مقاله پژوهشی

بررسی اثر میریستین بر عملکرد انقباضی آئورت سینه‌ای در موش صحرایی دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین

دکتر محمد رضا رجبی[1]، دکتر مهرداد روغنی[2*]، دکتر زینب ادب[3]

۱ استادیار، متخصص قلب و عروق، گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲ استاد – Ph.D فیزیولوژی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳ پزشک عمومی، دانش‌آموخته دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

نشانی نویسنده مسؤول: دکتر مهرداد روغنی، استاد مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

E-mail: mehjour@yahoo.com

وصول:۹۳/۳/۲۵ ، اصلاح:۹۳/۴/۱۳، پذیرش:۹۳/۶/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: بیماری دیابت قندی با گذشت زمان با افزایش وقوع بیماری‌های قلبی- عروقی همراه است. باتوجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئید میریستین، هدف تحقیق حاضر بررسی اثر تجویز این ماده بر پاسخ انقباضی و رفع انقباضی آئورت سینه‌ای ایزوله در مدل تجربی دیابت قندی و تعیین نقش استرس اکسیداتیو در موش صحرائی بود.

موادّ و روش‌ها: دراین مطالعه‌ی تجربی، موش‌های صحراییِ نر به چهار گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با میریستین (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، دیابتی و دیابتی تحت تیمار با میریستین (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم‌شدند. میریستین ۱۰ روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین به‌مدت ۳ هفته (داخل صفاقی) و روزانه تجویزشد. درانتها، پاسخ انقباضی حلقه‌های آئورت سینه‌ای به کلرور پتاسیم و فنیل‌افرین و شل‌شدگی به استیل کولین با استفاده از بساط بافت ایزوله مورد سنجش‌قرارگرفت و میزان مالون دی آلدئید (MDA) و نیتریت در بافت آئورت تعیین‌شد.

یافته‌ها: حداکثر پاسخ انقباضی آئورت سینه‌ای در گروه دیابتی تحت تیمار با میریستین به کلرور پتاسیم به‌طور غیر معنادار و به فنیل‌افرین به‌طور معنادار ($p<۰/۰۵$) کمتر از گروه دیابتی بود. به‌علاوه، حداکثر پاسخ شل‌شدگی حلقه‌های آئورتی به استیل کولین در گروه دیابتی تحت تیمار با میریستین در مقایسه با گروه دیابتی بیشتر و معنادار بود ($p<۰/۰۵$). در ضمن، حداکثر پاسخ انقباضی به فنیل‌افرین در گروه کنترل تحت تیمار با میریستین به‌طور معنادار کمتر از گروه کنترل بود ($p<۰/۰۵$) و حداکثر پاسخ شل‌شدگی در گروه کنترل تحت تیمار با میریستین به‌طور معنادار بیشتر از گروه کنترل بود ($p<۰/۰۵$). همچنین، کاهش معنادار مالون دی آلدئید و نیتریت ($p<۰/۰۵$) در گروه دیابتی تحت تیمار مشاهده‌شد.

نتیجه‌گیری: تجویز میریستین موجب کاهش پاسخ انقباضی به فنیل افرین و افزایش پاسخ شل شدگی در بافت آئورت موش صحرائی دیابتی می‌گردد که این امر در جلوگیری از برخی عوارض عروقی دیابت در دراز مدت می‌تواند سودمند باشد و بخشی از اثرات سودمند آن از طریق کاهش استرس اکسیداتیو انجام‌می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *میریستین، دیابت قندی، آئورت، انقباض، پاسخ رفع انقباض، استرس اکسیداتیو.*

مقدمه

دیابت قندی ازنظر بالینی، یکی از مهمترین عوامل خطر برای برخی عوارض نظیر نفروپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی و بیماری‌های قلبی ـ عروقی محسوب‌می‌شود که براساس پیش‌بینی به‌عمل‌آمده، شیوع آن در جامعه‌ی انسانی درآینده افزایش‌خواهدیافت(۱). کمبود و یا کاهش نسبی میزان انسولین در این بیماری با عوارض متابولیکی حادّ و مزمن همراه‌می‌باشد (۲). در بیماری دیابت قندی، عوامل مختلفی ازقبیل افزایش تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌علت افزایش سطح گلوکز خون و تشدید پراکسیداسیون لیپیدی موجب افزایش بروز آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی- عروقی می‌گردد. درهمین ارتباط، نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که پاسخ انقباضی برخی نواحی عروقی شامل آئورت سینه‌ای به نورآدرنالین و کلرور پتاسیم در موش‌های صحرایی دیابتی‌شده توسط استرپتوزوتوسین به‌طور معناداری نسبت به حیوانات سالم افزایش‌می‌یابد که در این افزایش، پاسخ انقباضی عروق، عوامل گوناگون ازجمله تشدید تولید اندوتلین به‌عنوان یک منقبض‌کننده‌ی قوی عضلات صاف عروق، افزایش سنتز و ترشح برخی از پروستاگلاندین‌های تنگ‌کننده‌ی عروقی، افزایش غلظت داخل سلولی دی آسیل گلیسرول و افزایش متعاقب کلسیم داخل سلولی به‌عنوان عامل محرک انقباض در عضله‌ی صاف عروقی و کاهش توانایی تولید فاکتورهای گشادکننده‌ی عروقی با منشأ اندوتلیال نظیر نیتریک اکسید می‌تواند مطرح باشد. همچنین پاسخ اتساعی سیستم عروقی دارای آندوتلیوم شامل آئورت در موش‌های صحرایی دیابتی به استیل کولین به‌طور محسوس کمتر از موش‌های صحرایی سالم می‌باشد (۴،۳). هدف اصلی که از روش‌های درمان دیابت قندی تعقیب می‌شود، برقراری میزان طبیعی قند خون و جلوگیری و یا به‌تعویق انداختن ظهور عوارض آن می‌باشد (۵). ازدیرباز، گیاهان داروبی و مشتقات حاصل از آنها به‌علت عوارض جانبی کمتر از جایگاه ویژه‌ای در علم پزشکی برای تیمار بیماری‌های رایج بشری به‌ویژه امراض با ماهیّت متابولیک نظیر دیابت قندی برخورداربوده‌اند (۶). همچنین، درطی سالیان اخیر، هدف بسیاری از تحقیقات، بررسی اثر بخشی مواد طبیعی باخاصیت هیپوگلیسمیک بر روی عوارض بافتی و ارگانیک ناشی از دیابت بوده‌است (۷،۶). دراین رابطه، برای میریستین و اثرات سودمند آن در بیماری‌های مختلف شواهد متعددی یافته‌می‌شود. میریستین یک فلاونول درگروه فلاونوئیدها می‌باشد که به مقدار زیاد در انگور، گیلاس، آلبالو، گردو و برخی سبزی‌ها پیدامی‌شود. این ماده، دارای خاصیّت آنتی-اکسیدانی و جمع‌کنندگی رادیکال‌های آزاد اکسیژن بوده و متابولیسم چربی‌ها را به‌نحو مطلوب درجهت کاهش وقوع بیماری‌ها تغییرمی‌دهد. درهمین ارتباط تجویز این ماده درجهت کاهش کلسترول LDL و افزایش HDL سرم عمل می‌نماید و از تجمع چربی‌ها در جداره‌ی عروق تا حدّ زیادی جلوگیری‌می‌نماید(۷). به‌علاوه، اثرات ضد دیابتی تجویز این ماده در موش‌های دیابتی‌شده توسط استرپتوزوتوسین مورد تائید قرارگرفته‌است (۹،۸). همچنین، مشخص‌شده که مصرف درازمدت آن دارای خاصیّت شل‌کنندگی سیستم عروقی می‌باشد(۱۰). باتوجه به نقش مهم استرس اکسیداتیو در بروز عوارض عروقی ناشی از دیابت و بروز تغییرات عملکردی در سیستم عروقی در این بیماری به‌صورت تشدید پاسخ انقباضی و کاهش پاسخ شل‌شدگی(۱)، در بررسی حاضر اثر تجویز مزمن این ماده بر پاسخ انقباضی و شل‌شدگی آئورت سینه‌ای موش صحراییِ نر مورد بررسی‌قرارگرفت و نقش استرس اکسیداتیو در این رابطه تعیین‌شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، از ۳۲ سر موش صحراییِ نر سفید نژاد ویستار (انستیتو پاستور، تهران) در محدوده‌ی وزنی ۲۳۰-۳۱۰ گرم استفاده‌شد که این محدوده‌ی وزن در برخی مطالعات قبلی در مورد اثربخشی مواد طبیعی بر

آئورت سینه‌ای درحالت دیابت وجوددارد (۱۱). تمام حیوان‌ها در دمای ۲٤– ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد در گروه-های ۳ تا ٤ تایی در هر قفس قرارداده‌شدند. حیوان‌ها، آزادانه به آب لوله‌کشی و غذای مخصوص موش دسترسی داشتند. درضمن، این بررسی براساس پروتکل‌ها و دستورالعمل‌های توصیه‌شده توسط انستیتوی ملی بهداشت آمریکا (NIH) برای نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی به‌انجام‌رسید. برای بررسی از موش‌های صحرایی استفاده‌شد که درشرایط طبیعی، میزان گلوکز سرم آنها کمتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی لیتر بود. دراین خصوص، برای خون‌گیری از شبکه‌ی رترواوربیتال و لوله‌ی موئینه تحت بیهوشی ملایم با اتر استفاده‌شد. حجم خون اخذشده از هر حیوان نیز حدود ۱ میلی‌لیتر بود. موش‌ها به‌طورتصادفی (الگوی تصادفی ساده)، به ٤ گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با میریستین (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم؛ سیگما، آمریکا)، دیابتی و دیابتی تحت تیمار با میریستین (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم‌شدند. میریستین از روز دهم پس از تزریق استرپتوزوتوسین {پس ازحصول اطمینان از دیابتی‌بودن حیوانات با چک‌کردن وجود قند در ادرار به‌روش نوار ادراری (شرکت گلوکو یاب، تهران)} به‌مدت ۳ هفته و روزانه به میزان ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم (داخل صفاقی) تجویزشد. دوز میریستین نیز براساس رفرانس قبلی در مورد اثربخشی میریستین بر کاهش مقاومت به انسولین القاشده با رژیم غذایی حاوی مقدار زیاد از فروکتوز (۱۲) انتخاب‌گردید. برای دیابتی نمودن موش‌ها، از داروی استرپتوزوتوسین (سیگما، آمریکا) به-صورت تک دوز و داخل صفاقی به میزان ٦۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم حل‌شده در محلول نرمال سالین سرد استفاده‌شد. در روزهای بعد، علائم بارز دیابت قندی نظیر پرخوری، پرنوشی، پرادراری، و کاهش وزن به‌وضوح در برخی موش‌ها دیده‌شد. اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم توسط روش آنزیمی گلوکز اکسیداز (شرکت زیست شیمی، تهران) قبل از انجام کار و در پایان هفته‌های ۲ و ٤ با استفاده از اسپکتروفتومتر(Spectronic 20, USA) انجام-شد.

اندازه‌گیری پاسخ انقباضی و رفع انقباضی آئورت سینه‌ای

در پایان کار، موش‌ها با استفاده از اتر بیهوش‌شده، با بازکردن قفسه‌ی سینه، آئورت سینه‌ای را جدا کرده‌اند و در داخل محلول کربس (Krebs) که به‌طور مداوم به‌داخل آن گاز کربوژن دمیده‌می‌شد، قرارداده‌شد. ترکیب شیمیایی محلول کربس مورداستفاده درتمام آزمایش‌ها به قرار ذیل بود (برحسب میلی مولار):

NaCl: 5/118; KCl: 74/4; CaCl2: 2/5; MgSO4: 18/1; NaHCO3: 9/24; KH2PO4: 18/1; Glucose: 10

در داخل محلول کربس سرد (به‌منظور کاهش‌دادن متابولیسم بافت و کاهش مرگ و میر سلولی)، آئورت به-دقت از بافت پیوندی اطراف، پاک و سپس به حلقه‌هایی به‌طول حدوداً ٤ میلیمتر تقسیم‌گردید. برای حصول اطمینان از سلامت آندوتلیوم، پس از ایجاد انقباض با غلظت 10^{-6} مولار فنیل افرین، استیل کولین با غلظت 10^{-5} مولار به حمام بافت اضافه‌شد. مشاهده‌ی پاسخ شل‌شدگی بیشتر از ۳۰٪ در حلقه‌های آئورت به‌عنوان ملاک سالم-بودن اندوتلیوم درنظرگرفته‌شد. برای ثبت پاسخ‌گویی حلقه‌های آئورتی، آنها به کمک سیم‌های پلاتینی L شکل که به‌موازات هم قرارگرفته‌اند، از یک طرف به قلاب فلزی و از طرف دیگر به ترانس دیوسر ایزومتریک F-60 (Narco Biosystems, USA) متصل‌گردیدند. دراین بررسی، کشش استراحتی اعمال‌شده به حلقه‌های آئورتی ۱/۵ گرم بود. پس از اعمال این کشش، ٦۰ تا ۹۰ دقیقه به بافت اجازه‌داده‌شد تا وضعیت ثابت پیداکند. محلول کربس داخل حمام بافت هم هر۳۰ دقیقه تعویض می‌شد. پس ازحصول حالت تعادل، سلامت بافت در ابتدا با استفاده از غلظت‌های افزایش‌یابنده‌ی کلرور پتاسیم (۱۰ تا ۵۰ میلی مولار) جهت اطمینان از سلامت و تمامیّت بافت، بررسی‌شد، اما در ادامه، بافت‌های با پاسخ انقباضی ضعیف (کمتر از ۰/۲ گرم) در غلظت ۵۰ میلی مولار کلرور پتاسیم بررسی‌نشدند. سپس، حلقه ها در معرض

غلظت‌های افزایش‌یابنده‌ی فنیل افرین (10^{-9} تا 10^{-5} مولار) قرارگرفت. برای ثبت پاسخ رفع انقباضی، درحالی که آندوتلیوم آئورت دست نخورده بود، برای ایجاد یک پیش انقباض در حلقه‌های آئورتی، فنیل افرین با غلظت 10^{-5} مولار استفاده‌شد. غلظت مذکور، انقباضی کمتر از میزان حداکثر در بافت به‌وجودآورد. پس از رسیدن پاسخ انقباضی آئورتِ دارای آندوتلیوم به کفه، استیل کولین به‌روش تجمعی از غلظت 10^{-9} تا 10^{-4} مولار به حمامِ بافت، اضافه و منحنی Log غلظت استیل کولین-درصدپاسخ اتساعی آئورت رسم‌شد. درتمامی بررسی‌های عروقی، میزان تولید نیرو به‌صورت گرم به ازای واحد سطح بافت و میزان رفع انقباض به‌صورت درصدی از حداکثر انقباض مشاهده‌شده در حضور فنیل افرین گزارش‌شد. برای ثبت و آنالیز داده‌ها نیز از نرم افزار فیزیوگراف نسخه ۱ (شرکت بهینه آرمان، تهران) استفاده‌گردید.

سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA)

پس از تهیه‌ی هموژنه بافت آئورت در نرمال سالین (۵٪)، اندازه‌گیری سطح مالون دی‌آلدئید (MDA) با استفاده از کیت (سیگما، آمریکا) بر پایه‌ی روشی بود که اساس آن واکنش تیوباربیتوریک اسید (TBA) بود که در آب جوش انجام‌گرفت که روش کار آن قبلاً بیان شده‌است (۱۱). برای محلول استاندارد نیز از رقت‌های مختلف تترااتوکسی پروپان استفاده‌گردید.

سنجش غلظت نیتریت

سنجش غلظت نیتریت بافت آئورت براساس واکنش گریس و دستورالعمل کیت (سیگما، آمریکا) و روش کار مطالعه‌ی قبلی انجام‌گرفت (۱۱). محلول استاندارد هم رقت‌های مختلف نیتریت سدیم بود.

آنالیز آماری

ازنظر آماری، تمامی نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان‌گردید. پس از تائید نرمال‌بودن توزیع داده‌ها، برای مقایسه‌ی نتایج هر پارامتر در هر یک از گروه‌ها قبل و بعد از بررسی از آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌گیری مکرر (در مورد وزن حیوان و میزان گلوکز سرم) و برای مقایسه‌ی گروه‌های باهم درهر یک از دوره‌های زمانی یا غلظت‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده‌گردید. برای آنالیز آماری داده‌ها نیز از برنامه‌ی آماری Sigma Stat نسخه ۳/۵ (۲۰۰۶) استفاده‌شد. به‌علاوه سطح معنادار، $p<0/05$ برای تمامی آنالیزها در نظرگرفته‌شد.

یافته‌ها

نتایج اندازه‌گیری وزن نشان‌داد که گروه دیابتی در هفته‌ی چهارم، یک کاهش معنادار ($p<0/01$) در مقایسه با هفته‌ی قبل کار دارد. همچنین، در هفته‌ی دوم نیز این کاهش وجودداشت، ولی تفاوت موجود به سطح معنادار نرسید ($p=0/12$). از طرف دیگر، تفاوت موجود بین دو گروه دیابتی و دیابتی تحت تیمار با میریستین در هفته‌های دوم ($p=0/07$) و چهارم ($p=0/34$) در حد معنادار نبود. هر چند کاهش معنادار وزن درحدّ کمتر در گروه دیابتی تحت تیمار وجودداشت ($p<0/05$). درضمن، تیمار گروه کنترل با میریستین در هفته‌های دوم ($p=0/31$) و چهارم ($p=0/38$) تغییر معنادار درمقایسه با گروه کنترل ایجادننمود (نمودار ۱).

ازنظر گلوکز سرم، این پارامتر در هفته‌های دوم و چهارم در دو گروه دیابتی و دیابتی تحت تیمار با میریستین به‌طور بارز و معنادار (به‌ترتیب $p<0/0005$ و $p<0/005$) بیشتر از نتایج هفته‌ی قبل کار بود و در گروه کنترل تحت تیمار با میریستین نیز این افزایش در هفته‌ی چهارم درحدّ کم و به‌طور معنادار ($p<0/05$) دیده‌شد. به‌علاوه، تیمار با میریستین در گروه دیابتی در همین دوره‌ی زمانی کاهش معنادار در میزان گلوکز سرم در موش‌های صحرایی در مقایسه با گروه دیابتی تیمارنشده به‌وجودآورد ($p<0/01$) (نمودار ۲).

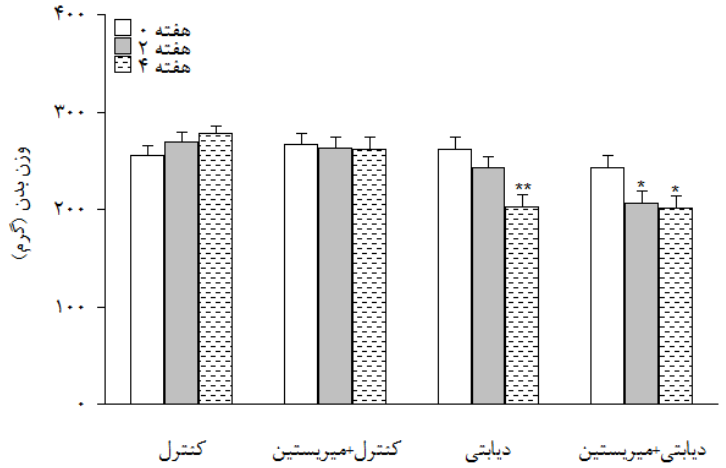
پاسخ انقباضی آئورت سینه‌ای به کلرور پتاسیم

نمودار ۳، پاسخ انقباضی حلقه‌های دارای اندوتلیوم را به غلظت‌های افزایش‌یابنده‌ی کلرور پتاسیم در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. دراین رابطه، پاسخ انقباضی آئورت سینه‌ای به کلرور پتاسیم در مورد این گروه‌ها از یک طرح وابسته به غلظت پیروی‌نمود. گروه دیابتی، یک افزایشِ غیرِ معنادارِ حداکثرِ پاسخ‌گویی حلقه‌های آئورتی به کلرور پتاسیم در مقایسه با گروه کنترل نشان‌داد (p=۰/۱۵). بعلاوه، گروه کنترل تیمارشده با میریستین در غلظت ۵۰ میلی مولار، یک پاسخ انقباضی کمتر در مقایسه با گروه کنترل نشان‌داد که ازنظر آماری در مقایسه با گروه کنترل معنادار بود (p<۰/۰۵). همچنین گروه دیابتی تیمارشده با میریستین نیز در مقایسه با گروه

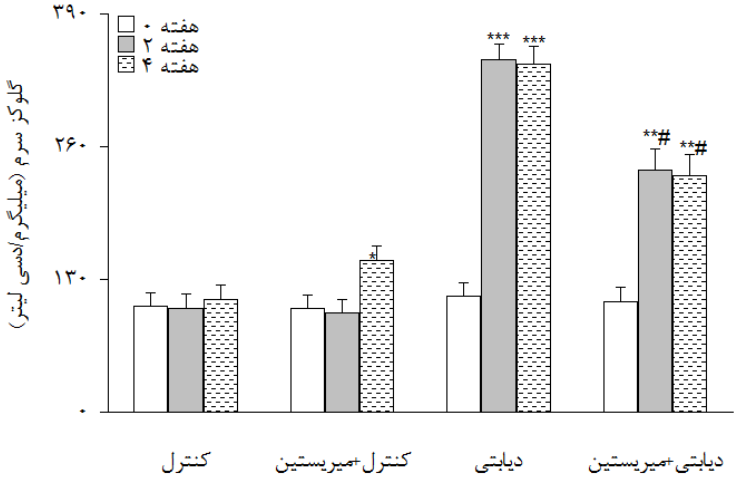
جدول ۱: نتایج مربوط به اندازه‌گیری سطح مالون دی آلدئید و نیتریت در بافت آئورت گروه های مختلف

گروه	مالون دی آلدئید ($\mu mol.g^{-1}$ protein)	نیتریت ($nmol.mg^{-1}$protein)
کنترل (n=6)	٤/٨ ± ۰/٥	١٨/٣ ± ٢/٤
کنترل+میریستین(n=5)	٥/١ ± ۰/٤	١٦/١ ± ٣/٢
دیابتی (n=5)	٧/١ ± ۰/٨*	٣٠/٨± ٣/٥*
دیابتی+میریستین (n=6)	٥/٣ ± ۰/٥#	٢١/٧ ± ٢/٩#

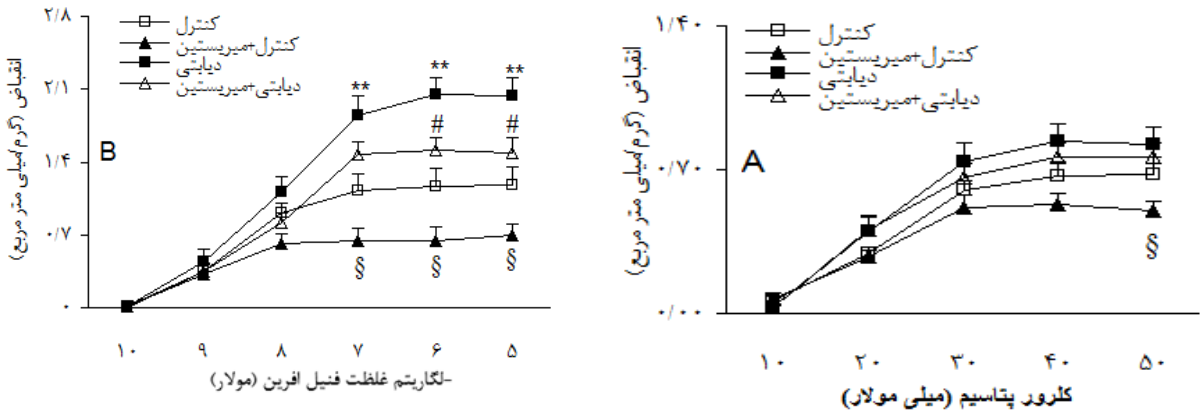
*p<۰/۰۵ (درمقایسه باگروه کنترل)، #p<۰/۰۵ (درمقایسه با گروه دیابتی)



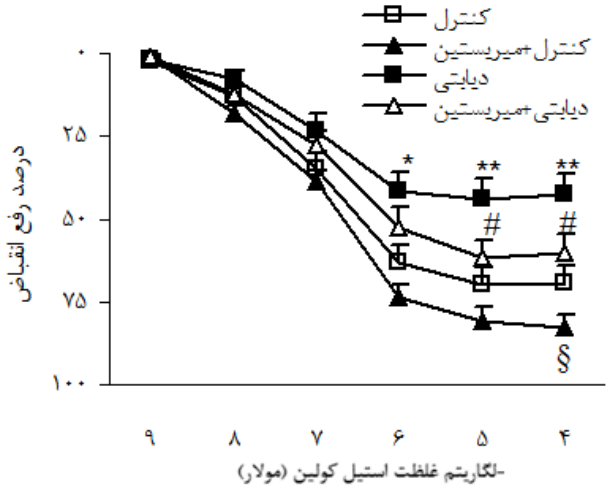
نمودار ۱: تغییرات وزن در هفته‌های مختلف در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با میریستین * p<۰/۰۵، ** p<۰/۰۱ (در مقایسه با هفته‌ی قبل کار در همان گروه)



نمودار۲: تغییرات گلوکز سرم در هفته‌های مختلف در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمارشده با میریستین. * p<۰/۰۵، ** p<۰/۰۰۵، *** p<۰/۰۰۰۵ (در مقایسه با سطح پایه در همان گروه)، # p<۰/۰۱ (در مقایسه با گروه دیابتی در همان هفته)



نمودار ۳: پاسخ انقباضی حلقه‌های آئورت سینه‌ای دارای اندوتلیوم به کلرور پتاسیم (A) و فنیل افرین (B) درگروه‌های مختلف §p<۰/۰۵ (درمقایسه باگروه کنترل)، **p<۰/۰۱ (درمقایسه باگروه کنترل) و#p<۰/۰۵ (درمقایسه باگروه دیابتی)



نمودار ٤: پاسخ رفع انقباضی حلقه‌های آئورت سینه‌ای دارای اندوتلیوم به استیل کولین درگروه های مختلف. *p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱ (درمقایسه باگروه کنترل)، #p<۰/۰۵ (درمقابسه با گروه دیابتی)، §p<۰/۰۵ (درمقایسه باگروه کنترل)

دیابتی پاسخ انقباضی کمتر نشان‌داد، اما از نظر آماری معنادار نبود (p=۰/۱۱).

پاسخ انقباضی آئورت سینه‌ای به فنیل افرین

پاسخ انقباضی آئورت سینه‌ای به فنیل افرین در گروه‌های مختلف (نمودار ۳) نشان‌دهندی یک الگوی وابسته به غلظت (از غلظت $۱۰^{-۹}$ مولار تا $۱۰^{-۵}$ مولار) بود. پاسخ انقباضی به فنیل افرین در گروه دیابتی از غلظت $۱۰^{-۷}$ مولار به بعد در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداراشت (p<۰/۰۱). همچنین در گروه دیابتی تحت تیمار با میریستین حداکثر پاسخ انقباضی به فنیل افرین در مقایسه با گروه دیابتی از غلظت $۱۰^{-٦}$ مولار کاهش‌یافته و این کاهش معنادار بود (p<۰/۰۵). در گروه کنترل تحت تیمار با میریستین نیز نسبت به گروه کنترل حداکثر پاسخ انقباضی از غلظت $۱۰^{-۷}$ مولار کاهش نشان‌داد که این کاهش از نظر آماری معنادار بود (p<۰/۰۵).

پاسخ رفع انقباضی آئورت سینه ای به استیل کولین

نمودار ٤، پاسخ رفع انقباضی حلقه‌های دارای اندوتلیوم را در گروه‌های مختلف نشان‌می‌دهد. در این رابطه، طرح پاسخ رفع انقباضی آئورت سینه‌ای به استیل کولین از یک الگوی وابسته به غلظت پیروی‌نمود (از غلظت $۱۰^{-۹}$ مولار تا $۱۰^{-٤}$ مولار). گروه دیابتی، یک کاهشِ پاسخِ رفعِ انقباضی به استیل کولین، نسبت به گروه

کنترل نشان‌داد که این کاهش از نظر آماری معنادار بود ($p<0/05$ در غلظت 10^{-6} مولار و $p<0/01$ از غلظت 10^{-5} مولار). همچنین دیده‌شد که در گروه دیابتی تحت تیمار با میریستین، حداکثر پاسخ رفع انقباضی به استیل کولین در مقایسه با گروه دیابتی از غلظت 10^{-5} مولار افزایش‌یافت که این افزایش معنادار بود ($p<0/05$). در گروه کنترل تحت تیمار با میریستین نیز نسبت به گروه کنترل پاسخ رفع انقباضی در غلظت 10^{-4} مولار افزایش نشان‌داد که این افزایش از نظر آماری معنادار بود ($p<0/05$).

نتایج استرس اکسیداتیو

در این خصوص، سطح مالون دی آلدئید و نیتریت در بافت آئورت تغییر معناداری نسبت به گروه کنترل نشان‌نداد ($p=0/09$)، ازطرف دیگر، بروز حالت دیابت پس از گذشت ۱ ماه موجب افزایش معنادار سطح مالون دی آلدئید و نیتریت در آئورت ($p<0/01$) گردید و تیمار با میریستین با دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب کاهش معنادار آن‌ها در گروه دیابتی تیمار شده‌گردید (جدول ۱) ($p<0/05$).

بحث

نتایج این مطالعه نشان‌داد که تجویز روزانه‌ی میریستین به میزان ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌مدت ۳ هفته در موش‌های صحرائی دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین، نتوانست از کاهش وزن این حیوانات جلوگیری‌کند. بااین وجود، دارای اثر آنتی هیپرگلیسمیکِ معنادار و حدّ متوسط بود و درمان موش‌های دیابتی با این ماده، موجب کاهش معنادار در حداکثر پاسخ انقباضی به فنیل افرین در مقایسه با گروه دیابتی درمان‌نشده‌می‌گردد. به‌علاوه، حداکثر پاسخ انقباضی نسبت به فنیل افرین در گروه کنترل تحت درمان با میریستین نیز در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنادار نشان‌داد. همچنین، تجویز ۳ هفته‌ای میریستین به موش‌های دیابتی‌شده، موجب افزایش معنادار حداکثر پاسخ شل‌شدگی آئورت به استیل کولین در مقایسه با گروه دیابتی گردید و این پاسخ در گروه کنترل تحت تیمار نیز یک افزایش معنادار در مقایسه با گروه کنترل نشان‌داد. گفتنی است بخشی از اثرات سودمند این ماده ازطریق کاهش استرس اکسیداتیو انجام‌می‌شود.

دیابت قندی ابتلا به بیماری‌های قلبی- عروقی ازقبیل آتروسکلروز و هیپرتانسیون و در نتیجه میزان مرگ و میر را افزایش‌می‌دهد. به‌نظرمی‌رسد مکانیسم‌های متفاوتی در ایجاد اختلال در ساختمان و عملکرد عروق خونی در دیابت دخالت داشته‌باشند که نهایتاً منجر به ایجاد این‌گونه عوارض می‌گردند. در افزایش پاسخ انقباضی عروق درحالت دیابت قندی، عوامل گوناگونی ازجمله: تشدید تولید اندوتلین به‌عنوان یک منقبض‌کننده‌ی قوی عضلات صاف عروق، افزایش سنتز و ترشح برخی از پروستاگلاندین‌های تنگ‌کننده‌ی عروقی، افزایش غلظت داخل سلولی دی‌آسیل‌گلیسرول و افزایش متعاقب کلسیم داخل سلولی به‌عنوان عامل محرک انقباض در عضله‌ی صاف عروقی و نیز کاهش توانایی تولید فاکتورهای گشادکننده‌ی عروقی با منشأ اندوتلیال نظیر نیتریک اکسید، می‌تواند مطرح‌باشد (۴،۳). همچنین، ظرفیّت آندوتلیوم عروق در سنتز سایر گشادکننده‌های عروقی نظیر پروستاسایکلین نیز کاهش‌می‌یابد. به‌علاوه، تحقیقات نشان‌داده‌اند که خود هیپرگلیسمی و تشدید استرس اکسیداتیو ناشی از آن نیز می‌تواند دلیل بروز این عوارض باشد (۳). از طرف دیگر، برخی مطالعات نشان‌داده‌اند که در دیابت قندی اختلال متابولیسم گلوکز و گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها نقش مهمی درایجاد برخی عوارض عروقی دیابت دارد (۴). به‌علاوه آن‌که در بیماران دیابتی تولید رادیکال‌های آزاد ازطریق اتواکسیداسیون گلوکز افزایش‌می‌یابد (۴). نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان‌داد که پاسخ انقباضی حلقه‌های آئورتی دارای آندوتلیوم به فنیل افرین در موش‌های صحرایی دیابتی به‌طور معناداری نسبت به حیوانات سالم (گروه کنترل) افزایشی یافته که این با نتایج مطالعه‌ی نصری و همکاران

در سال ۲۰۱۱ مطابقت داشت (۱۳).

همچنین، نتایج این مطالعه نشان‌داد که پاسخ اتساعی حلقه‌های آئورتی دارای آندوتلیوم موش‌های صحرایی دیابتی به استیل کولین، به‌طور معناداری کمتر از موش‌های صحرایی نر سالم می‌باشد. ازآنجا که پاسخ اتساعی عروق به استیل کولین وابسته به تولیدNO توسط آندوتلیوم است، لذا به نظرمی‌رسد که در آئورت موش صحرایی دیابتی تولید و دسترسی به NO کاهش یافته-باشد. به‌علاوه، در دیابت قندی، هیپرگلیسمی می‌تواند سبب تحریک تولید محصولات پیشرفته‌ی گلیکوزیله (AGEs), تحریک مسیر Polyol و افزایش تحریک پروتئین کیناز C گردد که تمام این عوامل خود می‌توانند منجر به افزایش استرس اکسیداتیو گردیده و با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) سبب غیر فعال‌شدن NO شوند. همچنین، غلظت بالای گلوکز سبب افزایش چشمگیر درسوپراکسید آندوتلیوم می‌گردد که طی واکنش با NO، پراکسی نیتریت تولید می‌کند که این محصول با اکسیده‌کردن تترا هیدروبیوپترین و تبدیل آن به دی هیدروبیوپترین می‌تواند در مسیر سنتز برخی مواد میانجی اختلال ایجادنماید. نیز، در دیابت قندی ظرفیّت آندوتلیوم عروق در سنتز گشادکننده‌های عروقی مانند پروستاسایکلین و NO کم‌می‌شود و تنگ‌کننده‌های عروقی مانند آندوتلین به مقدار زیادی تولید می‌شوند (۳،۱۳).

در بررسی حاضر مشخص‌گردید که تزریق داخل صفاقی میریستین پس از گذشت ۳ هفته می‌تواند موجب کاهش حداکثر پاسخ انقباضی حلقه‌های آئورتی به فنیل افرین و افزایش درصد رفع انقباض در حلقه‌های آئورتی دارای اندوتلیوم منقبض‌شده توسط غلظت ساب ماگزیمال فنیل افرین درمقایسه با موش‌های دیابتی در پاسخ به اضافه‌نمودن استیل کولین شود. درخصوص توجیه اثرات سودمند میریستین در این بررسی، نتایج مطالعه‌ی انجام-شده در سال ۲۰۰۵ نشان‌می‌دهد که اضافه‌نمودن مستقیم میریستین به حمام بافت ایزوله ازطریق مهارنمودن پمپ سدیم پتاسیم غشای سلول‌های عضلانی و فعال‌نمودن پروتئین کیناز C در بافت آئورت ایزوله شده‌ی موش صحرایی موجب القای پاسخ انقباضی وابسته به غلظت می‌گردد (۱۰) که این با نتایج مطالعه‌ی ما که در آن تجویز مزمن میریستین موجب کاهش پاسخ شل‌شدگی گردید، مغایرت‌دارد. بنابراین می‌توان ادعانمود که اثر سودمند میریستین در این بررسی حداقل ازطریق اثرگذاری بر پمپ‌های غشائی نظیر پمپ سدیم پتاسیم و یا ازطریق تغییر فعالیت پروتئین کیناز به انجام نرسیده‌است. در مغایرت با نتایج مطالعه‌ی ما، مطالعه‌ای که توسط فوزی و همکاران در سال ۲۰۰۳ بر روی میریستین و فعالیت کانال‌های کلسیمی L-type عضلات صاف عروق انجام-شد، مشخص‌کرد که اضافه‌نمودن میریستین به حمام بافتی موجب افزایش فعالیت کانال‌های کلسیمی L-type شده و ازاین طریق، موجب تشدید پاسخ انقباض عضلات صاف عروق هم گردیده‌است و داروهای مسدودکننده‌ی کانال های کلسیمی مثل وراپامیل (Verapamil) به‌طور کامل موجب رفع اثر انقباضی میریستین شده‌اند (١٤). مجدداً می توان ادعانمود که اثر سودمند میریستین در این مطالعه، حداقل ازطریق اثرگذاری بر این کانال‌ها نبوده‌است. زیرا در غیر این صورت در گروه کنترل و یا دیابتی تیمارشده با میریستین یک تشدید پاسخ انقباضی می بایست مشاهده-می‌شد که این‌طور نبود. بنابراین احتمال‌می‌رود که افزایش پاسخ گشادکنندگی و کاهش پاسخ انقباضی درحضور میریستین در این مطالعه تا حدودی با وساطت دو سیستم نیتریک اکسید و پروستاگلاندین‌ها به‌انجام رسیده‌باشد که البته این مطلب نیاز به بررسی بیشتر دارد. ناگفته‌نماند که نتایج یک مطالعه توسط روسکوتا و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان‌می‌دهد که میریستین در کوتاه‌مدت خود یک مهارکننده‌ی آنزیم سنتز کننده‌ی نیتریک اکسید می‌باشد، هر چند اثر درازمدت آن دراین خصوص مشخص-نگردیده‌است (۱۵). ازطرف دیگر، بخشی از تغییرات سودمند پاسخگویی عروقی دراین تحقیق، به‌دنبال تجویز

میریستین درحالت دیابت قندی را می‌توان به کاهش استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی و به‌همراه آن اعمال اثر آنتی‌هیپرگلیسمیک و هیپوگلیسمیک ازطرف این فلاونوئید نسبت‌داد که خود موجب کاهش بروز تغییرات عملکردی نامطلوب در دیواره‌ی آئورت سینه‌ای در موش-های دیابتی‌شده می‌گردد. در مطالعه‌ی ما، اثر هیپوگلیسمیک میریستین در حدّ متوسط در هفته‌های دوم و چهارم پس از تحقیق به‌خوبی مشاهده‌شد که این خود می‌تواند نهایتاً موجب کاهش پاسخ انقباضی به فنیل افرین و تشدید پاسخ رفع انقباضی به استیل کولین در موش‌های دیابتی‌شده باشد. در تأئید یافته‌های ما، نتایج مطالعه‌ی انجام‌شده توسط لیو و همکاران درسال ۲۰۰۵ نیز چنین اثر هیپوگلیسمیک را در مورد میریستین در موش‌های صحراییِ دیابتی‌شده توسط استرپتوزوتوسین نشان‌دادند که این اثر وابسته به دوز هم بود (۹). این محققان نشان‌دادند که میریستین ازطریق افزایش به کارگیری گلوکز و تشدید جذب آن در سلول‌های بدن که اثری مشابه هورمون متابولیک انسولین دارد، موجب کاهش بارز قند خون در موش‌های صحرایی دیابتی‌شده می‌گردد (۹). به‌علاوه، مشخص‌شده که میریستین قادراست حساسیّت بافتی به انسولین را افزایش‌دهد که این هم می‌تواند موجب کاهش قند خون در موش‌های دیابتی گردد (۹) هر چند مکانیسم اخیر در مطالعه‌ی ما به‌علت القاء دیابت نوع ۱ (که در آن بخش اعظم سلول‌های مترشحه‌ی انسولین ازبین‌می‌روند) رخ‌نداده‌است.

به‌طورخلاصه، در این مطالعه مشخص‌گردید که تجویز میریستین موجب کاهش پاسخ انقباضی به فنیل افرین و افزایش پاسخ شل‌شدگی در بافت آئورت موش صحرائی دیابتی می‌گردد که این درجلوگیری از برخی عوارض عروقی دیابت در درازمدت می‌تواند سودمند باشد و بخشی از اثرات سودمند آن ازطریق کاهش استرس اکسیداتیو انجام‌می‌شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر، حاصل پایان‌نامه‌ی دانشجویی مصوَّب معاونت پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه شاهد (تهران) در سال ۱۳۹۰ (۹۰-۱۷) می‌باشد و با حمایت مالی این دانشگاه به انجام‌رسیده‌است که بدین-وسیله از معاون محترم پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه مذکور تشکر می‌شود. ضمناً نویسندگان مقاله، مراتب سپاس وافر خود را از سرکار خانم فریبا انصاری کارشناس گروه فیزیولوژی دانشکده‌ی به‌خاطر کمک در انجام آزمایش‌ها اعلام می‌دارند.

References

1. Füchtenbusch M, Hummel M. [Is there a rationale for early insulin treatment in type 2 diabetes?].
a. MMW Fortschr Med. 2014;156(9):37-40.
2. Meng B, Li J, Cao H. Antioxidant and antiinflammatory activities of curcumin on diabetes mellitus and its complications. Curr Pharm Des. 2013;19(11):2101-13.
3. Eltayeb AA, Ahmad FA, Sayed DM, Osama AM. Subclinical vascular endothelial dysfunctions and myocardial changes with type 1 diabetes mellitus in children and adolescents. Pediatr Cardiol. 2014;35(6):965-74.
4. Abebe W. Effects of taurine on the reactivity of aortas from diabetic rats. Life Sci. 2008; 82(5-6): 279-89.
5. Bajwa SJ, Sehgal V, Kalra S, Baruah MP. Management of diabetes mellitus type-2 in the geriatric population: Current perspectives. J Pharm Bioallied Sci. 2014;6(3):151-7.
6. Zarshenas MM, Khademian S, Moein M. Diabetes and related remedies in medieval Persian medicine. Indian J Endocrinol Metab. 2014;18(2):142-9
7. Dey L, Attele AS, Yuan CS. Alternative therapies for type 2 diabetes. Altern Med Rev. 2002; 7(1):45-58.
8. Liu IM, Liou SS, Cheng JT. Mediation of beta-endorphin by myricetin to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. J Pharmacol Exp Ther. 2003; 307(3):1196-204.
9. Liu IM, Liou SS, Lan TW, Hsu FL, Cheng JT. Myricetin as the active principle of Abelmoschus moschatus to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. Planta Med. 2005; 71(7): 617-21.

10. Padilla E, Ruiz E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A, Slowing K, Tejerina T. Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of Spanish wines. Eur J Pharmacol. 2005; 517(1-2): 84-91.
11. Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Jalali Nadoushan MR, Vaez Mahdavi MR, Kalalian-Moghaddam H, Roghani-Dehkordi F, Dariani S, Raoufi S. The sesame lignan sesamin attenuates vascular dysfunction in streptozotocin diabetic rats: involvement of nitric oxide and oxidative stress. Eur J Pharmacol. 2013;698(1-3):316-21.
12. Liu IM, Tzeng TF, Liou SS, Lan TW. Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats. Life Sci. 2007;81(21-22):1479-88.
13. Nasri S, Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Rabani T, Balvardi M. Vascular mechanisms of cyanidin-3-glucoside response in streptozotocin-diabetic rats. Pathophysiology. 2011;18(4):273-8.
14. Fusi F, Saponara S, Frosini M, Gorelli B, Sgaragli G. L-type Ca2+ channels activation and contraction elicited by myricetin on vascular smooth muscles. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2003; 368(6): 470-8.
15. Rostoka E, Baumane L, Isajevs S, Line A, Dzintare M, Svirina D, Sharipova J, Silina K, Kalvinsh I, Sjakste N. Effects of kaempferol and myricetin on inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2010;106(6):461-6.

Evaluation of the Effect of Myricetin on Contractile Reactivity of Thoracic Aorta in Streptozotocin-Diabetic Rats

Mohammadreza Rajabi.,
Assistant Professor, Cardiology Specialist, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

Mehrdad Roghani.,
Professor, Ph.D of Physiology, Neurophysiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.

Zeinab Adab.,
General Physician, MD Graduate, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

Received:15/06/2014**, Revised:**04/07/2014**, Accepted:**01/09/2014

Corresponding author:
Mehrdad Roghani;
Shahed University, Tehran, Iran
E-mail: mehjour@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Diabetes mellitus is accompanied with higher incidence of cardiovascular disorders. Due to antioxidant activity of the flavonoid myricetin, this study was conducted to evaluate its effect on contractile and relaxation response of thoracic aorta in diabetic rats and to determine the role of oxidative stress.

Materials and Methods: In this experimental study, male Wistar rats were divided into 4 groups, i.e. control, myricetin-treated control (1 mg/kg), diabetic, and myricetin-treated diabetic groups (1 mg/kg). Myricetin was daily administered (i.p.) ten days after streptozotocin injection for 3 weeks. At the end of study, contractile reactivity of thoracic aortic rings to KCl and phenylephrine and relaxation response to acetylcholine was determined using isolated tissue setup. In addition, malondialdehyde (MDA) and nitrite were assessed in aortic tissue.

Results: Myricetin -treated diabetic group showed a non-significantly lower maximum contraction to KCl and a significantly lower maximum contraction to phenylephrine ($p<0.05$) as compared to diabetic group. Meanwhile, maximum relaxation response of rings to acetylcholine was significantly higher in myricetin-treated diabetic group as compared to diabetics ($p<0.05$). In addition, there was also a lower contractile response to PE in myricetin-treaded control and a higher relaxation response for myricetin-treated control group versus controls ($p<0.05$). In addition, significant reduction of MDA and nitrite ($p<0.05$) were observed in treated-diabetic rats.

Conclusion: Administration of myricetin could decrease contractile response to PE and enhance relaxation response in aortic tissue of diabetic rat and this may be beneficial in prevention of long-term vascular complications of diabetes and part of its effect is via reducing oxidative stress.

Key words: *Myricetin, Diabetes mellitus, Aorta, Contraction, Relaxation, Oxidative stress*