

بررسی اثر میریستین بر عملکرد انقباضی آنورت سینه‌ای در موش صحرائی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

دکتر محمد رضا رجبی^۱، دکتر مهرداد روغنی^{۲*}، دکتر زینب ادب^۳

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، دانش آموخته 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. با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئید میریستین، هدف تحقیق حاضر بررسی اثر تجویز این ماده بر پاسخ انقباضی و رفع انقباضی آنورت سینه‌ای ایزوله در مدل تجربی دیابت قندی و تعیین نقش استرس اکسیداتیو در موش صحرائی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، موش‌های صحرائی 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) تقسیم شدند. میریستین ۱۰ روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین به -مدت ۳ هفته (داخل صفاقی) و روزانه تجویز شد. در انتها، پاسخ انقباضی حلقه‌های آنورت سینه‌ای به کلرور پتاسیم و فنیل‌افرین و شل‌شدگی به استیل‌کولین با استفاده از بساط بافت ایزوله مورد سنجش قرار گرفت و میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) و نیتريت در بافت آنورت تعیین شد.

یافته‌ها: حداکثر پاسخ انقباضی آنورت سینه‌ای در گروه دیابتی تحت تیمار با میریستین به کلرور پتاسیم به‌طور غیر معنادار و به فنیل‌افرین به -طور معنادار ($p < 0/05$) کمتر از گروه دیابتی بود. به‌علاوه، حداکثر پاسخ شل‌شدگی حلقه‌های آنورتی به استیل‌کولین در گروه دیابتی تحت تیمار با میریستین در مقایسه با گروه دیابتی بیشتر و معنادار بود ($p < 0/05$). در ضمن، حداکثر پاسخ انقباضی به فنیل‌افرین در گروه کنترل تحت تیمار با میریستین به‌طور معنادار کمتر از گروه کنترل بود ($p < 0/05$) و حداکثر پاسخ شل‌شدگی در گروه کنترل تحت تیمار با میریستین به‌طور معنادار بیشتر از گروه کنترل بود ($p < 0/05$). همچنین، کاهش معنادار مالون دی‌آلدئید و نیتريت ($p < 0/05$) در گروه دیابتی تحت تیمار مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: تجویز میریستین موجب کاهش پاسخ انقباضی به فنیل‌افرین و افزایش پاسخ شل‌شدگی در بافت آنورت 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 انجام می‌شود.

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

مقدمه

دیابت قندی از نظر بالینی، یکی از مهمترین عوامل خطر برای برخی عوارض نظیر نفروپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی و بیماری‌های قلبی - عروقی محسوب می‌شود که بر اساس پیش‌بینی به‌عمل‌آمده، شیوع آن در جامعه‌ی انسانی در آینده افزایش خواهد یافت (۱). کمبود و یا کاهش نسبی میزان انسولین در این بیماری با عوارض متابولیکی حادّ و مزمن همراه می‌باشد (۲). در بیماری دیابت قندی، عوامل مختلفی از قبیل افزایش تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌علت افزایش سطح گلوکز خون و تشدید پراکسیداسیون لیپیدی موجب افزایش بروز آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی - عروقی می‌گردد. در همین ارتباط، نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که پاسخ انقباضی برخی نواحی عروقی شامل آنورت سینه‌ای به نورآدرنالین و کلرور پتاسیم در موش‌های صحرائی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین به‌طور معناداری نسبت به حیوانات سالم افزایش می‌یابد که در این افزایش، پاسخ انقباضی عروق، عوامل گوناگون از جمله تشدید تولید آندوتلین به‌عنوان یک منقبض‌کننده‌ی قوی عضلات صاف عروق، افزایش سنتز و ترشح برخی از پروستاگلاندین‌های تنگ‌کننده‌ی عروقی، افزایش غلظت داخل سلولی دی‌آسیل گلیسرول و افزایش متعاقب کلسیم داخل سلولی به‌عنوان عامل محرک انقباض در عضله‌ی صاف عروقی و کاهش توانایی تولید فاکتورهای گشادکننده‌ی عروقی با منشأ آندوتلیال نظیر نیتریک اکسید می‌تواند مطرح باشد. همچنین پاسخ اتساعی سیستم عروقی دارای آندوتلیوم شامل آنورت در موش‌های صحرائی دیابتی به استیل کولین به‌طور محسوس کمتر از موش‌های صحرائی سالم می‌باشد (۳، ۴). 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 دارویی و مشتقات حاصل از آنها به‌علت عوارض جانبی کمتر از جایگاه ویژه‌ای در علم

پزشکی برای تیمار بیماری‌های رایج بشری به‌ویژه امراض با ماهیت متابولیک نظیر دیابت قندی برخوردار بوده‌اند (۶). همچنین، در طی سالیان اخیر، هدف بسیاری از تحقیقات، بررسی اثر بخشی مواد طبیعی با خاصیت هیپوگلیسمیک بر روی عوارض بافتی و ارگانیک ناشی از دیابت بوده‌است (۶، ۷). در این 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، گیلان، آلبالو، گردو و برخی سبزی‌ها پدما می‌شود. این ماده، دارای خاصیت آنتی-اکسیدانی و جمع‌کنندگی رادیکال‌های آزاد اکسیژن بوده و متابولیسم چربی‌ها را به‌نحو مطلوب در جهت کاهش وقوع بیماری‌ها تغییر می‌دهد. در همین ارتباط تجویز این ماده در جهت کاهش کلسترول LDL و افزایش HDL سرم عمل می‌نماید و از تجمع چربی‌ها در جداره‌ی عروق تا حدّ زیادی جلوگیری می‌نماید (۷). به‌علاوه، اثرات ضدّ دیابتی تجویز این ماده در موش‌های دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین مورد تأیید قرار گرفته‌است (۸، ۹). همچنین، مشخص شده که مصرف درازمدت آن دارای خاصیت شل‌کنندگی سیستم عروقی می‌باشد (۱۰). با توجه 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 آنورت سینه‌ای موش صحرائی نر مورد بررسی قرار گرفت و نقش استرس اکسیداتیو در این رابطه تعیین شد.

مواد و روش‌ها

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

استفاده از اسپکتروفتومتر (Spectronic 20, USA) انجام شد.

اندازه‌گیری پاسخ انقباضی و رفع انقباضی آنورت سینه‌ای

در پایان کار، موش‌ها با استفاده از اتر بیهوش شده، با بازکردن قفسه‌ی سینه، آنورت سینه‌ای را جدا کرده‌اند و در داخل محلول کربس (Krebs) که به‌طور مداوم به‌داخل آن گاز کربوژن دمیده می‌شد، قرار داده شد. ترکیب شیمیایی محلول کربس مورد استفاده در تمام 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 کاهش دادن متابولیسم بافت و کاهش مرگ و میر سلولی)، آنورت به-دقت از بافت پیوندی اطراف، پاک و سپس به حلقه‌هایی به‌طول حدوداً ۴ میلی‌متر تقسیم گردید. 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 اضافه شد. مشاهده‌ی پاسخ شل‌شدگی بیشتر از ۳۰٪ در حلقه‌های آنورت به‌عنوان ملاک سالم-بودن آندوتلیوم در نظر گرفته شد. برای ثبت پاسخ‌گویی حلقه‌های آنورتی، آنها به کمک سیم‌های پلاتینی L شکل که به موازات هم قرار گرفته‌اند، از یک طرف به فلاپ فلزی و از طرف دیگر به ترانس دیوسر ایزومتریک F-60 (Narco Biosystems, USA) متصل گردیدند. در این بررسی، کشش استراحتی اعمال شده به حلقه‌های آنورتی ۱/۵ گرم بود. پس از اعمال این کشش، ۶۰ تا ۹۰ دقیقه به بافت اجازه داده شد تا وضعیت ثابت پیدا کند. محلول کربس داخل حمام بافت هم هر ۳۰ دقیقه تعویض می‌شد. پس از حصول حالت تعادل، سلامت بافت در ابتدا با استفاده از غلظت‌های افزایش‌یابنده‌ی کلرور پتاسیم (۱۰ تا ۵۰ میلی مولار) جهت اطمینان از سلامت و تمامیت بافت، بررسی شد، اما در ادامه، بافت‌های با پاسخ انقباضی ضعیف (کمتر از ۰/۲ گرم) در غلظت ۵۰ میلی مولار کلرور پتاسیم بررسی نشدند. سپس، حلقه‌ها در معرض

آنورت سینه‌ای در حالت دیابت وجود دارد (۱۱). تمام حیوان‌ها در دمای ۲۴-۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد در گروه-های ۳ تا ۴ تایی در هر قفس قرار داده شدند. حیوان‌ها، آزادانه به آب لوله‌کشی و غذای مخصوص موش دسترسی داشتند. در ضمن، این بررسی براساس پروتکل‌ها و دستورالعمل‌های توصیه شده توسط انستیتوی ملی بهداشت آمریکا (NIH) برای نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی به‌انجام رسید. برای بررسی از موش‌های صحرائی استفاده شد که در شرایط طبیعی، میزان گلوکز سرم آنها کمتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی لیتر بود. در این خصوص، برای خون‌گیری از شبکه‌ی رتر و اوربیتال و لوله‌ی موئینه تحت بیهوشی ملایم با اتر استفاده شد. حجم خون اخذ شده از هر حیوان نیز حدود ۱ میلی‌لیتر بود. موش‌ها به‌طور تصادفی (الگوی تصادفی ساده)، به ۴ گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با میریستین (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم؛ سیگما، آمریکا)، دیابتی و دیابتی تحت تیمار با میریستین (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. میریستین از روز دهم پس از تزریق استرپتوزوتوسین (پس از حصول اطمینان از دیابتی بودن حیوانات با چک کردن وجود قند در ادرار به روش نوار ادراری (شرکت گلوکو یاب، تهران)) به مدت ۳ هفته و روزانه به میزان ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم (داخل صفاقی) تجویز شد. دوز میریستین نیز براساس رفرانس قبلی در مورد اثربخشی میریستین بر کاهش مقاومت به انسولین القا شده با رژیم غذایی حاوی مقدار زیاد از فروکتوز (۱۲) انتخاب گردید. برای دیابتی نمودن موش‌ها، از داروی استرپتوزوتوسین (سیگما، آمریکا) به-صورت تک دوز و داخل صفاقی به میزان ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم حل شده در محلول نرمال سالین سرد استفاده شد. در روزهای بعد، علائم بارز دیابت قندی نظیر پرخوری، پرنوشی، پرادراری، و کاهش وزن به‌وضوح در برخی موش‌ها دیده شد. اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم توسط روش آنزیمی گلوکز اکسیداز (شرکت زیست شیمی، تهران) قبل از انجام کار و در پایان هفته‌های ۲ و ۴ با

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 در هر یک از دوره‌های زمانی یا غلظت‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. برای آنالیز آماری داده‌ها نیز از برنامه‌ی آماری Sigma Stat نسخه ۳/۵ (۲۰۰۶) استفاده شد. به‌علاوه سطح معنادار، $p < 0/05$ برای تمامی آنالیزها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج اندازه‌گیری وزن نشان داد 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 وجود داشت، 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 در حد کمتر در گروه دیابتی تحت تیمار وجود داشت ($p < 0/05$). در ضمن، تیمار گروه کنترل با میریستین در هفته‌های دوم ($p = 0/31$) و چهارم ($p = 0/38$) تغییر معنادار در مقایسه با گروه کنترل ایجاد ننمود (نمودار ۱).

از نظر 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 در حد کم و به‌طور معنادار ($p < 0/05$) دیده شد. 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 تیمار نشده به‌وجود آورد ($p < 0/01$) (نمودار ۲).

پاسخ انقباضی آنورت سینه‌ای به کلرور پتاسیم

غلظت‌های افزایش‌یافته‌ی فنیل افرین (10^{-9} تا 10^{-5} مولار) قرار گرفت. برای ثبت پاسخ رفع انقباضی، درحالی که آندوتلیوم آنورت دست نخورده بود، برای ایجاد یک پیش انقباض در حلقه‌های آنورتی، فنیل افرین با غلظت 10^{-5} مولار استفاده شد. غلظت مذکور، انقباضی کمتر از میزان حداکثر در بافت به‌وجود آورد. پس از رسیدن پاسخ انقباضی آنورت دارای آندوتلیوم به کفه، استیل کولین به‌روش تجمعی از غلظت 10^{-9} تا 10^{-4} مولار به حمام بافت، اضافه و منحنی Log غلظت استیل کولین-درصد پاسخ اتساعی آنورت رسم شد. در تمامی بررسی‌های عروقی، میزان تولید نیرو به‌صورت گرم به ازای واحد سطح بافت و میزان رفع انقباض به‌صورت درصدی از حداکثر انقباض مشاهده شده در حضور فنیل افرین گزارش شد. برای ثبت و آنالیز داده‌ها نیز از نرم افزار فیزیوگراف نسخه ۱ (شرکت بهینه آرمان، تهران) استفاده گردید.

سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA)

پس از تهیه‌ی هموژنه بافت آنورت در نرمال سالین (۰/۵٪)، 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 انجام گرفت که روش کار آن قبلاً بیان شده است (۱۱). برای محلول استاندارد نیز از رقت‌های مختلف تتراآتوکسی پروپان استفاده گردید.

سنجش غلظت نیتريت

سنجش غلظت نیتريت بافت آنورت براساس واکنش گریس و دستورالعمل کیت (سیگما، آمریکا) و روش کار مطالعه‌ی قبلی انجام گرفت (۱۱). محلول استاندارد هم رقت‌های مختلف نیتريت سدیم بود.

آنالیز آماری

از نظر آماری، تمامی نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان گردید. پس از تأیید نرمال بودن توزیع داده‌ها، برای مقایسه‌ی نتایج هر پارامتر در هر یک از

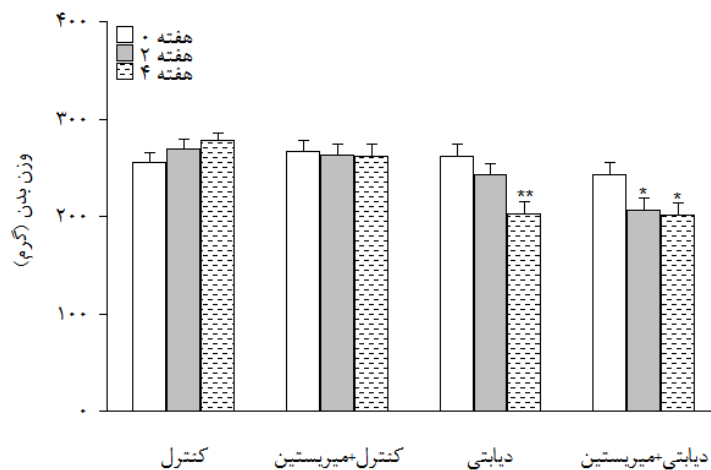
های آئورتی به کلرور پتاسیم در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p=0/15$). بعلاوه، گروه کنترل تیمار شده با میریستین در غلظت ۵۰ میلی مولار، یک پاسخ انقباضی کمتر در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که از نظر آماری در مقایسه با گروه کنترل معنادار بود ($p<0/05$). همچنین گروه دیابتی تیمار شده با میریستین نیز در مقایسه با گروه

نمودار ۳، پاسخ انقباضی حلقه‌های دارای اندوتلیوم را به غلظت‌های افزایش‌یابنده‌ی کلرور پتاسیم در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. در این رابطه، پاسخ انقباضی آئورت سینه‌ای به کلرور پتاسیم در مورد این گروه‌ها از یک طرح وابسته به غلظت پیروی نمود. گروه دیابتی، یک افزایش غیر معنادار حداکثر پاسخ‌گویی حلقه-

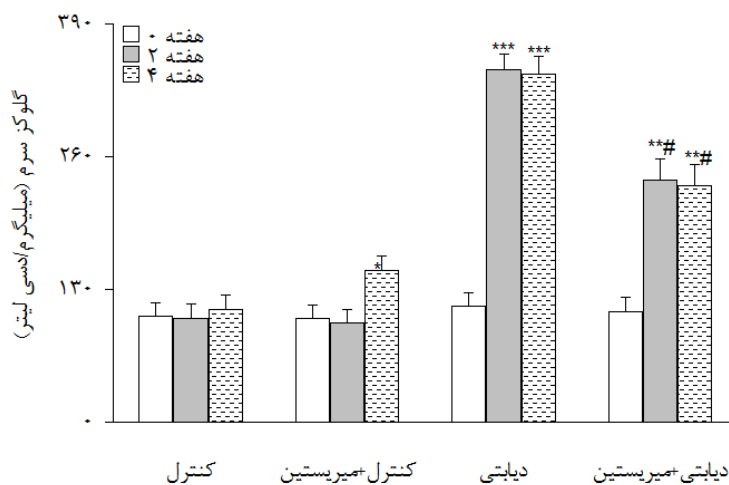
جدول ۱: نتایج مربوط به اندازه‌گیری سطح مالون دی آلدئید و نیتريت در بافت آئورت گروه‌های مختلف

گروه	مالون دی آلدئید ($\mu\text{mol.g}^{-1}\text{ protein}$)	نیتريت ($\text{nmol.mg}^{-1}\text{protein}$)
کنترل (n=6)	$4/8 \pm 0/5$	$18/3 \pm 2/4$
کنترل+میریستین (n=5)	$5/1 \pm 0/4$	$16/1 \pm 3/2$
دیابتی (n=5)	$7/1 \pm 0/8^*$	$30/8 \pm 3/5^*$
دیابتی+میریستین (n=6)	$5/3 \pm 0/5^\#$	$21/7 \pm 2/9^\#$

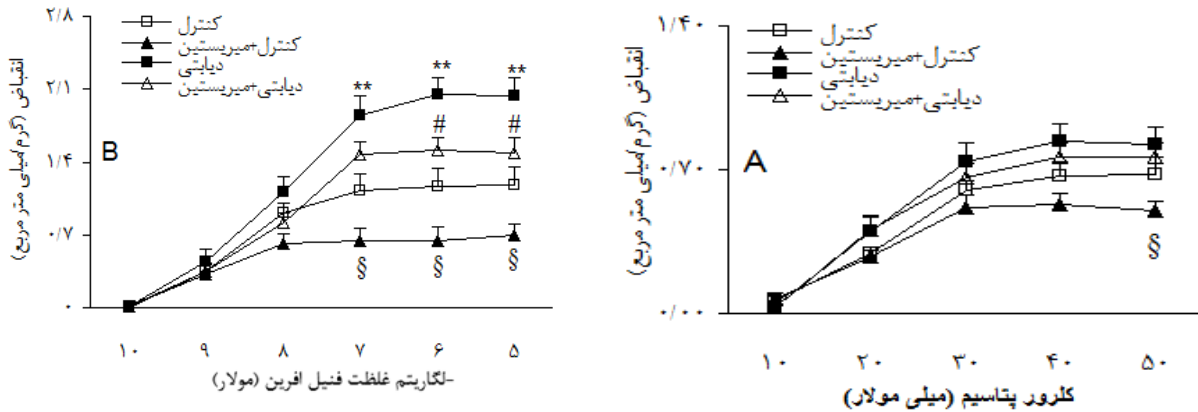
(درمقایسه با گروه کنترل)، $p<0/05^*$ ، $p<0/05^\#$ (درمقایسه با گروه دیابتی)



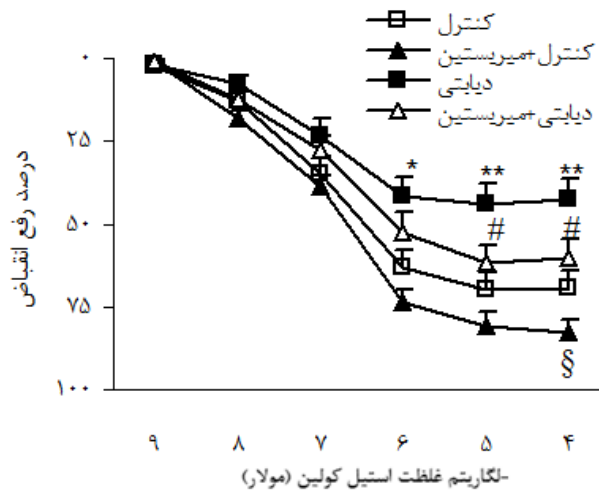
نمودار ۱: تغییرات وزن در هفته‌های مختلف در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با میریستین $p<0/05^*$ ، $p<0/01^{**}$ (در مقایسه با هفته‌ی قبل کار در همان گروه)



نمودار ۲: تغییرات گلوکز سرم در هفته‌های مختلف در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با میریستین. $p<0/05^*$ ، $p<0/005^{***}$ (در مقایسه با سطح پایه در همان گروه)، $p<0/01^\#$ (در مقایسه با گروه دیابتی در همان هفته)



نمودار ۳: پاسخ انقباضی حلقه‌های آنورت سینه‌ای دارای اندوتلیوم به کلرور پتاسیم (A) و فنیل افرین (B) در گروه‌های مختلف نمودار ۳: پاسخ انقباضی حلقه‌های آنورت سینه‌ای دارای اندوتلیوم به کلرور پتاسیم (A) و فنیل افرین (B) در گروه‌های مختلف (درمقایسه با گروه کنترل)، $p < 0.01$ **، (درمقایسه با گروه کنترل) و $p < 0.05$ # (درمقایسه با گروه دیابتی) $p < 0.05$ §



نمودار ۴: پاسخ رفع انقباضی حلقه‌های آنورت سینه‌ای دارای اندوتلیوم به استیل کولین در گروه‌های مختلف. $p < 0.01$ **، $p < 0.05$ * (درمقایسه با گروه کنترل)، $p < 0.05$ # (درمقایسه با گروه دیابتی)، $p < 0.05$ § (درمقایسه با گروه کنترل)

این کاهش معنادار بود ($p < 0.05$). در گروه کنترل تحت تیمار با میریستین نیز نسبت به گروه کنترل حداکثر پاسخ انقباضی از غلظت 10^{-7} مولار کاهش نشان داد که این کاهش از نظر آماری معنادار بود ($p < 0.05$).

پاسخ رفع انقباضی آنورت سینه‌ای به استیل کولین

نمودار ۴، پاسخ رفع انقباضی حلقه‌های دارای اندوتلیوم را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. در این رابطه، طرح پاسخ رفع انقباضی آنورت سینه‌ای به استیل کولین از یک الگوی وابسته به غلظت پیروی نمود (از غلظت 10^{-9} مولار تا 10^{-4} مولار). گروه دیابتی، یک کاهش پاسخ رفع انقباضی به استیل کولین، نسبت به گروه

دیابتی پاسخ انقباضی کمتر نشان داد، اما از نظر آماری معنادار نبود ($p = 0.11$).

پاسخ انقباضی آنورت سینه‌ای به فنیل افرین

پاسخ انقباضی آنورت سینه‌ای به فنیل افرین در گروه‌های مختلف (نمودار ۳) نشان‌دهندی یک الگوی وابسته به غلظت (از غلظت 10^{-9} مولار تا 10^{-5} مولار) بود. پاسخ انقباضی به فنیل افرین در گروه دیابتی از غلظت 10^{-7} مولار به بعد در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنادار داشت ($p < 0.01$). همچنین در گروه دیابتی تحت تیمار با میریستین حداکثر پاسخ انقباضی به فنیل افرین در مقایسه با گروه دیابتی از غلظت 10^{-6} مولار کاهش یافته و

دیابتی گردید و این پاسخ در گروه کنترل تحت تیمار نیز یک افزایش معنادار در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. گفتنی است بخشی از اثرات سودمند این ماده از طریق کاهش استرس اکسیداتیو انجام می شود.

دیابت قندی ابتلا به بیماری های قلبی - عروقی از قبیل آتروسکلروز و هیپرتانسیون و در نتیجه میزان مرگ و میر را افزایش می دهد. به نظر می رسد مکانیسم های متفاوتی در ایجاد اختلال در ساختمان و عملکرد عروق خونی در دیابت دخالت داشته باشند که نهایتاً منجر به ایجاد این گونه عوارض می گردند. در افزایش پاسخ انقباضی عروق در حالت دیابت قندی، عوامل گوناگونی از جمله: تشدید تولید اندوتلین به عنوان یک منقبض کننده - ی قوی عضلات صاف عروق، افزایش سنتز و ترشح برخی از پروستاگلاندین های تنگ کننده ی عروقی، افزایش غلظت داخل سلولی دی آسپیل گلیسرول و افزایش متعاقب کلسیم داخل سلولی به عنوان عامل محرک انقباض در عضله ی صاف عروقی و نیز کاهش توانایی تولید فاکتورهای گشادکننده ی عروقی با منشأ اندوتلیال نظیر نیتریک اکسید، می تواند مطرح باشد (۴،۳). همچنین، ظرفیت آندوتلیوم عروق در ستنز سایر گشادکننده های عروقی نظیر پروستاگلین نیز کاهش می یابد. به علاوه، تحقیقات نشان داده اند که خود هیپرگلیسمی و تشدید استرس اکسیداتیو ناشی از آن نیز می تواند دلیل بروز این عوارض باشد (۳). از طرف دیگر، برخی مطالعات نشان داده اند که در دیابت قندی اختلال متابولیسم گلوکز و گلیکوزیلاسیون پروتئین ها نقش مهمی در ایجاد برخی عوارض عروقی دیابت دارد (۴). به علاوه آن که در بیماران دیابتی تولید رادیکال های آزاد از طریق اتواکسیداسیون گلوکز افزایش می یابد (۴). نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که پاسخ انقباضی حلقه های آئورتی دارای آندوتلیوم به فنیل افرین در موش های صحرایی دیابتی به - طور معناداری نسبت به حیوانات سالم (گروه کنترل) افزایشی یافته که این با نتایج مطالعه ی نصری و همکاران

کنترل نشان داد 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 دیده شد 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 افزایش - یافت 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 نشان داد که این افزایش از نظر آماری معنادار بود ($p < 0/05$).

نتایج استرس اکسیداتیو

در این خصوص، سطح مالون دی آلدئید و نیتريت در بافت آئورت تغییر معناداری نسبت به گروه کنترل نشان نداد ($p = 0/09$)، از طرف دیگر، بروز حالت دیابت پس از گذشت ۱ ماه موجب افزایش معنادار سطح مالون دی آلدئید و نیتريت در آئورت ($p < 0/01$) گردید و تیمار با میریستین با دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم موجب کاهش معنادار آن ها در گروه دیابتی تیمار شده گردید (جدول ۱) ($p < 0/05$).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز روزانه ی میریستین به میزان ۱ میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۳ هفته در موش های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین، نتوانست از کاهش وزن این حیوانات جلوگیری کند. با این وجود، دارای اثر آنتی هیپرگلیسمیک معنادار و حد متوسط بود و درمان موش های دیابتی با این ماده، موجب کاهش معنادار در حداکثر پاسخ انقباضی به فنیل افرین در مقایسه با گروه دیابتی درمان نشده می گردد. به علاوه، حداکثر پاسخ انقباضی نسبت به فنیل افرین در گروه کنترل تحت درمان با میریستین نیز در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنادار نشان داد. همچنین، تجویز ۳ هفته ای میریستین به موش های دیابتی شده، موجب افزایش معنادار حداکثر پاسخ شل شدگی آئورت به استیل کولین در مقایسه با گروه

در سال ۲۰۱۱ مطابقت داشت (۱۳).

همچنین، نتایج این مطالعه نشان داد که پاسخ اتساعی حلقه‌های آئورتی دارای آندوتلیوم موش‌های صحرایی دیابتی به استیل کولین، به‌طور معناداری کمتر از موش‌های صحرایی نر سالم می‌باشد. از آنجا که پاسخ اتساعی عروق به استیل کولین وابسته به تولید NO توسط آندوتلیوم است، لذا به نظر می‌رسد 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 فعال شدن NO شوند. همچنین، غلظت بالای گلوکز سبب افزایش چشمگیر در سوپراکسید آندوتلیوم می‌گردد که طی واکنش با NO، پراکسی نیتريت تولید می‌کند که این محصول با اکسیده کردن تترا هیدروبیوپترین و تبدیل آن به دی هیدروبیوپترین می‌تواند در مسیر سنتز برخی مواد میانجی اختلال ایجاد نماید. نیز، در دیابت قندی ظرفیت آندوتلیوم عروق در سنتز گشادکننده‌های عروقی مانند پروستاگلندین و NO کم می‌شود و تنگ کننده‌های عروقی مانند آندوتالین به مقدار زیادی تولید می‌شوند (۱۳، ۳).

در بررسی حاضر مشخص گردید 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 آندوتلیوم منقبض شده توسط غلظت ساب ماگزیمال فنیل افرین در مقایسه با موش‌های دیابتی در پاسخ به اضافه نمودن استیل کولین شود. در خصوص توجیه اثرات سودمند میریستین در این بررسی، نتایج مطالعه‌ی انجام- شده در سال ۲۰۰۵ نشان می‌دهد که اضافه نمودن مستقیم میریستین به حمام بافت ایزوله از طریق مهار نمودن پمپ

سدیم پتاسیم غشای سلول‌های عضلانی و فعال نمودن 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، مغایرت دارد. بنابراین می‌توان ادعا نمود که اثر سودمند میریستین در این بررسی حداقل از طریق اثرگذاری بر پمپ‌های غشایی نظیر پمپ سدیم پتاسیم و یا از طریق تغییر فعالیت پروتئین کیناز به انجام نرسیده است. 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، مشخص کرد که اضافه نمودن میریستین به حمام بافتی موجب افزایش فعالیت کانال‌های کلسیمی L-type شده و از این طریق، موجب تشدید پاسخ انقباض عضلات صاف عروق هم گردیده است و داروهای مسدودکننده‌ی کانال های کلسیمی مثل وراپامیل (Verapamil) به‌طور کامل موجب رفع اثر انقباضی میریستین شده‌اند (۱۴). مجدداً می‌توان ادعا نمود که اثر سودمند میریستین در این مطالعه، حداقل از طریق اثرگذاری بر این کانال‌ها نبوده است. زیرا در غیر این صورت در گروه کنترل و یا دیابتی تیمار شده با میریستین یک تشدید پاسخ انقباضی می‌بایست مشاهده- می‌شد که این‌طور نبود. بنابراین احتمال می‌رود که افزایش پاسخ گشادکنندگی و کاهش پاسخ انقباضی در حضور میریستین در این مطالعه تا حدودی با وساطت دو سیستم نیتریک اکسید و پروستاگلندین‌ها به‌انجام رسیده باشد که البته این مطلب نیاز به بررسی بیشتر دارد. ناگفته نماند که نتایج یک مطالعه توسط روسکوتا و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان می‌دهد که میریستین در کوتاه مدت خود یک مهارکننده‌ی آنزیم سنتزکننده‌ی نیتریک اکسید می‌باشد، هر چند اثر درازمدت آن در این خصوص مشخص- نگردیده است (۱۵). از طرف دیگر، بخشی از تغییرات سودمند پاسخگویی عروقی در این تحقیق، به دنبال تجویز

اخیر در مطالعه‌ی ما به علت القاء دیابت نوع ۱ (که در آن بخش اعظم سلول‌های مترشح‌هی انسولین از بین می‌روند) رخ نداده است.

به‌طور خلاصه، در این مطالعه مشخص گردید که تجویز میریستین موجب کاهش پاسخ انقباضی به فنیل افرین و افزایش پاسخ شل‌شدگی در بافت آئورت موش صحرایی دیابتی می‌گردد که این در جلوگیری از برخی عوارض عروقی دیابت در درازمدت می‌تواند سودمند باشد و بخشی از اثرات سودمند آن از طریق کاهش استرس اکسیداتیو انجام می‌شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر، حاصل پایان‌نامه‌ی دانشجویی مصوب معاونت پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه شاهد (تهران) در سال ۱۳۹۰ (۹۰-۱۷) می‌باشد و با حمایت مالی این دانشگاه به انجام رسیده است 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.

میریستین درحالت دیابت قندی را می‌توان به کاهش استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی و به‌همراه آن اعمال اثر آنتی‌هیپرگلیسمیک و هیپوگلیسمیک از طرف این فلاونوئید نسبت داد که خود موجب کاهش بروز تغییرات عملکردی نامطلوب در دیواره‌ی آئورت سینه‌ای در موش‌های دیابتی شده می‌گردد. در مطالعه‌ی ما، اثر هیپوگلیسمیک میریستین در حد متوسط در هفته‌های دوم و چهارم پس از تحقیق به‌خوبی مشاهده شد که این خود می‌تواند نهایتاً موجب کاهش پاسخ انقباضی به فنیل افرین و تشدید پاسخ رفع انقباضی به استیل کولین در موش‌های دیابتی شده باشد. در تأیید یافته‌های ما، نتایج مطالعه‌ی انجام‌شده توسط لیو و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز چنین اثر هیپوگلیسمیک را در مورد میریستین در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین نشان دادند که این اثر وابسته به دوز هم بود (۹). این محققان نشان دادند که میریستین از طریق 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 دیابتی شده می‌گردد (۹). به‌علاوه، مشخص شده که میریستین قادر است حساسیت بافتی به انسولین را افزایش دهد که این هم می‌تواند موجب کاهش قند خون در موش‌های دیابتی گردد (۹) هر چند مکانیسم

References

- Füchtenbusch M, Hummel M. [Is there a rationale for early insulin treatment in type 2 diabetes?]. *MMW Fortschr Med.* 2014;156(9):37-40.
- 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.
- 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.
- Abebe W. Effects of taurine on the reactivity of aortas from diabetic rats. *Life Sci.* 2008; 82(5-6): 279-89.
- 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.
- Zarshenas MM, Khademian S, Moein M. Diabetes and related remedies in medieval Persian medicine. *Indian J Endocrinol Metab.* 2014;18(2):142-9
- Dey L, Attele AS, Yuan CS. Alternative therapies for type 2 diabetes. *Altern Med Rev.* 2002; 7(1):45-58.
- 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.
- 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, Bauman 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-treated 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