Downloaded from www.phypha.ir at 21:06 IRST on Thursday October 13th 2016

Physiology and Pharmacology, 16 (1), 44-53
Spring 2012 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Effect of losartan on NOX2 transcription following acute myocardial ischemia-reperfusion

Fatemeh Safari[1,2,3], Sohrab Hajizadeh[1,4*], Seyed Hosein Moshtaghion[3], Mahdi Forouzandeh Moghadam[5], Shahnaz Shekarforoush[6], Gholamreza Bayat[1], Roham Mazlum[1], Leila Sattarian[1]

1. Dept. Physiology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Dept. Physiology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran
3. Cardiovascular Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran
4. Institute for Cognitive Science Studies (ICSS), Tehran, Iran
5. Dept. Biotechnology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
6. Islamic Azad University, Arsanjan Branch, Fars, Iran

Received: 17 Dec 2011 **Accepted: 4 Mar 2012**

Abstract

Introduction: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase-2 (Nox2) is one of the predominant sources of ROS production during myocardial ischemia-reperfusion and can be induced by angiotensin II. The evidence suggests that pharmacological blockers of renin-angiotensin system can exert direct tissue effects independent of their ability to regulate blood pressure. The mechanism(s) responsible for such direct effects are not well understood. The aim of this study was to investigate the early changes of cardiac NOX2 gene transcription after myocardial ischemia-reperfusion in rats treated with losartan, an angiotensin type 1 (AT1) receptor blocker.

Methods: Wistar rats were divided into five groups: Control, sham operated, ischemia-reperfusion (group IR), losartan without ischemia and losartan with ischemia-reperfusion. The animals underwent 30 min of left anterior descending artery occlusion and subsequent reperfusion for 180 min. The mRNA expression was determined by real time-PCR in ischemic area of the left ventricle (LV) and non ischemic area of right ventricle (RV).

Results: Compared to control hearts, exposure to myocardial ischemia-reperfusion produced a significant increase in NOX2 mRNA level in ischemic area of LV ($P<0.001$) but not in non ischemic area of right ventricle. Although in losartan group, NOX2 mRNA levels neither in LV nor RV were significantly altered, while in losartan and ischemia-reperfusion group NOX2 mRNA upregulation in ischemic area was significantly suppressed ($P<0.01$).

Conclusion: Based on the obtained results, it could be concluded that following acute myocardial ischemia–reperfusion, NOX2 mRNA levels were increased in ischemic area of left ventricle but not in non ischemic area of right ventricle, suggesting the local effect of ischemia on the gene expression. Furthermore, inhibition of NOX2 transcription in ischemic area may be a mechanism of the anti ischemia effects of losartan.

Key words: Myocardial ischemia reperfusion, losartan, NOX2 mRNA

* Corresponding author e-mail: hajizadeh@iricss.or
Available online at: www.phypha.ir/ppj

Downloaded from www.phypha.ir at 21:06 IRST on Thursday October 13th 2016

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۶ (۱)، ٤٤ – ٥٣
بهار ۱۳۹۱

IRANIAN SOCIETY OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY
انجمن فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران
تاسیس ۱۳۴۷

اثر لوزارتان بر میزان نسخه‌برداری ژن NOX2 به دنبال ایسکمی– رپرفیوژن حاد میوکارد

فاطمه صفری[۱،۲،۳]، سهراب حاجی زاده[۱،۴*]، سید حسین مشتاقیون[۳]، مهدی فروزنده مقدم[۵]، شهناز شکرفروش[۶]، غلامرضا بیات[۱]، رهام مظلوم[۱]، لیلا ستاریان[۱]

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲. گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد
۳. مرکز تحقیقات قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد
۴. پژوهشکده علوم شناختی، تهران
۵. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۶. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان، فارس

دریافت: ۲۶ آذر ۹۰ پذیرش: ۱۴ اسفند ۹۰

چکیده

مقدمه: NADPH اکسیداز از منابع اصلی تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن در ایسکمی – رپرفیوژن میوکارد است. داروهای مهارکننده سیستم رنین آنژیوتانسین مستقل از اثرات همودینامیکی با اثر مستقیم بر سلول اثرات محافظتی در قلب اعمال میکنند. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات میزان نسخه‌برداری NADPH اکسیداز (NOX2) به دنبال ایسکمی رپرفیوژن میوکارد در موش‌های تیمار شده با لوزارتان به عنوان بلوکر گیرنده نوع ۱ آنژیوتانسین است.

روش ها: موش های صحرایی نر ویستار به گروه های کنترل، شم، ایسکمی رپرفیوژن (IR)، لوزارتان و گروه لوزارتان + ایسکمی رپرفیوژن تقسیم شدند. با بستن شریان کرونر چپ به مدت ۳۰ دقیقه و خون رسانی مجدد به مدت ۱۸۰ دقیقه مدل ایسکمی رپرفیوژن القا گردید. تغییرات mRNA در ناحیه ایسکمی بطن چپ و ناحیه غیر ایسکمی بطن راست توسط Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج به دنبال ایسکمی رپرفیوژن میوکارد در گروه IR سطح NOX2 mRNA در ناحیه ایسکمی بطن چپ در مقایسه با بطن چپ گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P<0.001$) درحالیکه در بطن راست این افزایش، معنی دار نمی‌باشد. مصرف لوزارتان به تنهایی تغییر معنی‌داری در سطح NOX2 mRNA بطن چپ و راست ایجاد نکرد در حالیکه در گروه لوزارتان+ایسکمی افزایش NOX2 mRNA ناشی از ایسکمی به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<0.01$).

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که در پاسخ به ایسکمی – رپرفیوژن حاد میوکارد به طور زودرس میزان نسخه‌برداری ژن NOX2 در ناحیه ایسکمی افزایش می‌یابد این افزایش که محدود به ناحیه ایسکمی بطن چپ بوده و در بطن راست رخ نمی‌دهد میتواند از مکانیسم های پاتولوژی ایسکمی رپرفیوژن حاد میوکارد باشد. جلوگیری از افزایش سطح NOX2 mRNA ناشی از ایسکمی را نیز میتوان به عنوان یکی از مکانیسم‌های بروز اثرات ضد ایسکمی لوزارتان در قلب پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: ایسکمی رپرفیوژن میوکارد، لوزارتان، NOX2 mRNA

مقدمه

یکی از منابع اصلی تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS)[۱] در طی ایسکمی – رپرفیوژن میوکارد کمپلکس آنزیمی NADPH اکسیداز[۲] می باشد. این آنزیم غشایی که شامل زیرواحد کاتالیتیک و زیرواحد های سیتوزولی می‌باشد با انتقال

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: hajizadeh@iricss.or
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

1. Reactive Oxygen Species
2. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase

Downloaded from www.phypha.ir at 21:06 IRST on Thursday October 13th 2016

الکترون از NADPH به اکسیژن مولکولی موجب تولید آنیون مخرب سوپراکساید می‌گردد. تا کنون ۷ نوع آنزیم NADPH اکسیداز شناسایی شده است که در بخش کاتالیتیک با یکدیگر متفاوتند و به مجموع آنها "NOX family"[1] گفته می‌شود در این میان NOX2 که همان NADPH اکسیداز فاگوسیتی است به دلیل توزیع وسیع در بدن از اهمیت بیشتری برخوردار است.

NOX2 در سال ۱۹۸۰ توسط Pokora کلون و $gp91^{phox}$ نامیده شد [۱،۳] بیان NOX2 و اجزای دیگر این کمپلکس در سلول‌های اندوتلیال وکاردیومیوسیت‌ها به خوبی نشان داده شده است. NADPH اکسیداز سلول‌های قلبی درحالت پایه و بدون اعمال استیمولوس خاصی فعال بوده و مقادیر اندکی ROS تولید می‌کند که در تنظیم فعالیت کینازها و فسفاتازها، تنظیم بیان ژن‌ها و نیز تمایز کاردیومیوسیت‌ها مشارکت دارد [۴،۱۴،۱۸] اما تحت تاثیر استیمولوس‌های مختلفی مانند آنژیوتانسین II [۲۵، ۱۲]، اندوتلین-۱ [۶] و TNFα [۱۳] بیان و فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد که منجر به افزایش تولید ROS می‌گردد. شواهد قوی وجود دارد که افزایش تولید ROS از آنزیم NOX2 موجود در کاردیومیوسیت ها و سلول‌های اندوتلیال نقش مهمی در پاتوژنز بیماری های قلبی عروقی همراه با استرس اکسیداتیو مانند هپرتاسیون، دیابت، آرترواسکلروز، ایسکمی و Remodeling عروقی دارد [۳،۳۱، ۱].

در خصوص اهمیت NOX2 در طی پدیده ایسکمی – رپرفیوژن میوکارد همچنان نکات قابل بحثی وجود دارد Hoffmeyer و همکارانش نشان دادند که اندازه انفارکت در موشهای $P_{47}^{-/-}$ (یکی از زیرواحدهای NADPH اکسیداز) و موشهای WT مشابه است [۸]. در حالیکه در مطالعه Byrne و همکارانش در موش $P_{47}^{-/-}$ به دنبال ایسکمی – رپرفیوژن میوکارد اندازه ناحیه انفارکت نسبت به گروه کنترل کاهش یافت [۵].

افزایش فعالیت NADPH اکسیداز و تولید سوپراکساید در ناحیه CA1 هیپوکمپ به دنبال ایسکمی رپرفیوژن مغز نیز نشان داده شده است [۴]. یکی مهمترین عوامل القا کننده و فعال کننده NOX2 در سیستم قلبی عروقی آنژیوتانسین II است. مطالعات نشان داده است که در طی نارسایی و هیپرتروفی و نیز فیبروز قلبی ناشی از تزریق آنژیوتانسین II فعالیت NADPH اکسیداز در بطن چپ افزایش می‌یابد ودر موش NOX2-/- اثرات فوق سرکوب می‌گردد [۲]. Landmesser و همکارانش نشان دادند که در مدل ایسکمی میوکارد آنژیوتانسین II فعالیت NADPH اکسیداز را در بافت میوکارد افزایش می‌دهد و حذف زیرواحد P_{47} به طور قابل توجهی از اختلال عملکرد بطن چپ بعد از ایسکمی جلوگیری کرده و با کاهش آپوپتوز میزان مرگ و میر حیوانات را نیز کاهش می‌دهد [۱۵]. بنابراین ارتباط بین عملکرد آنژیوتانسین II و تولید ROS از NADPH اکسیداز در بیماری‌های قلبی عروقی کاملا مورد تایید قرار گرفته است.

یکی از مکانیسم های مهم مسوول ایجاد آسیب های ناشی از ایسکمی – رپرفیوژن میوکارد سیستم رنین آنژیوتانسین (RAS) است بنابراین استفاده از داروهای مهار کننده به منظور پیشگیری و درمان آسیب‌های ایسکمی رپرفیوژن میوکارد مورد توجه قرار گرفته است [۲۳،۲۶]. یکی از داروهای مهار کننده سیستم رنین آنژیوتانسین داروی ضدفشار خون لوزارتان است که با بلوک گیرنده نوع ۱ آنژیوتانسین (AT1) اثرات مخرب آنژیوتانسین را آنتاگونیزه می‌کند. مطالعات نشان داده شده است که لوزارتان مستقل از اثرات همودینامیکی با اثر مستقیم بر سلول و با بکارگیری مکانیسمهای ناشناخته اثرات محافظتی در قلب اعمال می‌کند.

چندین مطالعه اثر محافظتی لوزارتان در برابر ایسکمی رپرفیوژن میوکارد را تایید کرده‌اند [۳۰،۳۱، ۲۴]. از جمله مطالعه ما که نشان داد مصرف دوز غیر موثر بر فشار خون لوزارتان (10mg/kg/day) به مدت ۴ هفته کاهش معنی‌داری در اندازه ناحیه انفارکت، تعداد ضربانات زودرس بطنی و اپی‌زودهای تاکی‌کاردی بطنی ایجاد می‌کند [۱۹]. اما مکانیسم اثرات محافظتی این دارو همچنان با ناشناخته‌های فراوانی روبروست همچنین ساخت عوامل درمانی که بتوانند آسیب‌های ایسکمی رپرفیوژن را به حداقل برسانند منوط به شناخت مکانیسم‌های سلولی مولکولی مسوول آسیب ایسکمی– رپرفیوژن حاد میوکارد است.

هدف از این مطالعه بررسی اثر ایسکمی– رپرفیوژن حاد

1. NADPH Oxidase

Downloaded from www.phypha.ir at 21:06 IRST on Thursday October 13th 2016

میوکارد بر میزان نسخه‌برداری ژن NOX2 در موش‌های تیمار شده با لوزارتان است.

مواد و روش ها

در این مطالعه از موش های صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم) استفاده شد. حیوانات با سیکل روشنایی – تاریکی ۱۲ ساعته، دمای حدود ۲۲ درجه سانتیگراد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

گروههای آزمایشی: ۱- گروه کنترل: در حیوانات سالم دست نخورده نمونه از بافت بطن چپ و یک نمونه از بطن راست قلب جمع آوری شد تا سطح NOX2 mRNA در بطن چپ و راست گروه‌های مورد آزمایش به ترتیب با نمونه مربوط به بطن چپ و راست گروه کنترل مقایسه گردد.

۲- گروه شم: در این گروه حیوانات مراحل جراحی را پشت سر گذاشتند اما نخی که از زیر LAD عبور کرده گره زده نمی شد به عبارتی ایسکمی ایجاد نگردید سپس نمونه بافتی بطن چپ و راست جمع آوری گردید. هدف از انجام آزمایش در این گروه بررسی اثر پروسه جراحی بدون اعمال ایسکمی بر میزان نسخه‌برداری ژن *NOX2* است.

۳- گروه ایسکمی- رپرفیوژن: ابتدا ایسکمی به مدت ۳۰ دقیقه و رپرفیوژن به مدت ۱۸۰ دقیقه اعمال گردید. سپس نمونه بافتی از ناحیه ایسکمیک بطن چپ و نمونه ای از بطن راست جمع آوری گردید.

۴- گروه لوزارتان بدون ایسکمی: حیوانات در این گروه داروی لوزارتان (شرکت داروپخش) با دوز ۱۰mg/kg/day را به مدت ۴ هفته و به روش گاواژ دریافت کردند. سپس با اعمال بیهوشی و باز کردن قفسه سینه قرار گرفته نمونه از بافت بطن چپ و یک نمونه از بطن راست قلب جمع آوری شد تا اثر مصرف لوزارتان به تنهایی بر سطح NOX2 mRNA در بطن چپ و راست مورد بررسی قرار گیرد. فاکتور اساسی در انتخاب دوز دارو عدم تاثیر دوز انتخاب شده بر فشار خون و در عین حال توانایی اعمال اثرات محافظتی در قلب بوده است. مطالعه قبل ما نیز نشان داد دوز مذکور بدون ایجاد تغییرات همودینامیکی اثرات محافظتی قابل توجهی در قلب اعمال می‌کند [۱۹].

۵- گروه لوزارتان + ایسکمی رپرفیوژن: حیوانات در این گروه داروی لوزارتان با دوز ۱۰mg/kg/day را به مدت ۴ هفته و به روش گاواژ دریافت کردند. سپس تحت ایسکمی به مدت ۳۰ دقیقه و رپرفیوژن به مدت ۱۸۰ دقیقه قرار گرفتند. در پایان دوره رپرفیوژن نمونه بافتی از ناحیه ایسکمیک بطن چپ و نمونه ای از بطن راست جمع آوری گردید.

القای مدل ایسکمی – رپرفیوژن میوکارد: پس از بیهوش کردن حیوان با تزریق ۵۰ mg/kg پنتوباربیتال سدیم، حیوان توراکوتومی شده و به ونتیلاتور متصل گردید. الکترودهای الکتروکاردیوگرافی زیر جلدی به منظور ثبت الکتروکاردیوگرام به حیوان وصل شدند. پس از باز کردن قفسه سینه در فضای بین دنده‌ای چهارم و پنجم و پاره کردن پریکارد با عبور دادن نخ ۰-۵ سیلک از زیر شریان کرونر چپ انسداد شریان به مدت ۳۰ دقیقه و سپس رپرفیوژن به مدت ۳ ساعت صورت گرفت.

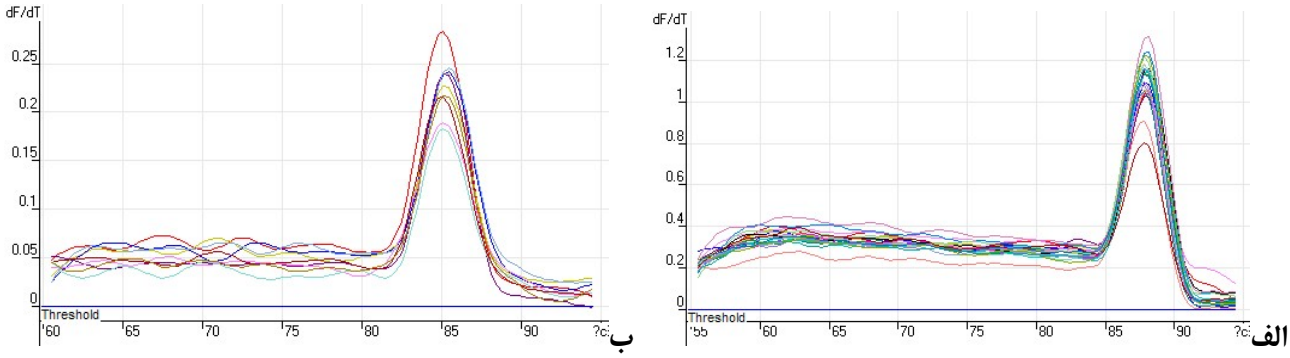
مشاهده آریتمی‌هایی چون ST elevation پس از بستن شریان تاییدی بر القای صحیح ایسکمی بود. در پایان رپرفیوژن، دوباره شریان بسته و یک میلی لیتر اوانس بلو ۵/. درصد از طریق ورید فمورال تزریق شد تا ناحیه ایسکمی را از ناحیه غیر ایسکمیک جدا کند. در پایان آزمایش قلب را خارج کرده پس از شستشو با محلول PBS سرد بلافاصله ناحیه ایسکمی را جدا نمودیم به منظور بررسی تغییرات NOX2 mRNA در ناحیه غیر ایسکمیک، ناحیه ای معادل ناحیه ایسکمیک را از بطن راست نیز جدا گردید. تمام نمونه ها در نیتروژن مایع منجمد و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند [۲۰، ۲۱].

اندازه گیری NOX2 mRNA توسط Real time-PCR: در این تحقیق ابتدا RNA بافت با استفاده از کیت مخصوص بافت فیبروز (RNeasy fibrous tissue minikit-Qiagen) استخراج گردید. جهت محاسبه غلظت RNA با استفاده از دستگاه بیوفتومتری جذب نوری رقت معینی از نمونه در طول موج ۲۶۰ نانومتر قرائت گردید. سپس طی واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم reverse transcriptase (Fermentaz) نسخه cDNA از روی RNA ساخته شد.

Downloaded from www.phypha.ir at 21:06 IRST on Thursday October 13th 2016

جدول ۱- توالی پرایمر های مورد استفاده در RT-PCR (دمای اتصال: ۶۰ °C) .

Gene	Sense primer (5'–3') / Antisense primer (5'–3')	GeneBank Accessio No. for cDNA
NOX2	CAGTGTGTCGGAATCTCCT / ATGTGCAATGGTGTGAATGG	NM_023965
β-actin	GAACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT / ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG	X03765



شکل ۱- بررسی منحنی melt ژن های NOX2 (الف) و بتا-اکتین (ب). تک قله‌ای بودن منحنی نشانه وجود یک نوع محصول است.

cDNA به دست آمده توسط RT-PCR با SYBR Green تکثیر شده و از نظر ژن های NOX2 با ژن house keeping (بتا – اکتین) مورد بررسی قرار گرفت [۲۹]. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ خلاصه شده اند. در شکل شماره ۱ منحنی‌های melting مربوط به تایید تکثیر اختصاصی ژن‌های بتا اکتین و NOX2 نیز نشان داده شده است.

آنالیز آماری: مقایسه سطح NOX2 mRNA بین گروهای کنترل، شم و ایسکمی رپرفیوژن توسط آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون متعاقب Tukey صورت گرفت. در بخش بررسی اثر داروی لوزارتان بر بیان ژن‌های مورد مطالعه به دلیل وجود دو Intervention مختلف یعنی ایسکمی و مصرف دارو از روش آماری Two way ANOVA استفاده شد در صورت معنی‌دار بودن اثر دارو برای تعیین گروه‌های دارای اختلاف Bonferroni posttests مورد استفاده قرار گرفت. $P<0.05$ ملاک معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌های مورد آزمایش در نظر گرفته شد. مقادیر به‌دست آمده به صورت S.E.M± Mean گزارش شده‌است. تعداد نمونه ها در هر گروه ۶ نمونه بوده است.

یافته ها

تغییرات همودینامیکی: همانطور که در جدول ۱ قابل مشاهده است در میزان فشار خون و ضربان قلب بین پنج گروه مختلف در حالت پایه (قبل از ایسکمی) اختلاف معنی داری وجود ندارد. به عبارتی مصرف لوزارتان نیز کاهش معنی‌داری در فشارخون و ضربان قلب ایجاد نکرد. در گروه‌هایی که تحت ایسکمی رپرفیوژن قرار گرفتند با بستن شریان فشار خون نسبت به سطح پایه به طور معنی داری کاهش می یابد. اما این کاهش گذرا بوده و فشار خون مجددا به سطح طبیعی باز می‌گردد به طوریکه بعد از ۳ ساعت رپرفیوژن که زمان جمع‌آوری نمونه‌ها است عملا اختلاف معنی داری در میزان فشار خون و ضربان قلب بین گروه های مختلف وجود ندارد.

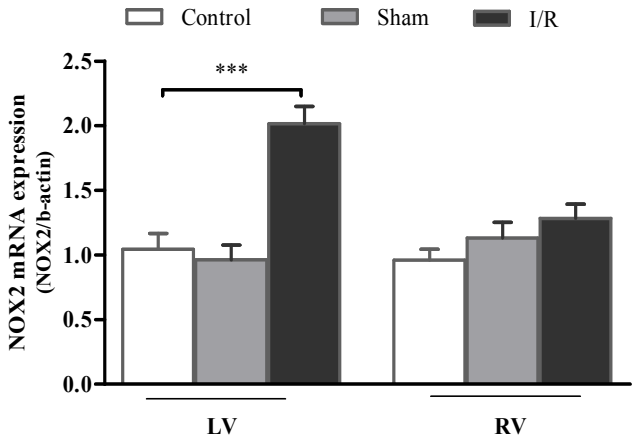
اثر ایسکمی- رپرفیوژن حاد میوکارد بر میزان نسخه‌برداری ژن *NOX2*: همانطور که شکل شماره ۲ نشان می‌دهد در بطن چپ و راست گروه شم در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی‌داری در سطح NOX2 mRNA مشاهده نمی‌شود. به دنبال ایسکمی- رپرفیوژن میوکارد سطح NOX2 mRNA در ناحیه ایسکمی بطن چپ گروه ایسکمی رپرفیوژن (IR) در مقایسه با بطن چپ گروه کنترل ۲۱ ± ۱۰۳٪ افزایش می‌یابد ($P<0.001$) درحالیکه در بطن راست گروه ایسکمی رپرفیوژن (IR) نسبت به بطن راست گروه کنترل سطح NOX2 mRNA ۴/۸± ۲۵٪ افزایش می‌یابد که از نظر آماری معنی دار نمی‌باشد (شکل۲).

اثر لوزارتان بر میزان نسخه‌برداری ژن *NOX2*:

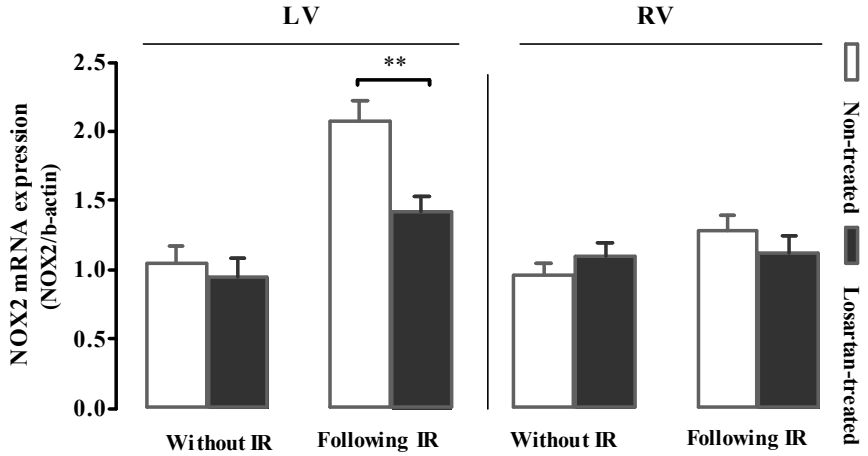
Downloaded from www.phypha.ir at 21:06 IRST on Thursday October 13th 2016

جدول ۲- تغییرات ضربان قلب (HR) و فشار متوسط شریانی (MBP) قبل (فاز پایه) و بعد (فاز ایسکمی) از بستن شریان و نیز در زمان جمع‌آوری نمونه‌ها. داده‌ها به‌صورت Mean ± S.E.M. بیان شده اند. *P<0.05 و **P<0.01 در مقایسه با وضعیت پایه در همان گروه سنجیده شده است.

Groups	Baseline		Ischemia		Sampling time	
	MBP	HR	MBP	HR	MBP	HR
Control	---	---	---	---	113±5	379±21
Sham	119 ± 8	373 ± 25	---	---	116±7	361±19
IR	115±7	358±19	84±6**	403±18	107±8	346±16
Los	104±11	382±24	---	---	99±8	397±18
Los+IR	111±6	361±15	76±8*	392±19	95±9	375±21



شکل ۲- اثر ایسکمی- رپرفیوژن میوکارد (IR) بر سطح mRNA NOX2 در بطن چپ (LV) و راست (RV). مقادیر به صورت Mean±S.E.M. گزارش شده‌اند. *** در سطح P<0.001 نسبت به بطن چپ گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۳- اثر لوزارتان بر سطح NOX2 mRNA در بطن چپ (LV) و راست (RV). مقادیر به صورت Mean±S.E.M. گزارش شده‌اند.
LV: FLosartan=17.17, P=0.21; FIschemia=41.40, P<0.001; FInteraction=10.80, P<0.05), ** P<0. 01 (Bonferroni post test)
RV: FLosartan=11.05, P=0.915; FIntervention=13.17, P=0.111; FInteraction=8.46, P=0.1956)

همانطور که اشاره شد در خصوص اثر داروی لوزارتان بر بیان ژن مورد نظر با توجه به وجود دو مداخله مجزا یعنی ایسکمی و دارو تجزیه و تحلیل نتایج توسط آنالیز واریانس دوطرفه صورت گرفت. تحلیل آماری نتایج این بخش از مطالعه نشان می‌دهد که مصرف لوزارتان به تنهایی اثر معنی‌داری بر بیان NOX2 در سطح mRNA ندارد در حالیکه در گروهی که لوزارتان

Downloaded from www.phypha.ir at 21:06 IRST on Thursday October 13th 2016

دریافت کرده و سپس تحت ایسکمی رپرفیوژن قرار گرفته‌اند تجویز لوزارتان موجب کاهش معنی‌داری در افزایش NOX2 حاصل از ایسکمی می‌گردد بطوریکه در گروه IR سطح NOX2 mRNA در ناحیه ایسکمی بطن چپ ۲۱ ± ۱۰۳٪ افزایش می‌یابد اما در گروهی که لوزارتان دریافت کرده‌اند اعمال ایسکمی تنها ۵ ±۴۱٪ افزایش در سطح mRNA NOX2 ایجاد می‌کند که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار است (P<0.01). مطالعه بیان NOX2 در سطح mRNA در بطن راست نیز نشان داد که مصرف لوزارتان بدون اعمال ایسکمی و نیز متعاقب ایسکمی رپرفیوژن اثر معنی‌داری در سطح NOX2 mRNA بطن راست ایجاد نمی‌کند (شکل ۳).

بحث

با شروع ایسکمی میوکارد سطح وسیعی از پروتئین‌ها در سطح نسخه‌برداری و یا ترجمه دستخوش تغییر می‌گردند که شناخت این تغییرات به منظور ساخت داروهای کارامدتر در درمان آسیب ایسکمی حاد میوکارد ضروری است. نتایج این مطالعه نشان داد که به دنبال ایسکمی – رپرفیوژن میوکارد سطح NOX2 mRNA در ناحیه ایسکمی بطن چپ به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. به منظور شناسایی ناحیه ایسکمی از رنگ‌آمیزی با اوانس بلو استفاده نمودیم بدین صورت که در پایان رپرفیوژن، مجدداً شریان LAD بسته شده و یک میلی لیتر اوانس بلو ۰/۵٪ از طریق کانول ورید فمورال به داخل ورید تزریق می‌شد تا ناحیه ایسکمی را از ناحیه غیر ایسکمیک مشخص سازد. با توجه به اینکه هدف از رنگ‌آمیزی صرفا مشخص ساختن ناحیه ایسکمی بود بنابراین از رقت کم رنگ استفاده کردیم تا اختلال کمتری در بررسی‌های مولکولی ایجاد نماید در واقع بعد از تزریق رنگ ناحیه ایسکمی عملا فاقد رنگ است بنابراین مطالعات مولکولی در این ناحیه با آرامش خاطر انجام می‌گیرد اما بخش دیگری از مطالعه ما به بررسی تغییرات مولکولی در ناحیه غیر ایسکمی دور از ناحیه ایسکمی اختصاص یافت تا بتوان موضعی و یا فراگیر بودن اثر ایسکمی بر بیان پروتئین‌های مورد نظر را نیز مورد ارزیابی قرار داد بنابراین نمونه‌ای از بطن راست که از نظر آناتومیکی حتی الامکان معادل ناحیه ایسکمی بطن چپ باشد نیز جدا نمودیم طبیعی است که این ناحیه رنگ آمیزی می‌شود بنابراین باید با تامل بیشتری مطالعات مولکولی خود را در این ناحیه انجام می‌دادیم. بدین منظور مطالعه پایلوتی بر روی دو گروه (n=5) از نمونه‌های بدون رنگ و رنگ‌آمیزی شده انجام دادیم و بیان ژن بتا- اکتین و *NOX2* را در آنها مقایسه کردیم نتایج حاصل از این مطالعه ابتدایی به خوبی نشان داد که رنگ‌آمیزی با اوانس‌بلو اختلالی در انجام تکنیک RT-PCR ایجاد نمی‌کند. جهت بررسی تغییرات سطح mRNA ژن مورد مطالعه از بتا اکتین به عنوان ژن house keeping استفاده شد که در مطالعات بسیاری برای مقایسه تغییرات سطح NOX2 mRNA مورد استفاده قرار گرفته است توالی پرایمرهای مورد استفاده و اندازه قطعه Product نیز توسط نرم افزار Gene Runner کنترل گردید.

همانطور که اشاره شد در گروه شم که پروسه جراحی را بدون بستن LAD پشت سر گذاشته‌اند تغییر معنی‌داری در سطح NOX2 mRNA ایجاد نگردید که بیانگر عدم تاثیر پروسه جراحی بر بیان ژن مورد نظر است. همچنین بر اساس اطلاعات ارائه شده در جدول شماره ۲ متغیرهای همودینامیکی شامل فشار خون و ضربان قلب در زمان جمع‌آوری نمونه‌ها در بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد بنابراین تغییرات مشاهده در میزان نسخه‌برداری ژن *NOX2* مستقل از تغییرات همودینامیکی ناشی از ایسکمی رپرفیوژن رخ داده و در اصل حاصل اثرات سلولی پدیده ایسکمی رپرفیوژن میوکارد می‌باشد. اعمال ایسکمی – رپرفیوژن سطح NOX2 mRNA را در ناحیه ایسکمی افزایش می‌دهد. این اثر محدود به ناحیه ایسکمی بطن چپ بوده و در بطن راست قابل مشاهده نمی‌باشد بنابراین افزایش میزان نسخه‌برداری NOX2 را می‌توان اثری موضعی دانست. نتیجه این بخش از تحقیق با مطالعه Wan و همکارانش همخوانی دارد آنها نشان دادند که اعمال ایسکمی به مدت ۳۰ دقیقه و رپرفیوژن به مدت ۱۲ ساعت در قلب خرگوش موجب افزایش سطح mRNA و پروتئین NOX2 می‌گردد [۲۷]. در مطالعه ما با وجود زمان کوتاهتر رپرفیوژن افزایش سطح NOX2 mRNA کاملا قابل مشاهده است هرچند در مطالعه ما تغییرات NOX2 در سطح پروتئین مورد ارزیابی قرار نگرفت. در نمونه قلبی گرفته شده از بیمارانی که در اثر MI فوت کرده بودند نیز سطح پروتئین

Downloaded from www.phypha.ir at 21:06 IRST on Thursday October 13th 2016

NOX2 در ناحیه ایسکمی افزایش یافته بود اما در ناحیه غیر ایسکمیک تغییری در سطح NOX2 مشاهده نگردید لازم به ذکر است در مطالعه مذکور حداقل فاصله زمانی بعد از مرگ و برداشتن نمونه قلبی ۱۲ ساعت بود [۹]. بنابراین افزایش میزان نسخه‌برداری ژن *NOX2* به عنوان یک پاسخ زودرس به ایسکمی حاد میوکارد رخ می‌دهد. مکانیسم های مختلفی می‌توانند به افزایش سطح *NOX2* منجر شوند. در اکثر مطالعات عواملی که به طور حاد پروتئین‌های NOX را فعال می کنند غالباً بیان آنها را نیز تحریک می‌کنند. ROS از مهمترین عوامل افزایش بیان پروتئین‌های NOX است. وجود توالی پاسخ‌دهنده به عوامل مرتبط با ROS (Stress-responsive element) در ناحیه پروموتور ژن *NOX2* حاکی از تنظیم مستقیم میزان نسخه‌برداری NOX توسط عوامل استرس اکسیداتیو می‌باشد [۱،۳]. مکانیسم دیگر برای افزایش سطح *NOX2* تجمع سلولهای التهابی و فعال شدن مسیرهای التهابی است مطالعات نشان داده است که بین سطح فاکتورهای التهابی مانند NFκB، TGFβ-1 و TNFα و میزان بیان NOX2 رابطه مستقیم وجود دارد [۱۰]. فعال شدن مسیرهای التهابی در پاتولوژی ایسکمی رپرفیوژن میوکارد نقش مهمی ایفا می‌کند بنابراین ممکن است یکی دیگر از دلایل بروز پاسخ مربوطه مشارکت مسیرهای التهابی در کاردیومیوسیت‌ها باشد.

در مطالعه ما لوزارتان توانست به طور قابل توجهی افزایش بین NOX2 را در طی ایسکمی رپرفیوژن میوکارد سرکوب کند بنابراین می‌توان یکی از مکانیسم‌های اعمال اثرات محافظتی داروهای مذکور در برابر آسیب ایسکمی رپرفیوژن میوکارد را پیشگیری از افزایش نسخه‌برداری NOX2 در طی ایسکمی دانست. یکی از نکات قابل توجه در این مطالعه استفاده از دوز غیر موثر بر فشار خون دلروی لوزارتان است با توجه به اینکه مصرف لوزارتان به مدت ۴ هفته کاهش معنی‌داری در فشار خون ایجاد نکرد می توان چنین نتیجه‌گیری نمود که اثر لوزارتان بر کاهش میزان نسخه‌برداری ژن NOX2 مستقل از اثرات همودینامیکی دارو بوده و با عملکرد دارو در سطح سلولی همراه می‌باشد که به نوبه خود تائید کننده مطالعاتی است که نشان داده‌اند داروهای مهار کننده سیستم رنین آنژیوتانسین و به ویژه لوزارتان میتوانند با بروز اثرات مسقیم در سطح سلولی و مولکولی اثرات محافظتی در سیستم قلبی عروقی اعمال کنند [۲۶،۳۰،۲۴]. در خصوص تفسیر نتایج مشاهده شده ممکن است بخشی از اثر لوزارتان در کاهش سطح NOX2 mRNA ناشی از مهار اثر القاکنندگی آنژیوتانسین II باشد اما با توجه به اینکه داروهای مذکور می‌توانند کاملا مستقل از اثر مهاری بر عملکرد سیستم رنین آنژیوتانسین اثرات محافظتی خود را در سیستم قلبی عروقی اعمال کنند بنابراین دست‌یابی به مکانیسم دقیق اثر لوزارتان در مهار نسخه‌برداری از NOX2 در بافت ایسکمیک میوکارد مستلزم مطالعات دقیق‌تر خواهد بود. گزارش‌های دیگری مبنی بر اثر داروهای مهار کننده سیستم رنین آنژیوتانسین بر بیان و فعالیت NOX در سیستم قلبی عروقی ارائه شده است در برخی مطالعات اثر داروهای مذکور بر میزان فعالیت NADPH اکسیداز مورد بررسی قرار گرفته است مطالعات قبل کاهش فعالیت NADPH اکسیداز توسط لوزارتان را نشان داده‌اند. لوزارتان ترانس لوکاسیون P_{47} را مهار کرده و در نتیجه فعالیت NADPH اکسیداز را کاهش می‌دهد. مکانیسم دیگر اثر لوزارتان در کاهش فعالیت NADPH اکسیداز مهار PKC است زیرا PKC برای فسفریله شدن P_{47} و فعال شدن NADPH اکسیداز ضروری است [۷، ۲۸]. در مطالعه ما میزان فعالیت NADPH مورد ارزیابی قرار نگرفت اما شواهد بسیاری وجود دارد که عوامل موثر بر فعالیت NADPH اکسیداز غالباً میزان بیان اجزای این کمپلکس آنزیمی به ویژه NOX را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهند. به عنوان مثال در موش‌های هایپرتانسیو سطح mRNA زیرواحد P22 در بطن چپ افزایش می‌یابد و مصرف کاپتوپریل (مهارکننده ACE) آن را به سطح طبیعی باز می‌گرداند [۱۶]. همچنین در عروق کلیه افراد مبتلا به هایپرتانسیون نیز سطح بیان NADPH اکسیداز در عروق کلیه افزایش می‌یابد مصرف لوزارتان به مدت ۷ روز باعث کاهش مجدد سطح mRNA اجزای NADPH اکسیداز می‌گردد [۱۷]. در مطالعه Robert و همکارانش نیز مصرف لوزارتان با دوز مشابه مطالعه ما (10mg/kg/day) و به مدت مشابه (۴ هفته) سطح NOX2 mRNA را در قلب کاهش داد البته آنها اثر لوزارتان را در پاسخ به افزایش سطح NOX2 mRNA ناشی از مصرف آنژیوتانسین مورد بررسی قرار دادند [۳۲]. بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که در پاسخ به ایسکمی- رپرفیوژن حاد

میوکارد به طور زودرس میزان نسخه‌بـرداری از ژن *NOX2* در ناحیه ایسکمی افزایش می‌یابد این افـزایش محـدود بـه ناحیـه ایسکمی بطن چپ بوده و در بطن راست رخ نمی‌دهد. افـزایش نسخه‌برداری NOX2 می توانـد از مکانیسـم هـای پـاتولوژی ایسکمی حاد میوکارد باشد و مصرف داروی لوزارتان از افـزایش NOX2 در ناحیه ایسکمی جلوگیری می‌کند که طبیعتاً به نفـع بافت میوکارد رقم خواهد خورد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. از جناب آقای دکتر نقـدی جهـت تهیـه داروی لوزارتـان تقـدیر مـی گـردد. همچنین از مشاوره علمی و موثر جناب آقای دکتر مـانی اسـتادیار محتـرم گروه فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس نیز تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

[1] Bedard K, Krause KH, The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases. Physiology and pathophysiology. ***Physiol Rev*** 87(2007) 245-313.

[2] Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM, Pivotal role of a gp91 (phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. ***Circulation*** 105 (2002) 293-6.

[3] Brandes RP, Weissmann N, Schröder K, NADPH oxidases in cardiovascular disease. ***Free Radic Biol Med*** 49 (2010) 687-706.

[4] Brann DW, Raz L, Zhang QG, Zhou CF, Han D, Gulati P, Yang LC, Yang F, Wang RM. Role of Rac1 GTPase in NADPH oxidase activation and cognitive impairment following cerebral ischemia in the rat. PLoS One 2010; 5(9): 12606.

[5] Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, Li JM, Gove C, Lambeth JD, Cave AC, Shah AM Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. ***Circ Res*** 93(2003) 802-5.

[6] Duerrschmidt N, Wippich N, Goettsch W, Broemme HJ, Morawietz H.Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. ***Biochem Biophys Res Commun*** 26992000) 713-17.

[7] Fortuño A, Bidegain J, Robador PA, Hermida J, López-Sagaseta J, Beloqui O, Díez J, Zalba G. Losartan metabolite EXP3179 blocks NADPH oxidase-mediated superoxide production by inhibiting protein kinase C: potential clinical implications in hypertension. ***Hypertension*** 54(2009) 744-50.

[8] Hoffmeyer MR, Jones SP, Ross CR, Sharp B, Grisham MB, Laroux FS, Stalker TJ, Scalia R, Lefer DJ. Myocardial ischemia/reperfusion injury in NADPH oxidase-deficient mice. ***Circ Res*** 27 (2000) 812-7.

[9] Krijnen PA, Meischl C, Hack CE, Meijer CJ, Visser CA, Roos D, Niessen HW. Increased Nox2 expression in human cardiomyocytes after acute myocardial infarction. ***J Clin Pathol*** 56 (2003) 194-9.

[10] Katsuyama M. NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme: its transcriptional regulation and physiological roles. ***J Pharmacol Sci*** 114(2010) 134-46.

[11] Landmesser U, Doerries C, Grote K, Hilfiker-Kleiner D, Luchtefeld M, Schaefer A, Holland SM, Sorrentino S, Manes C, Schieffer B, Drexler H. Critical role of the NAD(P)H oxidase subunit p47phox for left ventricular remodeling/dysfunction and survival after myocardial infarction. ***Circ Res*** 100 (2007) 894-903.

[12] Li JM, Shah AM, Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II, Role of the p47phox subunit. ***J Biol Chem*** 278(2003) 12094-100.

[13] Li JM, Mullen AM, Yun S, Wientjes F, Brouns GY, Thrasher AJ. Essential role of the NADPH oxidase subunit p47(phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor-alpha. ***Circ Res*** 909 (2002) 143-50.

[14] Li J M, Gall N P, Grieve D J, Chen M, Shah A M. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. ***Hypertension*** 40 (2002) 477-84.

[15] Looi YH, Grieve DJ, Siva A, Walker SJ, Anilkumar N, Cave AC, Marber M, Monaghan MJ, Shah AM. Involvement of Nox2 NADPH oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. ***Hypertension*** 51(2008) 319-25.

Downloaded from www.phypha.ir at 21:06 IRST on Thursday October 13th 2016

Downloaded from www.phypha.ir at 21:06 IRST on Thursday October 13th 2016

[16] Miguel-Carrasco JL, Zambrano S, Blanca AJ, Mate A, Vázquez CM. Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF-kB. ***J Inflamm (Lond)*** 12 (2010) 7-21.

[17] Polizio AH, Balestrasse KB, Gornalusse GG, Gorzalczany SB, Santa-Cruz DM, Yannarelli GG, Peña C, Tomaro ML. Losartan exerts renoprotection through NAD (P) H oxidase downregulation in a renovascular model of hypertension. ***Regul Pept*** 7 (2009) 28-33.

[18] Rivera J, Sobey CG, Walduck AK, Drummond GR. Nox isoforms in vascular pathophysiology insights from transgenic and knockout mouse models. ***Redox Rep*** 15 (2010) 50-63.

[19] Safari F, Hajizadeh S, Shekarforoush Sh, Bayat Gh, Foadoddini M, Khoshbaten A**.** Influence of ramiprilat and losartan on ischemia reperfusion injury in rat hearts. ***JRAAS***, Article in press.

[20] Safari F, Hajizadeh S, Shekarforoush Sh, Forouzandeh M, Bayat Gh, Foadoddini M, Khoshbaten A**.** Effects of pretreatment with non hypotensive dose of ramiprilat and losartan on myocardial ischemia-reperfusion induced arrhythmias and infarct size in rats. ***Physiol and Pharmacol*** 15 (2011) 116-23**.**

[21] Samsamshariat SA, Samsamshariat ZA, Movahed MR. A novel method for safe and accurate left anterior descending coronary artery ligation for research in rats. ***Cardiovasc Revasc Med*** 6 (2005) 121-3.

[22] Selemidis S, Sobey CG, Wingler K, Schmidt HH, Drummond GR, NADPH oxidases in the vasculature molecular features roles in disease and pharmacological inhibition. 120 (2008) 254-91.

[23] Sica DA, Gehr TW, Ghosh S. Clinical pharmacokinetics of losartan. ***Clin Pharmacokinet*** 44(2005) 797–814.

[24] Sladek T, Sladkova J, Kolar F, The effect of AT1 receptor antagonist on chronic cardiac response to coronary artery ligation in rats. ***Cardiovas Res*** 31 (1996) 568-76.

[25] Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries regulation by angiotensin II. ***Circ Res*** 90 (2002) 1205-13.

[26] Unger T, Targeting cardiovascular protection: the concept of dual Renin-Angiotensin system control. ***Medscape J Med*** 10 (2008) S4.

[27] Wan LL, Xia J, Ye D, Liu J, Chen J, Wang G. Effects of quercetin on gene and protein expression of NOX and NOS after myocardial ischemia and reperfusion in rabbit. ***Cardiovasc Ther*** 27 (2009) 28-33.

[28] Wenzel P, Schulz E, Münzel T. Protein kinase C-inhibiting properties of the losartan metabolite EXP3179 make the difference. ***Hypertension*** 54 (2009) 707-9.

[29] Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Jr, Statistical analysis of real-time PCR data. ***Bioinformatics*** 22 (2006) 7-85.

[30] Zaman MA, Oparil S, Calhoun DA: Drugs targeting the rennin-angiotensin-aldosterone system. ***Nature*** 1 (2002) 621-63039-6.

[31] Zhao W, Zhao D, Yan R, Sun Y. Cardiac oxidative stress and remodeling following infarction.role of NADPH oxidase. ***Cardiovasc Pathol*** 25 (2008) 511-16.

[32] Zhao W, Ahokas RA, Weber KT, Sun Y. ANG II-induced cardiac molecular and cellular events: role of aldosterone. ***Am J Physiol Heart Circ Physiol*** 291 (2006): H336-43.

[33] Zhu BQ, Sun YP, Sievers RE, Browne A, Lee R, Effects of different durations of pretreatment with losartan on myocardial infarct size, endothelial function, and vascular endothelial growth factor. ***JRAAS*** 2 (2001) 129-33.