



Role of oxidative stress in the aortic constriction-induced ventricular hypertrophy in rat

Zahra Jahanbakhsh¹, Mohammad Taghi Mohammadi^{1*}, Mahvash Jafari², Ali Khoshbaten¹, Maryam Salehi³

1. Dept. Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Dept. Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 4 May 2012

Accepted: 12 June 2012

Abstract

Introduction: Severe abdominal aortic constriction above the renal arteries induces arterial hypertension above the stenotic site that is the cause of cardiac hypertrophy. Previous studies have shown that high blood pressure induces myocardial oxidative stress with conflicting results. In the present study, we assessed the effects of acute hypertension on the myocardial oxidative stress and its relation with cardiac hypertrophy.

Methods: Experiments were performed on two groups of rats, sham and hypertensive (n=5 each group). Rats were made acutely hypertensive by aortic constriction above the renal arteries. After 10 days, the carotid artery pressure of rats was recorded and hearts were removed. Following tissue homogenization, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, as well as glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels were determined by biochemical methods in heart tissues.

Results: Arterial pressure and cardiac hypertrophy index (heart weight/body weight, g/kg) were increased in hypertensive rats 66% and 74%, respectively. SOD and CAT activity were significantly higher in hypertensive rats (34.42±2.51 and 38.63±4.03 U/mg protein, respectively) compared to sham animals (28.58±0.28 and 23.27±2.13 U/mg protein, respectively). Aortic-banding significantly increased GSH content of myocardium by 47%, and there was not any significant difference in the myocardial MDA between the two groups.

Conclusion: The findings of this study indicate that acutely elevated arterial blood pressure induces cardiac hypertrophy concomitant with oxidative stress in rat myocardium. This study also reconfirms that oxidative stress may play an important role in the development of cardiac hypertrophy during hypertension.

Key words: coarctation, arterial hypertension, oxidative stress, hypertrophy

* Corresponding author e-mail: Mohammadimohammadt@bmsu.ac.ir
Mohammadi.mohammadt@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

بررسی نقش استرس اکسیداتیو در هیپرتروفی میوکارده ناشی از تنگی آئورت در موش صحرایی

زهرا جهانبخش^۱، محمد تقی محمدی^{۱*}، مهوش جعفری^۲، علی خوش باطن^۱، مریم صالحی^۳
۱. گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران
۲. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران
۳. مرکز آسیب های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران
دریافت: ۱۵ فروردین ۹۱ پذیرش: ۲۳ خرداد ۹۱

چکیده

مقدمه: تنگی آئورت شکمی در بالای شریانهای کلیه موش صحرایی موجب بروز پرفشاری شریانی در قسمتهای بالای تنگی گردیده که باعث هایپرتروفی قلب میشود. پرفشاری شریانی با نتایج متضاد بر استرس اکسیداتیو تاثیر میگذارد. در مطالعه حاضر سعی شده اثرات پرفشاری حاد بر روی استرس اکسیداتیو و ارتباط آن با هایپرتروفی قلب بررسی گردد.

روش ها: جهت انجام آزمایش، موشهای صحرایی به صورت تصادفی در دو گروه شاهد و پرفشار شریانی تقسیم شدند (هر گروه n=۵). جهت القای پرفشاری از روش تنگی آئورت در بالای شریانهای کلیه استفاده گردید. بعد از ده روز، فشار شریانی ثبت و بطن چپ جدا شد. پس از هموژن کردن بافتها، فعالیت آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، غلظت گلوتاتیون (GSH) و مالون دی آلدئید (MDA) میوکارده بطن چپ تعیین شد.

یافته ها: در گروه پرفشار میانگین فشار شریانی و شاخص هایپرتروفی قلبی (وزن قلب به وزن بدن، g/kg) به ترتیب به میزان ۶۶ و ۷۴ درصد افزایش یافت. فعالیت آنزیم SOD و CAT در گروه پرفشار (به ترتیب ۳۴/۴۲±۲/۵۱ و ۳۶/۶۳±۴/۰۳) در مقایسه با گروه شاهد (به ترتیب ۲۸/۸۵±۰/۲۸ و ۲۳/۲۷±۲/۱۳) U/mg protein به طور معنی داری افزایش پیدا کرد. سطح گلوتاتیون میوکارده بطن چپ حیوانات پرفشار در مقایسه با گروه شاهد ۴۷ درصد افزایش داشت، اما سطح MDA تفاوت معنی داری در دو گروه نشان نداد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان میدهد افزایش فشار شریانی حاد منجر به استرس اکسیداتیو و هایپرتروفی در عضله میوکارده موش صحرایی شده و به نظر می رسد استرس اکسیداتیو نقش تحریکی در ایجاد هایپرتروفی قلب داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: کوآرکتاسیون آئورت، پرفشاری شریانی، پاسخ استرس اکسیداتیو، هایپرتروفی

مقدمه

از مشکلات عمده بهداشتی-درمانی در سطح جهان بوده و علت یک هشتم مرگ و میر ها به حساب می آید [۱۴]. پرفشاری شریانی یک حالت پیچیده پاتوفیزیولوژیک بوده و به مرور زمان باعث ایجاد تغییرات آسیب رسان در بافت های بدن منجمله قلب می شود. این تغییرات از طرفی خود باعث صدمه به بافت قلب شده و از طرفی میزان وقوع ایسکمی و حمله های قلبی را افزایش می دهد [۹، ۱۳].

مطالعات اولیه صورت گرفته توسط گایتون نشان می دهد

بیماری پرفشاری شریانی (Arterial hypertension) یکی

* نویسنده مسئول مکاتبات:

Mohammadimohammadt@bmsu.ac.ir
Mohammadi.mohammadt@yahoo.com
www.phypha.ir/ppj

وبگاه مجله:

رابطه با پرفشاری حاد وجود داشته که نیاز به پاسخ دارد. از طرفی چون مطالعه Polizio و همکارانش نشان داده که انسداد کامل آئورت شکمی در بین شریان های کلیه در موش صحرایی علاوه بر ایجاد هیپرتروفی قلب سبب بروز پاسخ استرس اکسیداتیو در بافت قلب و اریتروسیت ها شده [۱۵]، به نظر می رسد بین این دو متغیر رابطه ای وجود داشته باشد. بر این اساس مطالعه حاضر در نظر داشت اثرات پرفشاری شریانی حاد بر تغییر فعالیت آنزیم های در گیر در سیستم آنتی اکسیدانی و بروز استرس اکسیداتیو در موش صحرایی را بررسی نماید. از آنجایی که مدل بکار رفته پرفشاری شریانی احتمالا سبب ایجاد هیپرتروفی قلب خواهد شد در این مطالعه سعی شده تا رابطه بین بروز استرس اکسیداتیو و هیپرتروفی قلب نیز مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

در این مطالعه از موش های صحرایی نر نژاد ویستار (Wistar) تهیه شده از حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله با محدوده وزنی ۲۸۰-۳۲۰ گرم استفاده شد. تمامی آزمایشها طبق مقررات اخلاقی کار با حیوانات مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله انجام گردید. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی، رطوبت تابع شرایط رطوبتی هوای آزاد، درجه حرارت $22 \pm 2^{\circ}C$ و با دسترسی آزاد به آب و غذا در طی دوره آزمایش نگهداری می شدند.

جهت القای پرفشاری شریانی حاد (Acute Hypertension, AHTN) از روش تنگی آئورت شکمی (Abdominal aortic coarctation) استفاده گردید [۲]. برای انجام این کار بعد از بیهوش کردن حیوان با ترکیب کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) سمت چپ شکم تراشیده و کاملا ضد عفونی می شد. با باز کردن شکم در ناحیه سمت چپ و کنار زدن سایر بافت ها و احشاء شکم، آئورت شکمی را در بالای دو شریان کلیه راست و چپ از بافت های اطراف پاک سازی نموده و برای ایجاد تنگی مناسب با کمک نخ جراحی آماده می شد. در این مرحله در بالای محل جدا شدن شریان های کلیوی، آئورت شکمی به اندازه مورد نظر

تنگی آئورت شکمی در موش صحرایی در بالای شریان های کلیه موجب بروز پرفشاری شریانی در قسمت های فوقانی بدن نسبت به محل تنگ شده می گردد [۶]. بر پایه مطالعه Lai و همکاران این مدل پرفشاری شریانی سبب هیپرتروفی در قلب می شود [۱۰]. به نظر می رسد غیر از پاسخ فیزیولوژیک قلب به افزایش بار قلبی، زیاد شدن غلظت بعضی از فاکتور ها در گردش خون از جمله اندوتلین، کاتکول آمین ها، و آنژیوتانسین II- در این امر دخیل باشند [۴، ۱۹]. از آنجایی که نتایج بعضی از مطالعات اخیر نشان می دهد تشکیل گونه های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species, ROS) در برخی از مدل های آزمایشگاهی پرفشاری شریانی افزایش یافته و منجر به بروز استرس اکسیداتیو در بافت های بدن می شود [۲۵]. در حالت طبیعی بدن بین تولید رادیکال های آزاد و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی تعادل برقرار است. عدم تعادل در میزان تولید رادیکال های آزاد و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی سبب بوجود آمدن استرس اکسیداتیو می شود [۷]. سیستم آنتی اکسیدانی بواسطه سیستم آنزیمی، دفاع اصلی بدن در برابر آسیب ناشی از رادیکال های آزاد بوده که آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase, SOD) و کاتالاز جزئی از آن به شمار می روند [۱۸]. از طرفی گلوتاتیون مهمترین آنتی اکسیدان غیر آنزیمی بوده که با استرس اکسیداتیو مقابله می کند [۱۱].

نتایج تحقیق Ungvari و همکارانش نشان می دهد القای پرفشاری شریانی با تنگی آئورت به صورت مزمن سبب بروز استرس اکسیداتیو در اندام های فوقانی شده و میزان تولید آنیون سوپراکسید در عروق این اندام ها زیاد می شود [۲۵]. همچنین در مطالعه دیگری که بواسطه تنگی آئورت در بالای شریان های کلیه ایجاد شده میزان بیان ژن آنزیم های آنتی اکسیدانی از جمله SOD، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در دیواره آئورت افزایش داشته است [۲۰]. این نتایج تایید کننده این مطلب بوده که پرفشاری شریانی سبب بروز استرس اکسیداتیو در بافت های در معرض فشار خون بالا شده است. اما این سوال وجود دارد آیا القای پرفشاری شریانی در بافت قلب هم سبب بروز استرس اکسیداتیو می شود؟ گرچه در مطالعه Jacob تنگی آئورت در حالت مزمن سبب تغییر در آنزیم های استرس اکسیداتیو قلب شده [۸]، با این حال هنوز سوالاتی در

مورد نظر [فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase, SOD)، کاتالاز (Catalase, CAT) و سطح مالون دی آلدئید (Malondialdehyde, MDA) و گلوتاتیون (Glutathione, GSH)] استفاده شد.

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم SOD از روش Winterbourn استفاده شد [۲۶]. ۰/۲ میلی لیتر EDTA ۰/۱ مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی مولار، ۰/۱ میلی لیتر نیتروبلوترازولوم (NBT) ۱/۵ میلی مولار و ۲۰۰ میکرولیتر بافت هموزنه (یا بافر برای کنترل) به یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس ۰/۰۵ میلی لیتر ربیوفلاوین ۰/۱۲ میلی مولار در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۶۷ مولار pH=۷/۸ اضافه و به مدت ۱۲ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده شد. سپس جذب در طی ۵ دقیقه در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد. یک واحد فعالیت SOD مقدار آنزیمی که نیاز است تا ۵۰ درصد از سرعت احیاء NBT مهار شود. فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Abei استفاده شد [۱]. به حجم معینی از عصاره بافتی، اتانول مطلق (۰/۱ ml/ml) اضافه شد و مدت ۳۰ دقیقه در یخ اینکوبه گردید. سپس تریتون ۱۰۰-X ده درصد با غلظت نهایی یک درصد اضافه شد. این محلول جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم بکار برده شد. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ ml H₂O₂ ۳۰ میلی مولار به نمونه بافتی در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار pH=۷ شروع شد. سپس جذب در طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. یک واحد فعالیت کاتالاز مقدار یک میکرومول از H₂O₂ که در یک دقیقه تجزیه می شود. فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

برای سنجش میزان گلوتاتیون بافت از روش Tietz استفاده شد [۲۲]. غلظت مناسبی از نمونه هموزنه با ۱۰ میکرولیتر اسیدسولفوسالسیلیک ۵ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته به ۸۱۰ میکرولیتر دی سدیم فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن ۹۰ میکرولیتر معرف دی تیو- بیس - نیتروبنزوئیک اسید (DTNB) ۰/۴ درصد محلول در سیترات سدیم ۱ درصد

تنگ می گردید. میزان تنگی آئورت شکمی توسط یک نیدیل شماره G-۲۳ که قبلاً برای این کار آماده شده بود تعیین می گردید. بدین صورت که ابتدا نیدل به طور موازی با شریان آئورت شکمی قرار داده شده و با استفاده از نخ سیلک ۳-۰ گره محکمی ایجاد می گردید، به طوری که جریان خون به طور کامل قطع شود. سپس نیدل با دقت و به آرامی از وسط گره خارج می گردید. بر اساس تجربه، تنگی حدوداً بالای ۹۰ درصد با این روش ایجاد می شد و جریان خون اندام های تحتانی تا حدی که نکروز بافتی ایجاد نشود کاهش می یافت. بعد از حصول اطمینان از انسداد نسبی آئورت شکمی، کمی پودر پنی سیلین G- در محل جراحی پاشیده شده و ناحیه باز شده توسط نخ بخیه دوخته و حیوان تا خاتمه بیهوشی در یک محیط گرم نگهداری می شد. سپس حیوان به محل نگهداری خود برگردانده می شد. در پایان ۱۰ روز جهت حصول اطمینان از ایجاد پرفشاری شریانی بعد از بیهوشی کاروتید مشترک کانول گذاری می گردید و فشار خون شریانی از طریق شریان کاروتید اندازه گیری می شد.

پروتکل و گروههای آزمایش در این طرح به صورت زیر انجام شد و حیوانات مورد نظر به صورت تصادفی در ۲ گروه به شرح زیر قرار گرفتند:

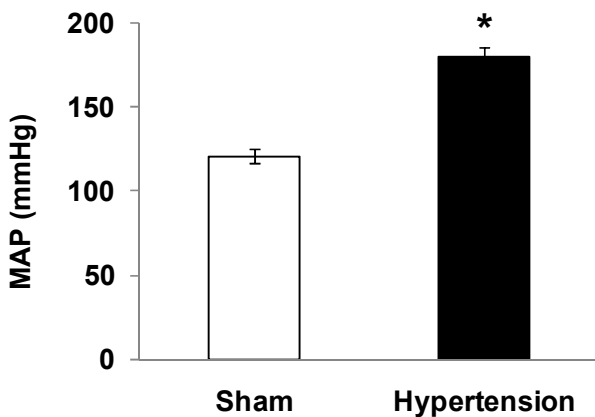
۱- گروه شاهد: حیوانات این گروه در روز اول تحت جراحی شکم (جهت القای کوآرکتاسیون آئورت شکمی) قرار گرفته اما تنگی آئورت شکمی انجام نشد. حیوانات این گروه به عنوان شاهد جراحی مورد استفاده قرار گرفتند.

۲- گروه پرفشاری شریانی: حیوانات این گروه در روز اول تحت جراحی شکم (جهت القای کوآرکتاسیون آئورت شکمی) قرار گرفته و تنگی آئورت شکمی در بالا شریان های دو کلیه صورت گرفت.

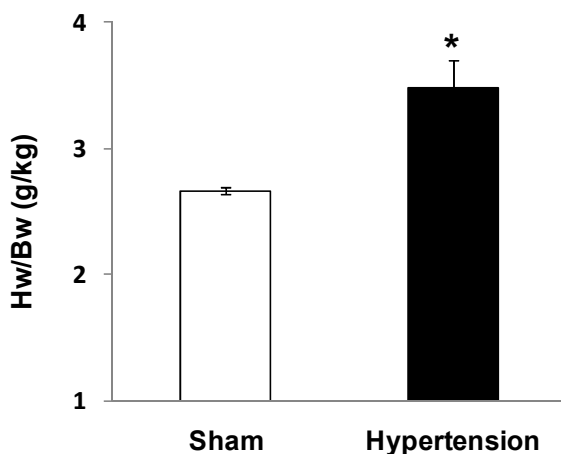
در پایان ۱۰ روز پروسه آزمایش تمامی حیوانات بعد از اندازه گیری وزن بدن تحت بیهوشی قرار گرفته و بعد از ثبت فشار خون شریانی بافت قلب جدا گردیده و پس اندازه گیری وزن آن به سرعت به داخل نیتروژن مایع و سپس به فریزر ۸۰- انتقال پیدا کرد. در روز آزمایش، بافت های منجمد شده به دقت توزین و به نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات سالین هموزنه شد. پس از آن نمونه ها در ۱۴۰۰ g در ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. از محلول رویی جهت سنجش شاخص های بیوشیمیایی

یافته ها

میانگین متوسط فشار خون شریانی در حیوانات گروه پرفشار و شاهد در شکل ۱ آمده است. مقایسه آماری این داده‌ها در پایان ۱۰ روز تنگی آئورت شکمی تفاوت معنی داری را نشان داد. به طوری که تنگی آئورت سبب افزایش فشار خون شریانی به میزان ۶۶ در صد در گروه پرفشار شریانی در مقایسه با گروه شاهد شده است. میزان فشار خون شریانی در گروه شاهد و گروه پرفشار شریانی به ترتیب 120 ± 4 و 180 ± 5 mm.Hg بود.



شکل ۱- تغییرات متوسط فشار خون شریانی (Mean arterial pressure, MAP) بعد از گذشت ۱۰ روز از تنگی آئورت شکمی. داده‌ها به صورت Means ± SEM نشان داده شده است. * نشانگر تفاوت معنی دار با $P < 0.05$ در مقایسه با گروه شاهد.

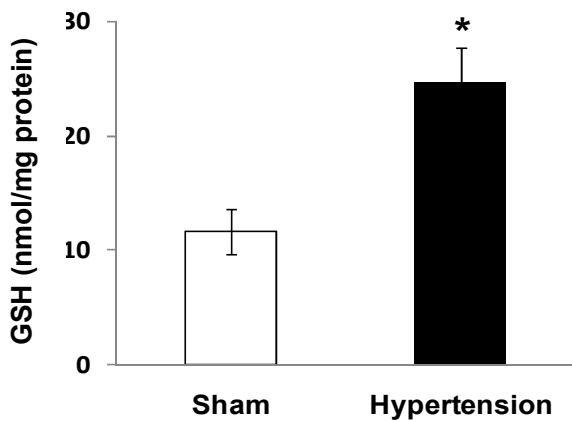


شکل ۲- اثرات بالا بودن فشار خون شریانی بمدت ۱۰ روز بر نسبت وزن قلب، گرم، (Heart weight, Hw) به وزن بدن، کیلوگرم، (Body weight, Bw). داده‌ها به صورت Means ± SEM نشان داده شده است. * نشانگر تفاوت معنی دار با $P < 0.05$ در مقایسه با گروه شاهد.

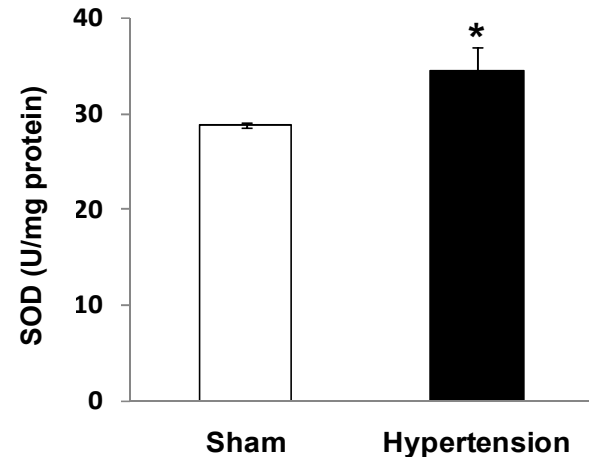
واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوکاتینون ۱ میلی گرم بر میلی لیتر منحنی استاندارد گلوکاتینون رسم گردیده و غلظت گلوکاتینون بر حسب نانومول بر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید. محلول استاندارد گلوکاتینون در غلظت‌های ۲۰۰ - ۲۵ میکرو مولار تهیه شد.

برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها میزان مالون دی آلدئید (MDA) از روش Satho استفاده شد [۱۷]. به ۵۰۰ میکرولیتر بافت هموژنه ۱/۵ میلی لیتر، تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰ درصد اضافه شد. به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۱/۵ میلی لیتر از مایع رویی را برداشته و ۲ میلی لیتر اسید تیوباربتوریک ۰/۶۷ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شد. سپس ۲ میلی لیتر ۱- بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ سانتیفریوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از ۱، ۱، ۳ و ۳ تترا اتوکسی پروپان به عنوان استاندارد تعیین شده و غلظت مالون دی آلدئید بر حسب نانومول بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد. محلول استاندارد MDA در غلظت‌های ۲۰-۰/۲ میکرومولار در اسید سولفوریک ۱۰ درصد تهیه شد. برای تعیین غلظت پروتئین از روش براد فورد استفاده شد [۳]. حجم معینی از عصاره بافتی با رقت مناسب برداشته و به حجم ۱ میلی لیتر رسانده شد. سپس ۲ میلی لیتر از محلول برادفورد با رقت ۳:۱ به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه اینکوبه گردید. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب قرائت شد. جهت رسم منحنی استاندارد ابتدا محلول ۱ میلی گرم بر میلی لیتر از آلبومین سرم گاوی (BSA) تهیه شد. سپس غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر از آن ساخته و به عنوان غلظت‌های استاندارد استفاده شد.

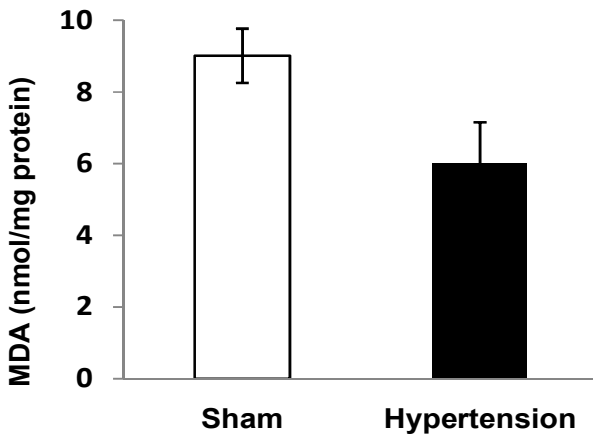
نتایج به دست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار نمونه (Mean ± SEM) ارائه شده است. برای مقایسه داده‌های بدست آمده از نرم افزار Spss و با روش آماری Student T-Test استفاده شد و در تمام مقایسه‌ها $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار تلقی گردید.



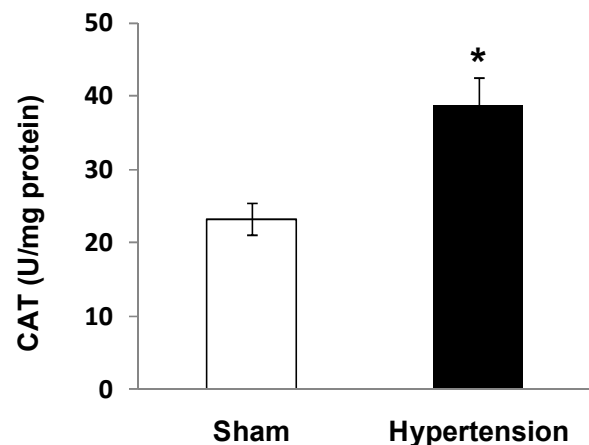
شکل ۵- اثرات بالا رفتن فشار خون شریانی بر غلظت گلوپتایون (Glutathione, GSH) بعد از گذشت ۱۰ روز از تنگی آئورت شکمی در حیوانات پرفشارشریانی. داده ها به صورت Means \pm SEM نشان داده شده است. * نشانگر تفاوت معنی دار با $P < 0.05$ در مقایسه با گروه شاهد.



شکل ۳- تاثیر بالا رفتن فشار خون شریانی بر میزان فعالیت آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز (Superoxide dismutase, SOD) بعد از گذشت ۱۰ روز از تنگی آئورت شکمی در حیوانات پرفشار. داده ها به صورت Means \pm SEM نشان داده شده است. * نشانگر تفاوت معنی دار با $P < 0.05$ در مقایسه با گروه شاهد.



شکل ۶- تاثیر القاء پرفشاری شریانی بر غلظت مالون دی آلدئید (Malondialdehyde, MDA) بعد از گذشت ۱۰ روز از تنگی آئورت شکمی. داده ها به صورت Means \pm SEM نشان داده شده است.



شکل ۴- تاثیر القاء پرفشاری شریانی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (Catalase, CAT) بعد از گذشت ۱۰ روز از تنگی آئورت شکمی. داده ها به صورت Means \pm SEM نشان داده شده است. * نشانگر تفاوت معنی دار با $P < 0.05$ در مقایسه با گروه شاهد.

پرفشاری شریانی پس از ۱۰ روز بواسطه تنگی آئورت سبب افزایش فعالیت این آنزیم در حیوانات گروه پرفشار شریانی در مقایسه با گروه شاهد شده است. به طوری که میزان فعالیت این آنزیم در گروه شاهد و پرفشار شریانی به ترتیب $28/85 \pm 0/28$ و $34/42 \pm 2/51$ U/mg protein بود که از لحاظ مقایسه آماری این تغییرات معنی دار می باشد.

شکل ۴ بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز عضله بطن چپ بر حسب U/mg protein در حیوانات پرفشار شریانی و گروه شاهد را نشان می دهد. همان طور که نتایج شکل مشخص می کند ایجاد پرفشاری شریانی پس از ۱۰ روز بواسطه تنگی آئورت سبب افزایش فعالیت این آنزیم در حیوانات گروه پرفشار

تغییرات هیپرتروفی قلب که از نسبت وزن قلب (گرم) به وزن نهایی بدن (کیلوگرم) بدست آمده در حیوانات گروه پرفشار شریانی و شاهد در شکل شماره ۲ نمایش داده شده است. تنگی آئورت شکمی سبب افزایش این نسبت به میزان ۷۶ درصد در گروه پرفشار شریانی در مقایسه با گروه شاهد شده است. به طوری که مقایسه آماری این داده ها در پایان ۱۰ روز تنگی آئورت شکمی تفاوت معنی داری در بین دو گروه پرفشار شریانی و شاهد داشت. میزان فعالیت آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز (SOD) عضله میوکارد بطن چپ بر حسب U/mg protein در شکل ۳ نشان داده شده است.

نتایج ارائه شده در نمودار گویای این واقعیت است که ایجاد

در پاسخ به پرفشاری شریانی افزایش معنی داری وجود داشت. تنگی آئورت شکمی در بالای شریان‌های کلیه منجر به افزایش ناگهانی و شدید فشار شریانی در قسمت‌های بالای تنگی می‌شود [۶]. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد تنگی آئورت بعد از ۱۰ روز توانست فشار شریانی را در قسمت‌های بالای تنگی به میزان ۶۶ درصد در گروه‌های پرفشار شریانی افزایش دهد (شکل ۱). این افزایش فشار شریانی به طور حاد و سریع اتفاق افتاده (به دلیل ایجاد مقاومت اولیه و در نهایت فعال شدن سیستم رنین-آنژیوتانسین) و مواجهه قلب در مقابل پس بار زیاد منجر به تغییرات زیادی در آن می‌شود. یکی از پاسخ‌های سازشی قلب جهت مقابله با پس بار زیاد ایجاد هیپرتروفی بوده که در تحقیق حاضر افزایش نسبت وزن قلب به وزن نهایی بدن حیوان به عنوان شاخص هیپرتروفی در نظر گرفته شده است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد بعد از گذشت ده روز از القاء پرفشاری شریانی، قلب به میزان ۷۶ درصد در گروه‌های پرفشار دچار هیپرتروفی شده (شکل ۲)، که این نتایج با مطالعات قبلی از جمله مطالعه polizo هم خوانی دارد [۱۵]. تغییر در میزان برخی فاکتورهای موجود در گردش خون و بافت قلب (از جمله کاتکول آمین‌ها، آنژیوتانسین-II) به نظر نقش مشارکتی در این امر داشته باشد [۱۰، ۱۹]. بر پایه مطالعات بروز استرس اکسیداتیو به عنوان یک عامل مهم در هیپرتروفی قلب مطرح شده ولی مکانیسم عمل آن ناشناخته باقی مانده است. به هر حال بررسی نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد افزایش فشار شریانی با هیپرتروفی بطن رابطه مستقیم دارد زیرا بر پایه مطالعه singal افزایش فشار شریانی سبب ایجاد استرس و بار بطن چپ در حین سیستول شده که سبب تحریک هیپرتروفی قلب می‌شود [۲۱].

افزایش تولید ROS ها (آنیون‌های سوپراکسید و هیدروکسیل) در برخی شرایط پاتولوژیک مثل پرفشاری شریانی، بسیاری از اعمال قلبی همچون جریان‌های یونی، ساختار و عملکرد پروتئین‌ها، بیان ژن و مسیرهای سیگنالی بسیاری از فاکتورهای رشد را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۲۴]. تحت شرایط فیزیولوژیک اثرات سمی این رادیکال‌ها توسط آنزیم‌هایی همچون SOD، کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز خنثی می‌شود. بر این اساس افزایش میزان تولید ROS ها در برخی

شریانی شده است. مقایسه آماری نتایج بدست آمده از دو گروه شاهد و گروه پرفشار شریانی معنی دار بوده و میزان فعالیت این آنزیم در گروه شاهد و گروه پرفشار شریانی به ترتیب برابر با $2/13 \pm 23/27$ و $4/03 \pm 36/63$ U/mg protein بود.

تغییرات غلظت گلوکاتیون عضله میوکارد بطن چپ بر حسب nmol/mg protein در حیوانات گروه پرفشار شریانی و گروه شاهد در شکل ۵ نمایش داده شده است. همان طور که از نتایج ارائه شده بر می‌آید تنگی آئورت شکمی بعد از ۱۰ روز توانست میزان غلظت گلوکاتیون عضله میوکارد بطن چپ را در حیوانات گروه پرفشار شریانی در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی داری افزایش دهد. به طوری که غلظت گلوکاتیون در گروه پرفشار شریانی و گروه شاهد به ترتیب برابر با $3/08 \pm 24/61$ و $1/94 \pm 11/69$ nmol/mg protein بود.

شکل ۶ تغییرات غلظت مالون دی آلدئید (MDA) عضله میوکارد بطن چپ را بر حسب nmol/mg protein در حیوانات گروه پرفشار شریانی و گروه شاهد را نشان می‌دهد. از لحاظ مقایسه آماری نتایج بدست آمده، هیچگونه تفاوت معنی دار در بین دو گروه پرفشار شریانی و گروه شاهد وجود نداشت.

بحث

پرفشاری شریانی منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در بافت‌های مختلف بدن می‌شود [۲۳]. به نظر می‌رسد افزایش غلظت ROS ها علاوه بر آسیب به بافت قلب، از طریق دخالت در هیپرتروفی قلب در بالا بردن فشارخون شریانی نیز موثر باشد [۱۵، ۲۵]. نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر نشان می‌دهد تنگی آئورت شکمی در بالای شریان‌های کلیه در طی ده روز توانست علاوه بر بالا بردن فشار خون شریانی در اندام‌های فوقانی بدن به میزان ۶۶ درصد (شکل ۱)، سبب هیپرتروفی در بافت قلب (۷۶ درصد) شود (شکل ۲). همچنین در این مطالعه رابطه مستقیمی بین تغییرات همودینامیک به همراه هیپرتروفی قلب با میزان تغییرات آنزیم‌های درگیر در فرآیند تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و بروز استرس اکسیداتیو موجود بود. چرا که در میزان فعالیت آنزیم‌های درگیر در فرآیند استرس اکسیداتیو من جمله کاتالاز و SOD (شکل ۳ و ۴)، و همچنین غلظت گلوکاتیون (شکل ۵)

شریانی مقابله نماید. تغییر در مقدار گلوکوتایون یکی دیگر از شاخص‌های استرس اکسیداتیو بوده که در تحقیق حاضر میزان غلظت آن افزایش معنی داری در گروه پرفشار شریانی داشته است (شکل ۵). افزایش غلظت گلوکوتایون در گروه تنگی آئورت احتمالاً نشان دهنده پاسخ جبرانی جهت مقابله با افزایش تولید ROS و استرس اکسیداتیو در عضله میوکارد می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر با مطالعه polizo همخوانی داشته و چون گلوکوتایون به عنوان جمع آوری کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند، کاهش اولیه آن باعث فعال شدن آنزیم گلوکوتایون سنتتاز از طریق فیدبک منفی شده و مقدار آن افزایش پیدا کرده است [۱۵]. در مطالعه حاضر میزان MDA (شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها) عضله بطن چپ در گروه پرفشار شریانی تغییرات معنی داری نداشت (شکل ۶). گرچه در هنگام بروز استرس اکسیداتیو معمولاً میزان آن افزایش پیدا می‌کند اما در برخی مطالعات نشان داده شده که تنگی آئورت و ایجاد هیپرتروفی عضله میوکارد با وجود القای استرس اکسیداتیو میزان پراکسیداسیون لیپیدها حتی کاهش پیدا کرده است [۵]. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Luo و Polizo صورت گرفته می‌باشد (شاخص پراکسیداسیون Thiobarbituric acid reactive substance, لیپیدها, TBRs) افزایش پیدا کرده است [۱۲, ۱۵]. این نتایج متناقض شاید به دلیل تغییر در نوع پروتکل‌های آزمایش، مدت زمان پرفشاری شریانی یا حتی نوع حیوان مورد استفاده باشد. به هر حال عدم تغییر MDA در تحقیق حاضر شاید به دلیل فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد که از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری کرده است.

به طور خلاصه از نتایج این تحقیق چنین استنباط می‌شود که القای پرفشاری شریانی بواسطه تنگی آئورت شکمی در بالای شریان‌های کلیه سبب هیپرتروفی قلب شده و از طریق افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب به‌وجود آمدن استرس اکسیداتیو در عضله قلبی می‌شود. همچنین نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌کند بین فرآیند استرس اکسیداتیو و مکانیسم ایجاد هیپرتروفی قلب در حین پرفشاری شریانی رابطه ای وجود دارد به طوری که شاید بتوان با جلوگیری از بروز فرآیند استرس اکسیداتیو تا حدودی از هیپرتروفی قلب در حین پرفشاری شریانی جلوگیری کرد.

از شرایط پاتولوژیک به نظر می‌رسد با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ارتباط باشد [۲۰]. در مطالعه حاضر میزان فعالیت آنزیم SOD بطن چپ در گروه پرفشار شریانی افزایش معنی دار در مقایسه با گروه شاهد داشت که به نظر می‌رسد یک مکانیسم سازشی جهت مقابله با افزایش تولید آنیون سوپراکسید باشد (شکل ۳).

اطلاعات کمی در ارتباط با تغییرات آنزیم SOD بطن چپ در هنگام ایجاد استرس اکسیداتیو در مواجهه با پرفشاری شریانی وجود دارد اما در تحقیق انجام شده توسط polizo افزایش میزان فعالیت این آنزیم به عنوان شاخصی از بروز استرس اکسیداتیو می‌باشد [۱۵]. بر پایه مطالعات تعدادی از محققین میزان فعالیت آنزیم SOD به طور معنی داری در میوکارد قلب هیپرتروفی شده بالاتر بوده که نشان دهنده افزایش تولید آنیون‌های سوپراکسید می‌باشد [۱۲, ۲۰]. بر اساس مطالعه Ungvari افزایش تولید این آنیون در اندام‌های فوقانی حیوانات پرفشار بدلیل فعال شدن مسیر آنژیوتانسین-II می‌باشد [۲۵]. شواهد بسیار قوی وجود دارد که آنژیوتانسین-II را به عنوان فاکتور اصلی و مهم در بروز پرفشاری شریانی و هیپرتروفی قلب مطرح کرده که یکی از مسیرهای سیگنالی آن بواسطه فعال کردن ROS ها می‌باشد [۱۶]. بنابراین نتایج بدست آمده از این تحقیق و سایر تحقیقات نشان می‌دهد بروز استرس اکسیداتیو نقش کلیدی در هیپرتروفی و افزایش فشار شریانی دارد.

در مطالعه حاضر همچنین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه پرفشار شریانی افزایش معنی داری در مقایسه با گروه شاهد داشت (شکل ۴). این نتایج با مطالعه Sindhu هم خوانی دارد زیرا در مطالعه وی نیز میزان بیان پروتئین آنزیم‌های کاتالاز و SOD افزایش معنی داری را در حیوانات پرفشار نشان دادند [۲۰]. با این حال در برخی مدل‌های دیگر پرفشار شریانی میزان بیان این پروتئین ثابت بوده و یا حتی در برخی مطالعات میزان فعالیت این آنزیم کاهش داشته است [۸, ۱۲]. آنزیم کاتالاز نقش مهمی در تبدیل هیدروژن پراکسید به آب دارد و افزایش فعالیت این آنزیم همانند SOD احتمالاً یک مکانیسم سازشی در جهت مقابله با تجمع یون هیدروژن پراکسید بوده تا بتواند با استرس اکسیداتیو ایجاد شده در پاسخ به پرفشاری

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله که هزینه های مالی این تحقیق را فراهم نموده و گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله جهت انجام آزمایش های بیوشیمیایی تشکر و قدردانی می شود.

References

- [1] Aebi H, Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105 (1984) 121-6.
- [2] Barton CH, Ni Z, Vaziri ND, Enhanced nitric oxide inactivation in aortic coarctation-induced hypertension. *Kidney Int* 60 (2001) 1083-7.
- [3] Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 (1976) 248-54.
- [4] Everett AD, Tufro-McReddie A, Fisher A, Gomez RA, Angiotensin receptor regulates cardiac hypertrophy and transforming growth factor-beta 1 expression. *Hypertension* 23 (1994) 587-92.
- [5] Gupta M, Singal PK, Higher antioxidative capacity during a chronic stable heart hypertrophy. *Circ Res* 64 (1989) 398-406.
- [6] Guyton JR, Dao DT, Lindsay KL, Taylor AA, Ultrastructure of hypertensive rat aorta. Increased basement membrane-like material. *Hypertension* 15 (1990) 56-67.
- [7] Halliwell B, Gutteridge MJ, The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280 (1990) 1-8.
- [8] Jacob MH, Pontes MR, Araujo AS, Barp J, Irigoyen MC, Llesuy SF, Ribeiro MF, Bello-Klein A, Aortic-banding induces myocardial oxidative stress and changes in concentration and activity of antioxidants in male Wistar rats. *Life Sci* 79 (2006) 2187-93.
- [9] Koyanagi S, Eastham C, Marcus ML, Effects of chronic hypertension and left ventricular hypertrophy on the incidence of sudden cardiac death after coronary artery occlusion in conscious dogs. *Circulation* 65 (1982) 1192-7.
- [10] Lai FM, Herzlinger H, Cervoni P, A comparison of cardiac alpha-adrenoceptor number and affinity between aorta-coarcted hypertensive and normotensive rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 43 (1984) 55-65.
- [11] Liang LP, Patel M, Seizure-induced changes in mitochondrial redox status. *Free Radic Biol Med* 40 (2006) 316-22.
- [12] Luo JD, Zhang WW, Zhang GP, Zhong BH, Ou HJ, Effects of simvastatin on activities of endogenous antioxidant enzymes and angiotensin-converting enzyme in rat myocardium with pressure-overload cardiac hypertrophy. *Acta Pharmacol Sin* 23 (2002) 124-8.
- [13] Mozaffari MS, Schaffer SW, Effect of hypertension and hypertension-glucose intolerance on myocardial ischemic injury. *Hypertension* 42 (2003) 1042-9.
- [14] Murray CJ, Lopez AD, Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349 (1997) 1498-504.
- [15] Polizio AH, Gorzalczany S, Taira C, Pena C, Aortic coarctation induces oxidative stress in rat tissues. *Life Sci* 79 (2006) 596-600.
- [16] Reckelhoff JF, Romero JC, Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284 (2003) 893-912.
- [17] Satoh K, Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 90 (1978) 37-43.
- [18] Scandalios JG, The rise of ROS. *Trends Biochem Sci* 27 (2002) 483-6.
- [19] Sedeek MH, Llinas MT, Drummond H, Fortepiani L, Abram SR, Alexander BT, Reckelhoff JF, Granger JP, Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension. *Hypertension* 42 (2003) 806-10.
- [20] Sindhu RK, Roberts CK, Ehdai A, Zhan CD, Vaziri ND, Effects of aortic coarctation on aortic antioxidant

- enzymes and NADPH oxidase protein expression. *Life Sci* 76 (2005) 945-53.
- [21] Singal PK, Khaper N, Belló-Klein A, Bhayana M, Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure. *Heart Failure Reviews* 4 (1999) 1-8.
- [22] Tietz F, Enzymic method for quantitative determination of nanogram amount of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Biochim* 27 (1969) 502-522.
- [23] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S, Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc Res* 81 (2009) 449-56.
- [24] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S, Oxidative Stress and Mitochondrial DNA Damage in Heart Failure. *Circ J Suppl A* (2008) 31-37.
- [25] Ungvari Z, Csiszar A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A, Chronic high pressure-induced arterial oxidative stress: involvement of protein kinase C-dependent NAD(P)H oxidase and local renin-angiotensin system. *Am J Pathol* 165 (2004) 219-26.
- [26] Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW, The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 85 (1975) 337-41.