتئین/دقیقه/میکرومول گلوتاتیون اکسید بیان گردید.

آسیب‌شناسی بافتی قلب موش‌های مورد آزمایش با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین انجام شد. قسمتی از بافت قلب موش‌ها در فرمالین بافری ۱۰ درصد پایدار شد و از نمونه‌های پایدار شده در فرمالین با استفاده از شیوه‌های رایج پاساژ بافت و تهیه مقاطع هیستولوژی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون و رنگ آمیزی معمول هماتوکسیلین- ائوزین تهیه شد. مشاهدات میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰۰× و در ۵ میدان میکروسکوپی از هر برش، به‌طور تصادفی با میکروسکوپ نوری مدل Nikon (ECLIPSE E200، ساخت کشور ژاپن) انجام شد.

تحلیل آماری داده‌ها

برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS-17 استفاده شد. داده‌های به‌دست آمده کمّی، به صورت میانگین±انحراف معیار (mean±SD) ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (tukey) مورد بررسی قرار گرفت. در مورد داده‌های هیستوپاتولوژی برای مقایسه نتایج درجه‌بندی شده آسیب بافت قلب اختلاف معنی‌داری توسط آزمون ناپارامتری کروسکال والیس (kruskal-wallis) و سپس آزمون یو من-ویتنی (mann-whitney u test) برای ارزیابی مقایسه‌ای دو به دو، مورد استفاده قرار گرفت. اختلافات در سطح $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها

تاثیر ایزوپروترنول و رزوراترول بر وزن بدن و وزن قلب موش‌های صحرایی مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. اختلاف معنی‌داری از لحاظ وزن بدن بین گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت، هرچند که کاهش اندک و غیرمعنی‌دار در وزن بدن موش‌های گروه تیمار با ایزوپروترنول مشاهده شد.

تیمار با ایزوپروترنول به‌طور معنی‌داری وزن قلب موش‌ها را در مقایسه با گروه‌های شاهد و تیمار با رزوراترول افزایش داد ($p<۰/۰۱$). در گروه تیمار با ایزوپروترنول به‌علاوه رزوراترول، رزوراترول وزن قلب موش‌ها را در مقایسه با گروه تیمار با ایزوپروترنول به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۱- تاثیر رزوراترول بر وزن بدن و وزن قلب در موش‌های صحرایی مورد مطالعه

گروه‌ها	وزن بدن (gr)	وزن قلب (gr)
گروه شاهد	۲۰۸/۹۲±۸/۹۵	۰/۲۸۳±۰/۰۲٤
گروه تیمار با رزوراترول	۲۱۲/٤۸±۱۰/۸٦	۰/۲۸۷±۰/۰۲۷
گروه تیمار با ایزوپروترنول	۲۰۱/۷۳±٦/٤۲	۰/٤۱۸±۰/۰۳۸[a]
گروه تیمار با ایزوپروترنول به‌علاوه رزوراترول	۲۰٦/٥٤±۸/۳۲	۰/۳۱۱±۰/۰۲۸[b]

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار برای ۱۰ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است.

a: دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ($p<۰/۰۱$).

b: دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه تیمار با ایزوپروترنول ($p<۰/۰۵$).

تاثیر ایزوپروترنول و رزوراترول بر آنزیم‌های مارکر سرمی قلب موش‌های صحرایی مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. در گروه تیمار با ایزوپروترنول افزایش معنی‌داری در مقادیر سرمی کراتین کیناز-MB (creatine kinase-MB) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) در مقایسه با گروه شاهد ایجاد شد ($p<۰/۰۱$)، در حالی که تیمار با رزوراترول مقادیر افزایش یافته مارکرهای سرمی مذکور را به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($p<۰/۰۱$).

جدول ۲- تاثیر رزوراترول بر آنزیم‌های مارکر سرمی قلب در موش‌های صحرایی مورد مطالعه

گروه‌ها	لاکتات دهیدروژناز (IU/L)	کراتین کیناز-MB (IU/L)
گروه شاهد	۲٥۸/٥۳±۳۳/۷٦	۸٥/۹۲±٥/٦٤
گروه تیمار با رزوراترول	۲۷۱/٦۲±۳٦/٤٥	۸۷/٤٦±٦/۱٥
گروه تیمار با ایزوپروترنول	٦۱۳/٤۲±٦۷/۷۲[a]	۲٤۲/۳٥±۲۲/۱٤[a]
گروه تیمار با ایزوپروترنول به‌علاوه رزوراترول	٤۹۱/۷٥±٥۸/٦۳[b]	۱٥٤/۲۲±۱٥/۷۹[b]

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار برای ۱۰ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است.

a: دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ($p<۰/۰۱$).

b: دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه تیمار با ایزوپروترنول ($p<۰/۰۵$).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPx و MDA در جدول ۳ نشان داده شده است. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPx در بافت قلب موش‌های صحرایی گروه تیمار با ایزوپروترنول کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت ($p<۰/۰۱$). علاوه بر این، افزایش معنی‌داری در سطح

MDA، به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو، در بافت قلب موش‌های صحرایی گروه تیمار با ایزوپروترنول مشاهده شد ($p<۰/۰۱$). موش‌های صحرایی گروه تیمار با رزوراترول که تنها رزوراترول را دریافت کرده بودند، تغییر قابل توجهی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی قلب نشان ندادند. در گروه تیمار با ایزوپروترنول به‌علاوه رزوراترول، درمان با رزوراترول افزایش معنی‌داری را در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPx در مقایسه با گروه تیمار با ایزوپروترنول ایجاد کرد ($p<۰/۰۵$). همچنین در این گروه، درمان با رزوراترول باعث افزایش معنی‌دار میزان MDA در بافت قلب موش‌های صحرایی در مقایسه با گروه تیمار با ایزوپروترنول شد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳- تاثیر رزوراترول بر آنتی‌اکسیدان‌های قلب در موش‌های صحرایی مورد مطالعه

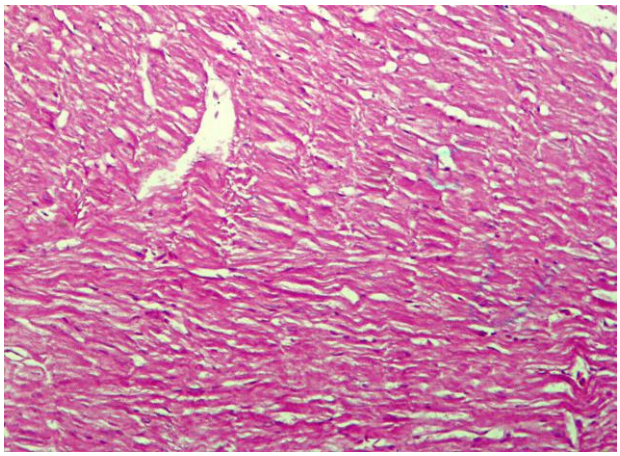
گروه‌ها	مالون‌دی‌آلدئید (nmol/mg protein)	سوپراکسید دیسموتاز (U/mg protein)	کاتالاز (µmol of H_2O_2 consumed/mg protein)	گلوتاتیون پراکسیداز (µmol of glutathione oxidized/mg protein)
گروه شاهد	٦/٩٧±١/٣١	٨/٧٢±٠/٨٢	١٦/٣٧±٠/٧٤	٢/٣٠±٠/١٢
گروه تیمار با رزوراترول	٦/٨٨±١/٢٧	٨/٦٤±٠/٧٩	١٥/٧٤±٠/٨٢	٢/٤١±٠/١٥
گروه تیمار با ایزوپروترنول	١١/١٦±٢/١٠a	٥/٢١±٠/٥٣a	١٠/١٣±٠/٥٢a	١/٨٥±٠/١١a
گروه تیمار با ایزوپروترنول به‌علاوه رزوراترول	٨/١٢±١/٨٥b	٧/١٤±٠/٦٧b	١٣/٦٨±٠/٦٩b	٢/١٤±٠/١٩b

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار برای ۱۰ سر موش صحرایی در هر گروه ارائه شده است.

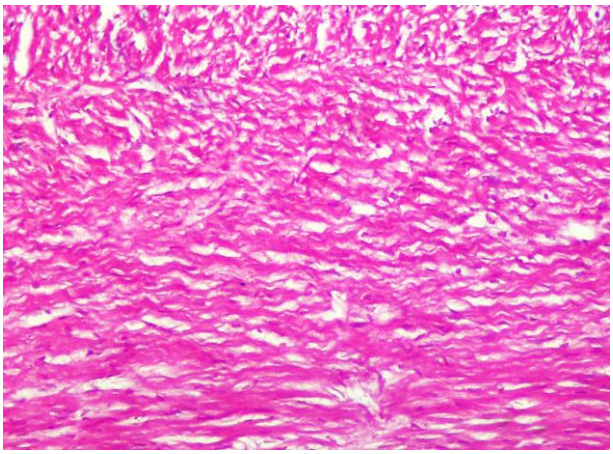
a: دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ($p<۰/۰۱$).

b: دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه تیمار با ایزوپروترنول ($p<۰/۰۵$).

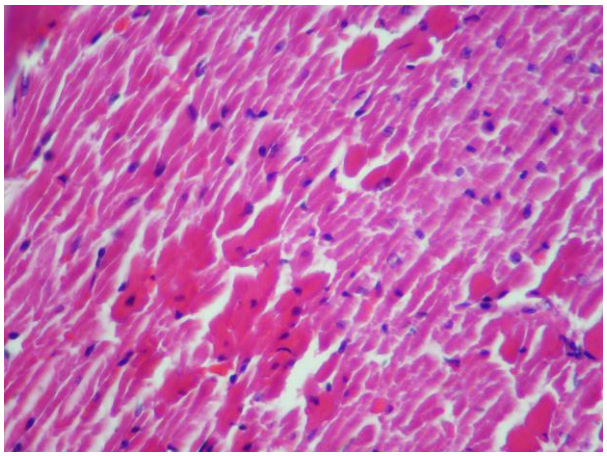
در آسیب‌شناسی بافتی همان‌طوری‌که در شکل ۱ نشان داده شده است، ساختار بافتی قلب در موش‌های صحرایی گروه شاهد طبیعی و سالم بود. تغییر پاتولوژی خاصی نیز در بافت قلب موش‌های صحرایی گروه تیمار با رزوراترول، مشاهده نشد به‌طوری‌که، ساختار بافتی قلب در این گروه، شبیه گروه شاهد کاملاً طبیعی به نظر می‌رسید (شکل ۲). در بافت قلب موش‌های صحرایی گروه تیمار با ایزوپروترنول، تغییرات دژنراتیو و نکروز تارهای عضلانی قلب، ارتشاح سلول‌های آماسی، نشت گلبول‌های قرمز خون و ادم بینابینی مشاهده شد (شکل ۳). در گروه تیمار با ایزوپروترنول به‌علاوه رزوراترول، درمان با رزوراترول، به‌طور قابل توجهی باعث کاهش تغییرات پاتولوزیک از جمله نکروز و ارتشاح لکوسیت‌ها در بافت عضله قلب موش‌های صحرایی شد و تنها آسیب قابل مشاهده، حضور ادم بینابینی ملایم و واکوئولاسیون میوسیت‌ها به‌خصوص در نواحی آندوکارد بود (شکل ٤).



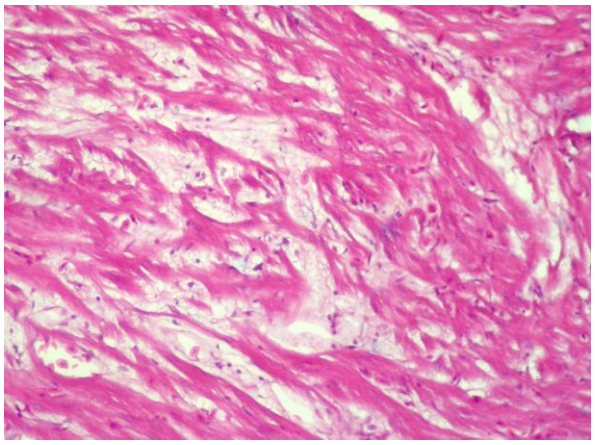
شکل ۱- نمای ریزبینی از بافت قلب یک موش صحرایی از گروه شاهد: بافت قلب سالم و بدون تغییر پاتولوژیک است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشتنمایی ۴۰×).



شکل ۲- نمای ریزبینی از بافت قلب یک موش صحرایی از گروه تیمار با رزوراترول: تغییر پاتولوژی خاصی در بافت قلب مشاهده نمی‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشتنمایی ۴۰×).



شکل ۳- نمای ریزبینی از بافت قلب یک موش صحرایی از گروه تیمار با ایزوپروترنول: تغییرات دژنراتیو و نکروز تارهای عضلانی قلب، ارتشاح سلول‌های آماسی، نشت گلبول‌های قرمز خون و ادم بینابینی مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشتنمایی ۱۰۰×).



شکل ۴- نمای ریزبینی از بافت قلب یک موش صحرایی از گروه تیمار با ایزوپروترنول به‌علاوه رزوراترول: ادم بینابینی و واکوئولاسیون میوسیت‌ها قابل مشاهده است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشتنمایی ۴۰×).

بحث و نتیجه‌گیری

ایسکمی ناشی از ایزوپروترنول در حیوانات آزمایشگاهی نیز همانند انسان می‌تواند به اختلالات متابولیک و مورفولوژیک متعددی منجر شود (Karthick *et al.*, 2006). در مطالعه حاضر، متعاقب تیمار با ایزوپروترنول، وزن قلب به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد در حالی که تغییری در وزن بدن حاصل نشد. افزایش مشاهده شده در وزن بدن ممکن است مربوط به تغییرات ادماتوز و آماسی در فضاهای میان‌بافتی عضله قلب باشد (Upaganlawar *et al.*, 2009).

مشخص شده است که یک درصد افزایش در محتوای مایعات میان‌بافتی قلب می‌تواند منجر به کاهش ده درصدی عملکرد عضله قلب شود (Laine and Allen, 1991). درمان با رزوراترول مانع از افزایش وزن قلب ناشی از ایزوپروترنول شد که این می‌تواند به‌دلیل کاهش تغییرات آماسی و ادم در بافت قلب باشد و حاکی از آن است که رزوراترول عضله قلب را در برابر ایسکمی محافظت می‌کند.

تارهای عضلانی قلب دارای آنزیم‌های شاخصی همچون لاکتات دهیدروژناز و کراتین کیناز-MB هستند. در مطالعه حاضر ایزوپروترنول باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های مذکور شد. در هر صورت، درمان با رزوراترول به‌طور معنی‌داری مانع از افزایش این آنزیم‌ها در اثر ایزوپروترنول شد که نشان می‌دهد رزوراترول آسیب عضله قلب ناشی از ایزوپروترنول را کاهش می‌دهد.

مطالعات قبلی نشان داده است که، ایزوپروترنول باعث استرس اکسیداتیو شدید در عضله قلب موش‌های صحرایی می‌شود (Rathore *et al*., 1998). در این راستا، افزایش گونه‌های فعال اکسیژن یا تخلیه آنتی-اکسیدان‌ها ممکن است باعث القاء استرس اکسیداتیو و به موجب آن افارکتوس میوکارد گردد (Sawyer *et al*., 2002). آنزیم‌های پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز با پاکسازی رادیکال‌های اکسیژن مانند یون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و ممانعت از تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل، سیستم تدافعی اصلی علیه استرس اکسیداتیو هستند (Sawyer *et al*., 2002). در مطالعات پیشین، اثرات آنتی‌اکسیدانی رزوراترول نشان داده شده است (Su *et al*., 2006; Collodel *et al*., 2011). در این رابطه، در بررسی حاضر، مشخص شد که کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در موش‌های تیمار شده با ایزوپروترنول به‌طور معنی‌داری توسط رزوراترول افزایش یافت. در مطالعات انجام شده توسط Mokni و همکاران در سال ۲۰۱۳ نیز اثرات محافظتی رزوراترول بر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی قلب از طریق تعدیل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به اثبات رسیده است (Mokni *et al*., 2013). این نتایج نشان می‌دهد که رزوراترول می‌تواند سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی میوکارد را علیه استرس اکسیداتیو تقویت کند. همچنین، نشان داده شده است که پراکسیداسیون لیپیدی با شدت آسیب غشاهای سلولی تارهای عضلانی قلب و غیرفعال شدن آنزیم‌ها در ارتباط می‌باشد (Karthikeyan *et al*., 2007). مالون‌دی‌آلدئید محصول نهایی پراکسیداسیون چربی بوده و افزایش آن ممکن است در اثر تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها باشد (Zhou *et al*., 2006). در مطالعات پیشین، ادعا شده است که انفارکتوس قلبی در اثر ایزوپروترنول در اثر پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از رادیکال‌ها، اتفاق می‌فتد (Zhou *et al*., 2006).

در این مطالعه، رزوراترول مقادیر افزایش یافته مالون-دی‌آلدئید ناشی از ایزوپروترنول را کاهش داد. کاهش مقادیر مالون‌دی‌آلدئید در قلب بعد از درمان با رزوراترول ممکن است در اثر افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز باشد. امکان دارد که رادیکال‌های آزاد القاء شده توسط ایزوپروترنول، به‌طور موثر توسط این آنزیم‌ها پاکسازی

شده باشد که این خود اثرات محافظتی رزوراترول را در آسیب ایسکمیک میوکارد ناشی از ایزوپروترنول را می‌رساند.

در بررسی حاضر، بافت عضله قلب موش‌های تیمار شده با ایزوپروترنول تغییرات پاتولوژیک گسترده‌ای از جمله نکروز کادیومیوسیت‌ها، ادم بینابینی، خونریزی و ارتشاح لکوسیت‌ها را نشان داد که حاکی از آسیب شدید میوکارد می‌باشد. در هر صورت، رزوراترول به‌طور قابل توجهی از آسیب عضله قلب ناشی از ایزوپروترنول جلوگیری کرد. این یافته‌ها اثرات محافظت از قلبی رزوراترول را بیشتر مورد تایید قرار می‌دهد.

با توجه به مجموعه فوق‌الذّکر، رزوراترول با استفاده از خواص آنتی‌اکسیدانی خود، عضله قلب موش صحرایی را در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از اثرات ایسکمیک ایزوپروترنول محافظت می‌کند. بنابراین، پس از انجام کارآزمایی‌های شاهدار اتفاقی و حصول نتایج مثبت، رزوراترول می‌تواند در پیشگیری از آسیب‌های اکسیداتیو میوکارد ناشی از ایسکمی در بیماران دچار انفارکتوس قلبی توصیه و به عنوان یک منبع قابل دسترس با خاصیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور هم‌زمان با سایر داروها مورد استفاده قرار گیرد.

این‌که آیا رزوراترول باعث کاهش اثرات درمانی سایر داروهای مصرفی در موارد انفارکتوس قلبی می‌شود یا خیر، در این مطالعه نامشخص مانده و امکان مقایسه تاثیر این ماده با سایر ترکیبات در مواردی که دچار سکته قلبی هستند، فراهم نشده است. هم‌چنین چگونگی تاثیر دزهای مختلف رزوراترول ، مکان و مکانیسم یا مکانیسم‌های مولکولی و سلولی مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن ناشناخته مانده و نیاز به مطالعات آتی و گسترده‌تری دارد.

سپاسگزاری

این مقاله از طرح تحقیقاتی که با بودجه پژوهشی و حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به انجام رسیده است، استخراج شده است. بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Buttros, J.B., Bergamaschi, C.T., Ribeiro, D.A., Fracalossi, A.C. and Campos, R.R. (2009). Cardioprotective actions of ascorbic acid during isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. Pharmacology, 84: 29-37.
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity In: Boca Raton FL, editor. CRC Handbook of methods for oxygen radical research. Florida: CRC Press, Boca Raton, pp: 283-284.
- Collodel, G., Federicoa M.G., Gerniniania M., Martini S. and Bonechi E. (2011). Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. Reproductive Toxicology, 31: 239-246.

- Fraga, C.G., Leibovitz, B.E. and Tappel, A.L. (1988). Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. Free Radic Biology and Medicine, 4(3): 155-161.
- Jeandet, P., Bessis R. and Gautheron B. (1991). The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. American Journal of Enology and Viticulture, 42: 41-46.
- Karthick, M. and Stanely Mainzen Prince, P. (2006). Preventive effect of rutin, a bioflavonoid, on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 58:701-707.
- Karthikeyan, K., Bai B.R. and Devaraj, S.N. (2007). Cardioprotective effect of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. International Journal of Cardiology, 115: 326-333.
- Laine, G.A. and Allen, S.J. (1991). Left ventricular myocardial edema. Lymph flow, interstitial fibrosis, and cardiac function. Circulation Research, 68: 1713-1721.
- Levy, R.I. and Feinleib, M. (1984). Heart disease. In: Brawnwald E, editor. Text book of Cardiovascular Medicine. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., pp: 1205-1234.
- Li, L., Zhang, L.K., Pang, Y.Z., Pan, C.S., Qi, Y.F., Chen, L., *et al*. (2006). Cardioprotective effects of ghrelin and des-octanoyl ghrelin on myocardial illJury induced by isoproterenol in rats. Acta Pharmacologica Sinica, 27(5): 527-535.
- Lopez, A.D. and Murray, C.C. (1998). The global burden of disease, 1990–2020. Natural Medicine, 4: 1241-1243.
- Mokni, M., Hamlaoui, S., Karkouch, I., Amri, M., Marzouki, L., Limam, F., *et al*. (2013). Resveratrol Provides Cardioprotection after Ischemia/reperfusion Injury via Modulation of Antioxidant Enzyme Activities. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 12 (4): 867-875.
- Nandave, M., Ojha, S.K., Joshi, S., Kurnari, S. and Arya D.S. (2007). Cardioprotective Effect of Bacopa monneira Against Isoproterenol-Induced Myocardial Necrosis in Rats. International Journal of Pharmacology, 3(5): 385-392.
- Nishikimi, M., Appaji, N. and Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochemical and Biophysical Research Communications, 46(2): 849-854.
- Oktem, G., Uysal, A., Oral, O., Sezer, E.D. and Olukman M. (2010). Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cellular damage by modulating nitric oxide and apoptosis. Experimental and Toxicologic Pathology, 64: 471-479.
- Peer, P.A., Trivedi, P.C., Nigade, P.B., Ghaisas, M.M. and Deshpande, A.D. (2008). Cardioprotective effect of Azadirachtaindica A. Juss on isoprenaline induced myocardial infarction in rats. International Journal of Cardiology, 126: 123-126.
- Petrich, E.R., Schanne, O.F. and Zumino, A.P. (1996). Electrophsiological responses to ischemia and reperfusion. In: Karmazyn M Basel, editor. Myocardial ischemia: mechanism, reperfusion, protection. Birkhauser Verlag, pp: 115-133.
- Rajadurai, M. and Prince, P.S.M. (2006). Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: Biochemical and histopathological evidences. Toxicology, 228: 259-268.
- Rathore, N., John, S., Kale, M. and Bhatnagar, D. (1998). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues. Pharmacological Research, 38: 297-303.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. and Hoekstra, W.G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science, 179(73): 588-590.
- Sawyer, D.B., Siwik, D.A., Xiao, L., Pimentel, D.R., Singh, K. and Colucci, W.S. (2002). Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 34: 379-388.

- Shingai, Y., Fujimoto, A., Nakamura, M. and Masuda, T. (2011). Structure and function of the oxidation products of polyphenols and identification of potent lipoxygenase inhibitors from fe-catalyzed oxidation of resveratrol. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59: 8180-8186.
- Su, H.C., Hung L.M. and Chen, J.K. (2006). Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 290: E1339-E1346.
- Suchalatha, S. and Shyamala, D.C.S. (2004). Protective effect of Terminaliachebula against experimental myocardial injury induced by isoproterenol. Indian Journal of Experimental Biology, 42: 174-178.
- Uguralp, S., Usta U. and Mizrak, B. (2005). Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. European Journal of Pediatric Surgery, 15: 333-336.
- Upaganlawar, A., Gandhi, C. and Balaraman, R. (2009). Effect of green tea and vitamin E combination in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. Plant Foods for Human Nutrition, 64: 75-80.
- Yulug, E., Tured, S., Alver, A., Kutlu, O., Karaguzel, E. and Kahraman C. (2013). Effects of Resveratrol on Testis Damage in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. Journal of Animal and Veterinary Advances, 12(6): 747-753.
- Zhou, B., Wu, L.J., Li, L.H., Tashiro, S., Onodera, S., Uchiumi F., *et al*. (2006). Silibinin protects against isoproterenol-induced rat cardiac myocyte injury through mitochondrial pathway after up-regulation of SIRT1. Journal of Pharmacological Sciences, 102: 387-395.
- Zhou, R., Xu, Q., Zheng, P., Yan, L., Zheng, J. and Dai, G. (2008). Cardioprotective effect of fluvastatin on isoproterenol-induced myocardial infarction in rat. European Journal of Pharmacology, 586: 244-250.