

کاهش بیان ساب یونیت‌های gp91^{Phox} و P22^{Phox} کمپلکس NADPH اکسیداز در بافت قلب هیپرتروف شده موش‌های صحرایی توسط رزوراترول

فاطمه میرعبداللهی^۱، راضیه نجاری^۱، علی مرادی^۲، فاطمه صفری^{۱،۳*}

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

۲- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

۳- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده بین‌الملل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

*آدرس مکاتبه: یزد، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

تلفن و نمابر: ۳۸۲۰۳۴۱۰ (۰۳۵) داخلی ۲۷۸

پست الکترونیک: f.safari@ssu.ac.ir Sa.physiol@gmail.com

doi: 10.29252/jmp.4.72.S12.288

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۶

چکیده

مقدمه: هیپرتروفی بطن چپ (LVH) ناشی از هیپرتانسیون، پاسخی سازشی به اورلود فشار است که در صورت عدم درمان به سمت نارسایی قلبی پیش می‌رود. افزایش فعالیت کمپلکس NADPH اکسیداز نقش مهمی در پیشرفت LVH دارد. هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثر فنل طبیعی، رزوراترول، بر میزان نسخه برداری ساب یونیت‌های NADPH اکسیداز در بافت قلب هیپرتروف شده بود.

روش بررسی: موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به گروه‌های زیر تقسیم شدند: کنترل (دست نخورده)، شم (H+DMSO)، هیپرتروف بدون تیمار (H) و هیپرتروف تیمار شده با رزوراترول (R+H). LVH توسط تنگی آئورت شکمی القا شد. فشار خون از طریق کانولاسیون شریان کاروتید اندازه‌گیری شد. بیان ژن‌های هدف توسط Real time RT-PCR تعیین شد.

نتایج: فشار سیستولی (SBP) و دیاستولی (DBP) در گروه H در مقایسه با کنترل به طور معناداری بیشتر بود ($P < 0/001$). در گروه R+H، SBP و DBP نسبت به گروه H کاهش یافت ($P < 0/001$). در گروه H سطح mRNA سایونیت‌های gp91^{Phox}، P67^{Phox} و Rac1 در مقایسه با کنترل به ترتیب به میزان $98/4 \pm 14/5$ ، $64/7 \pm 8/8$ و $36/4 \pm 5$ و $10/8$ و $73/2 \pm 10/8$ درصد افزایش یافت ($P < 0/001$ ، $P < 0/001$ ، $P < 0/001$ ، $P < 0/001$). اما در گروه R+H سطح gp91^{Phox}، P22^{Phox} و Rac1 mRNA به $43/2 \pm 4/5$ ، $28/6 \pm 5/7$ و $30/5 \pm 5/8$ درصد رسید که بیانگر اختلاف معنی‌داری با گروه H می‌باشد ($P < 0/001$ ، $P < 0/001$ ، $P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: سطح نسخه‌برداری ساب یونیت‌های کمپلکس NADPH اکسیداز در میوکارد هیپرتروف شده افزایش می‌یابد. رزوراترول می‌تواند با کاهش میزان نسخه‌برداری ساب یونیت‌های مذکور قلب را در برابر هیپرتروفی ناشی از اورلود فشار محافظت نماید.

کلواژگان: هیپرتروفی بطن چپ، رزوراترول، NADPH اکسیداز، gp91^{Phox}، P22^{Phox}، P67^{Phox}، P47^{Phox}، Rac1



مقدمه

زمانی که قلب در معرض یک استرس مزمن مانند اورلود فشار یا حجم قرار گیرد به تدریج دچار هیپرتروفی می‌شود. هیپرتروفی قلب که با رشد کاردیومیوسیت‌ها و ریمودلینگ ماتریکس بین سلولی (مانند فیروز) در بافت میوکارد مشخص می‌شود یک فرایند پیچیده است که عوامل مختلفی مانند فاکتورهای همودینامیکی، ژنتیکی، نوروهورمورال، فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها در ایجاد و پیشرفت آن مشارکت دارند [۱، ۲]. نکته مهمی که باید مورد توجه قرار گیرد این است که هیپرتروفی میوکارد در ابتدا به عنوان یک پاسخ جبرانی با هدف افزایش توانمندی قلب در برابر استرس مزمنی مانند هیپرتانسیون در قلب ایجاد می‌شود اما با گذشت زمان، فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ اختصاصی در کاردیومیوسیت‌ها و حتی فیبروبلاست‌ها منجر به آپوپتوز و حذف این سلول‌ها می‌شود که در نهایت به اختلال جدی در عملکرد قلب منجر خواهد شد. وضعیتی که معرف نارسایی قلبی بوده و در نهایت منجر به مرگ خواهد شد. از مهم‌ترین مکانیسم‌های دخیل در پاتوزن هیپرتروفی بطن چپ، پدیده "استرس اکسیداتیو" ناشی از تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) است. یکی از منابع اصلی تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در میوکارد، کمپلکس آنزیمی NADPH اکسیداز می‌باشد. NADPH اکسیداز کلاسیک در نوتروفیل‌ها شناسایی شد که در تولید آنیون سوپراکساید و عملکرد این سلول‌ها مشارکت دارد اما مطالعات به خوبی نشان داده‌اند که NADPH اکسیداز در سایر سلول‌ها از جمله سیستم قلب و عروق نیز می‌تواند فعالیت کند. بیان این آنزیم در سلول‌های اندوتلیال، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های عضله صاف عروق و همچنین کاردیومیوسیت‌ها به خوبی نشان داده شده است. NOX (NADPH oxidase) ساب یونیت کاتالیتیک NADPH اکسیداز است که ۵ ایزوفرم مختلف آن در بدن بیان می‌شود (NOX1-5) [۳، ۴]. از این بین NOX2 (gp91^{phox}) به دلیل بیان و فعالیت قابل توجه در قلب توجه زیادی را به خود اختصاص داده است. gp91^{phox} به همراه ساب یونیت دیگری به نام P22^{phox} اجزای غشایی این کمپلکس را تشکیل می‌دهند. عملکرد این کمپلکس آنزیمی به

ساب یونیت‌های سیتوپلاسمی شامل P47^{phox} و P67^{phox} و همچنین پروتئین کوچک متصل به GTP به نام Rac کاملاً وابسته است: فسفریلاسیون P47^{phox} سبب تغییر فضایی در پروتئین و جابجایی آن به سمت کمپلکس NOX2/ P22^{phox} می‌شود. با لوکالیزه شدن P47^{phox} در غشا، پروتئین P67^{phox} (ساب یونیت فعال کننده) و واحد کوچکتر به نام P40^{phox} را نیز با خود به غشا می‌آورد. در نهایت Rac1 نیز با NOX2 و سپس P67^{phox} متصل می‌شود. به محض assemble شدن اجزای مجموعه، سیستم فعال شده و با انتقال الکترون از NADPH به اکسیژن آنیون سوپراکساید تولید می‌شود [۵ - ۸]. مطالعات نشان داده‌اند که NADPH اکسیداز در جواب به محرک‌هایی چون آنژیوتانسین II، اندوتلین I، سیتوکین‌ها و کشش مکانیکی در سلول‌های قلبی فعال می‌شود. حوادثی که در پروسه هیپرتروفی میوکارد کاملاً مشهود است به طوری که به موازات فعال شدن مسیرهای مرتبط با رشد سلول فعالیت این کمپلکس آنزیمی نیز افزایش می‌یابد [۹]. افزایش فعالیت این آنزیم و همچنین بیان ساب یونیت‌های gp91^{phox}، P67^{phox} و P22^{phox} در بافت میوکارد هیپرتروف شده کوچک‌هندی نشان داده شده است. همچنین یافته‌های اخیر حاکی از نقش کلیدی ساب یونیت تنظیمی Rac1 نیز در فعال‌سازی کمپلکس NADPH اکسیداز در طی هیپرتروفی میوکارد است. با توجه به شیوع بالای بیماری نارسایی قلبی ناشی از هیپرتروفی میوکارد و مرگ و میر بیماران مبتلا به این بیماری ضرورت یافتن روش‌های درمانی کارآمدتر هدف مطالعه محققان علم پزشکی است. در سال‌های اخیر اثرات کاردیوپروتکتیو و بویژه اثرات ضد هیپرتروفی فنل با منشا گیاهی به نام رزوراترول مورد توجه محققان قرار گرفته است. رزوراترول (۴، ۵، ۳ - تری هیدروکسیل - ترانس - استیلبن) از دسته شبه فلاون‌ها بوده که از لحاظ شیمیایی با فرمول C14H12O3 در گروه ترکیباتی به نام استیلبن قرار می‌گیرد. این فنل طبیعی در انگور سیاه، توت، بادام زمینی و چای سیاه وجود دارد. محققان اثرات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، گشادکنندگی عروقی و خواص آنتی‌ترومبوتیک رزوراترول را به فعال شدن آنزیم داستیلاز SIRT1 نسبت می‌دهند [۱۰].



گاوژ روزانه یک مرتبه به حیوانات داده شد [۱۱].
۴- گروه DMSO + هیپرتروفی قلبی: در این گروه حیوانات DMSO را به عنوان حلال رزوراترول دریافت نموده و تحت القا هیپرتروفی قرار گرفتند.

القای مدل هیپرتروفی

با تزریق داخل صفاقی ۷۰ میلی گرم/کیلوگرم کتامین و ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم زایلانین بیهوشی در حیوانات القاء شد. بعد از قرارگیری حیوان بر روی پد حرارتی، در پهلوی چپ فاصله بین آخرین دنده و استخوان فمور پوست را برش داده، سپس با استفاده از قیچی و پنس نواحی زیر پوست را آزاد کرده و با قیچی لایه زیر پوست را در همان جهت قبلی برش زدیم.

سپس شریان آئورت شکمی را پیدا کرده و یک قطعه ۱ سانتی متری از نیدل شماره ۲۱ را کنار شریان قرار داده و نخ را از زیر آن رد کرده و دور شریان و نیدل گره زدیم. بعد از اطمینان از تنگی شریان و نه انسداد کامل آن نیدل برداشته شد. قرار دادن نیدل در کنار شریان در تمام نمونه‌ها کمک خواهد کرد تا از انسداد کامل شریان جلوگیری شود و از طرفی در تمام نمونه‌ها شریان به یک اندازه تنگ شد. سپس محل جراحی را بخیه و در انتها از اسپری تتراسایکلین (آنتی بیوتیک) در محل برش پوست استفاده شد. ۱۰ هفته بعد حیوانات را مجدداً بیهوش کرده و توسط کاتتریزاسیون شریان کاروتید و دستگاه پاورلب فشار خون آنها به طور مستقیم اندازه گیری شد. نمونه مربوط به بطن چپ جهت انجام مطالعات مولکولی جمع آوری و به تانک نیتروژن و سپس فریزر ۸۰ درجه سانتی گراد منتقل شد [۱۱، ۱۲].

بررسی میزان بیان ژن‌های هدف توسط تکنیک Real time RT-PCR

به منظور بررسی و مقایسه سطح mRNA مربوط به ساب یونیت‌های کمپلکس NADPH oxidase از تکنیک Real time RT-PCR استفاده شد. بدین منظور ابتدا با استفاده از محلول RNxPlus بافت بطن چپ (حدود ۵۰ میلی گرم) را هم‌نیزه کرده و مطابق پروتکل شرکت سازنده، مراحل استخراج صورت گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ

رزوراترول از طریق تنظیم بیان ژن آنزیم‌های اکسیداتیو و آنتی اکسیدان در سلول‌های اندوتلیال عروقی اثرات آنتی اکسیدانی خود را اعمال می‌کند. مطالعات گسترده‌ای بر نقش کمپلکس NOX در پاتوژنز بیماری‌های قلبی از جمله هیپرتروفی میوکارد تأکید داشته‌اند. همچنین اثرات کاردیوپروتکتیو رزوراترول نیز اخیراً بسیار مورد توجه محققان حوزه قلب و عروق قرار گرفته است. با این وجود گزارشی دال بر اثر احتمالی رزوراترول بر میزان نسخه برداری از اجزای کمپلکس NOX2 در هیپرتروفی میوکارد ارائه نشده است لذا در مطالعه حاضر به بررسی این موضوع پرداختیم.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش

جامعه مورد مطالعه رت‌های نر سالم نژاد ویستار با وزن ۲۱۰ - ۱۷۰ گرم را شامل شد. حیوانات در شرایط شبانه روزی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای 22 ± 2 ، دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه مراحل آزمایش مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد انجام گرفت. تمامی این حیوانات در حیوانخانه گروه پزشکی دانشگاه علوم پزشکی یزد نگهداری شدند. حیوانات به گروه‌های زیر تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل (Ctl): این گروه حیوانات سالم دست نخورده را بدون هر گونه مداخله دارویی و بیماری شامل شد.

۲- گروه هیپرتروفی قلبی (H): در این گروه حیوانات تحت انجام جراحی و تنگی آئورت شکمی قرار گرفتند و ده هفته بعد، بدون مداخله دارویی جمع‌آوری نمونه‌ها در آنها صورت گرفت.

۳- گروه رزوراترول + هیپرتروفی قلبی (R+H)

در گروه درمان، حیوانات ابتدا تحت جراحی و ایجاد مدل هیپرتروفی قرار گرفتند ۲۴ ساعت بعد از القا مدل هیپرتروفی و تا ده هفته بعد از جراحی، رزوراترول با دوز ۱ میلی گرم/کیلوگرم را به روش گاوژ دریافت کردند. رزوراترول مصرفی در این پژوهش به صورت پودر از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) تهیه شد. این دارو با دوز ۱ mg/kg/day در ۴٪ DMSO (سیناژن) حل شد و به صورت

نتایج

اثر رزوراترول بر سطح فشار خون در مدل هیپرتروفی میوکاردا

تغییرات فشار خون (سیستولیک و دیاستولیک) قبل از جمع‌آوری بافت، توسط کانوله کردن شریان کاروتید چپ با استفاده از دستگاه ترانس‌دوسر ثبت شد. شکل شماره ۱ فشار خون سیستولیک و دیاستولیک را در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که در گروه H فشار خون سیستولیک و دیاستولیک در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0/001$). در گروه تیمار (H+R) فشار خون سیستولیک و دیاستولیک در مقایسه با H تغییر معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0/001$).

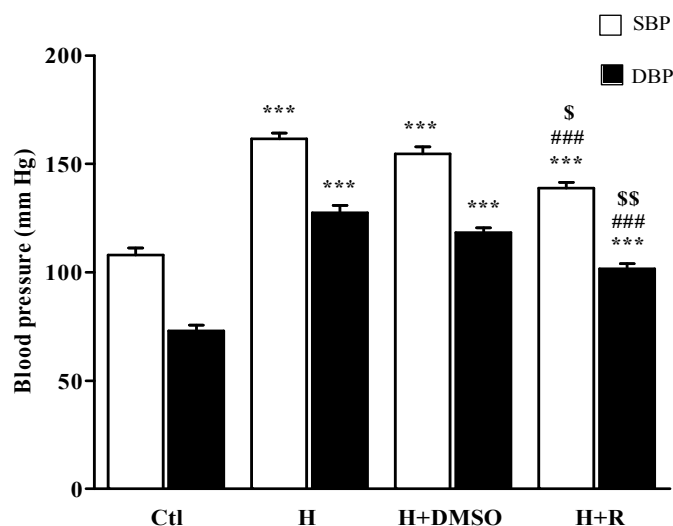
اثر رزوراترول بر بیان ساب یونیت‌های غشایی gp91^{phox} و P22^{phox} در گروه‌های آزمایش

یکی از اهداف اصلی این مطالعه بررسی سطح mRNA ساب یونیت‌های غشایی gp91^{phox} و P22^{phox} در گروه‌های آزمایش بود. همان‌طور که در شکل شماره ۱ نشان

با قرائت غلظت در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. RNA استخراج شده در فریزر ۸۰ - نگهداری شد. سپس با استفاده از کیت سنتز cDNA (Vivantis-Korea) و حجمی شامل ۱۰۰۰ نانوگرم RNA سنتز cDNA صورت گرفت. cDNA سنتز شده در دمای ۲۰ °C تا زمان انجام real time PCR نگهداری شد. سپس در حضور پرایمرهای اختصاصی و نیز مسترمیکس حاوی سایبرگرین (Takara-Japan) cDNA مربوط به گروه‌های آزمایش تحت انجام واکنش real time RT-PCR قرار گرفتند. از ژن GAPDH به عنوان رفرنس استفاده شد. داده‌های حاصل از واکنش توسط روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار Graph pad prism انجام گرفت. داده‌ها توسط One way ANOVA و آزمون متعاقب Tukey، مورد آنالیز قرار گرفتند. $P < 0/05$ ملاک معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌های مورد آزمایش در نظر گرفته شد. مقادیر به دست آمده به صورت $\text{Mean} \pm \text{S.E.M}$ گزارش شده است.



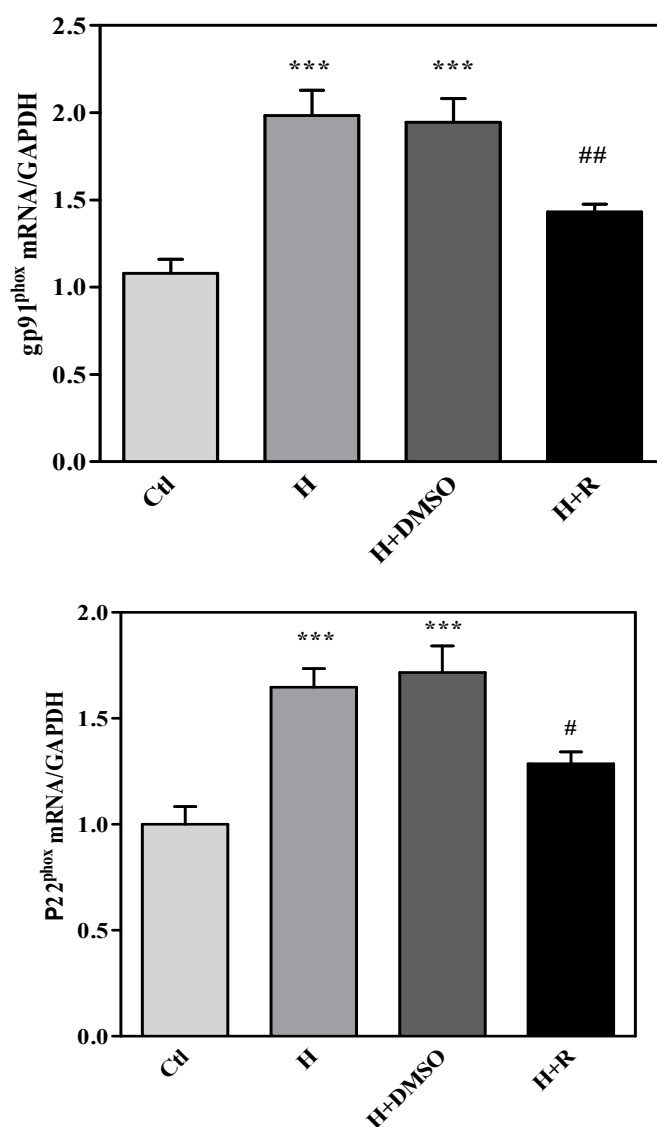
شکل شماره ۱ - اثر رزوراترول بر فشار خون سیستولیک و دیاستولیک به دنبال هیپرتروفی میوکاردا در موش‌های صحرایی دچار هیپرتروفی میوکاردا بدون تیمار (H) و یا تیمار شده با رزوراترول (R) $P < 0/001$ در مقایسه با گروه Ctl. $### P < 0/001$ در مقایسه با گروه H. $SP < 0/05$ و $SP < 0/01$ در مقایسه با گروه H + DMSO نتیجه شده است. داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{S.E.M}$ نشان داده شده‌اند.



یعنی $P^{22\text{Phox}}$ نتایج ما حاکی از آن است که در گروه H سطح $P^{22\text{Phox}}$ mRNA به میزان $8/8 \pm 64/7$ درصد افزایش می‌یابد. این تغییر در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < 0/001$). در گروه تیمار شده یعنی H+R سطح $P^{22\text{Phox}}$ mRNA فقط به میزان $8/8 \pm 28/6$ درصد افزایش یافت که تفاوت معنی‌داری را با گروه H ($8/8 \pm 64/7$) نشان می‌دهد ($P < 0/05$) (شکل شماره ۲).

داده شده است در گروه H میانگین سطح $gp91^{\text{phox}}$ mRNA به میزان $14/5 \pm 98/4$ درصد بوده که در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0/001$). این در حالیست که در گروه تیمار شده با رزوراترول (H+R) سطح $gp91^{\text{phox}}$ mRNA به $4/5 \pm 43/2$ درصد رسید که در مقایسه با گروه H تغییر معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0/01$).

درخصوص سطح بیان دیگر ساب یونیت غشایی این کمپلکس

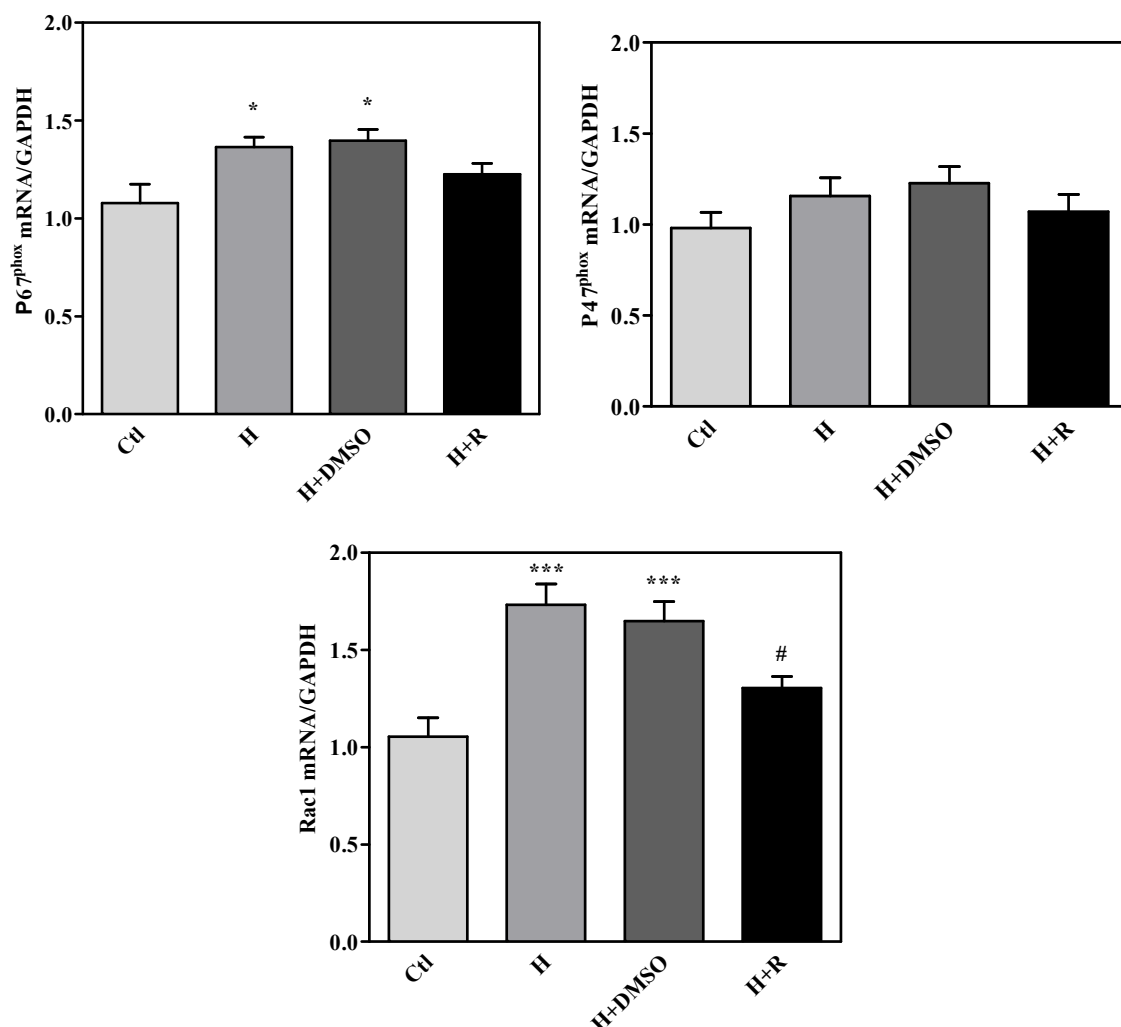


شکل شماره ۲ - تغییرات سطح ساب یونیت‌های غشایی کمپلکس NADPH oxidase. سطح mRNA مربوط به ساب یونیت‌های $gp91^{\text{phox}}$ و $P^{22\text{Phox}}$ در بافت میوکارد موش‌های صحرایی دچار هیپرتروفی ناشی از تنگی آنورت شکمی بدون تیمار دارویی (گروه H)، تیمار شده با حلال دارو (گروه H + DMSO) و گروه تیمار با داروی رزوراترول (گروه H+R) سنجیده شده است. گروه کنترل (Ctl) حیوانات سالم دست نخورده را شامل شد. داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده‌اند. $P < 0/001$ *** در مقایسه با گروه کنترل و $P < 0/05$ # در مقایسه با گروه H سنجیده شده است ($n = 6$).

Rac1 یک ساب یونیت سیتوپلاسمی و در عین حال تنظیمی در کمپلکس NADPH oxidase است. نتایج این مطالعه نشان داد که در گروه H که تیمار دارویی را دریافت نکردند، سطح Rac1 mRNA در مقایسه با گروه کنترل به میزان $10/8 \pm 73/2$ درصد افزایش می‌یابد که از نظر آماری تغییر معنی داری را نشان می‌دهد ($P < 0/001$). در گروه هیپرتروف تیمار شده با رزوراترول یعنی گروه H+R سطح Rac1 mRNA به میزان $5/8 \pm 30/5$ درصد تغییر یافت که این تغییر از نظر آماری با گروه H معنی دار می‌باشد ($P < 0/05$) (شکل شماره ۳).

اثر رزوراترول بر بیان ساب یونیت‌های سیتوپلاسمی P67^{phox} و P47^{phox} و Rac1

نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که در گروه H سطح P67^{phox} mRNA نسبت به گروه کنترل به میزان 4 ± 36 درصد افزایش یافت که از نظر آماری این افزایش، معنی داری می‌باشد ($P < 0/05$). در گروه تیمار شده با رزوراترول تغییر معنی داری در سطح P67^{phox} mRNA مشاهده نشد (شکل شماره ۳). درخصوص ساب یونیت سیتوپلاسمی دیگر یعنی P47^{phox} mRNA نیز در هیچ یک از گروه‌های مورد مطالعه تغییر معنی داری در سطح P47^{phox} mRNA مشاهده نشد.



شکل شماره ۳ - تغییرات سطح ساب یونیت‌های سیتوپلاسمی کمپلکس NADPH oxidase. سطح mRNA مربوط به ساب یونیت‌های سیتوپلاسمی

P67^{phox} و P47^{phox} و Rac1 در بافت میوکارد موش‌های صحرایی دچار هیپرتروفی ناشی از تنگی آئورت شکمی بدون تیمار دارویی (گروه H)، تیمار شده با حلال دارو (گروه H+DMSO) و گروه تیمار با داروی رزوراترول (گروه H+R) سنجیده شده است. گروه کنترل (Ctl) حیوانات سالم دست نخورده را شامل شد. داده‌ها به صورت Mean \pm SEM نشان داده شده‌اند. $P < 0/001$ ، $P < 0/05$ ، * در مقایسه با گروه کنترل و $P < 0/05$ ، # در مقایسه با گروه H سنجیده شده است ($n = 6$).



بحث

با توجه به نقش کمپلکس آنزیمی NADPH اکسیداز به عنوان یک فاکتور مؤثر در تولید رادیکال آزاد در هیپرتروفی میوکارد و همچنین شناخت اثرات کاردیوپروتکتیو رزوراترول، در این مطالعه هدف اصلی مطالعه بررسی اثر رزوراترول بر بیان اجزای NOX2 در بافت هیپرتروف شده میوکارد بود. بخش اول مطالعه ما نشان می‌دهد که مصرف رزوراترول با دوز 1 mg/kg/day به مدت 10 هفته از هیپرتانسیون ناشی از تنگی آئورت شکمی در موش‌های صحرایی جلوگیری می‌کند. نتایج این بخش از مطالعه ما با تحقیقات گذشته درخصوص اثر ضد هیپرتروفی رزوراترول همخوانی دارد به عنوان مثال Gupta و همکاران نشان دادند که درمان با رزوراترول به مدت 4 هفته، کاهش مارکرهای هیپرتروفی شامل نسبت وزن قلب به وزن بدن، هیپرتروفی قلبی، فیبروز، آپوپتوز و کاهش فاکتورهای التهابی از جمله ماست سل‌ها و ماکروفاژها را به دنبال داشت [13]. در مطالعه‌ای مشابه با مطالعه حاضر، Juric و همکاران به دنبال بررسی اثر رزوراترول بر روی هیپرتروفی ایجاد شده بوسیله تنگی آئورت شکمی به این نتیجه رسیدند که درمان با رزوراترول با دوز 2/5 mg/kg/day به مدت 2 هفته از طریق کاهش وزن قلب به وزن بدن، کاهش برون‌ده قلبی و زمان استراحت ایزولومیک منجر به کاهش هیپرتروفی کانستریک می‌شود [14]. یافته‌های مطالعه‌ی قبل ما نیز نشان داد که به دنبال هیپرتروفی ناشی از تنگی آئورت شکمی در موش صحرایی، غلظت Ang II و همچنین میزان نسخه‌برداری گیرنده AT1a آن در بافت میوکارد بطن چپ افزایش می‌یابد و تیمار با رزوراترول (1 mg/kg/day) به مدت 5 هفته، علاوه بر نرمالیزه کردن فشارخون ناشی از تنگی آئورت، نسبت وزن قلب به وزن بدن و رسوب کلاژن در قلب‌های هیپرتروف شده، میزان نسخه‌برداری گیرنده مخرب AT1a را در بافت میوکارد کاهش می‌دهد [11]. اثر کاردیوپروتکتیو رزوراترول در بیماری ايسکمی میوکارد نیز نشان داده شده است به عنوان مثال مطالعه گروه ما نشان داد که مصرف رزوراترول به همراه ویتامین D شدت آسیب ايسکمی و نیز شیوع آریتمی‌های بطنی را در موش‌های صحرایی کاهش می‌دهد [15]. همچنین در

مطالعه‌ای توسط Mokni و همکاران اثرات محافظتی رزوراترول بر آسیب ايسکمی - رپرفیوژن قلب از طریق تعدیل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به اثبات رسید. این نتایج نشان داد که رزوراترول می‌تواند سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی میوکارد را علیه استرس اکسیداتیو تقویت کند [16]. رزوراترول در محیط کشت سلول نیز با فعال کردن SIRT1 مسیر سیگنالینگ MAPK را تقویت کرده و از این طریق کاردیومیوسیت‌ها را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو، اختلال عملکرد میتوکندریایی و مرگ سلولی ناشی از ايسکمی رپرفیوژن میوکارد محافظت می‌کند [17].

در مطالعه Wojciechowski و همکارانش نشان داده شد که تیمار با رزوراترول پیشرفت اختلالات ساختاری و عملکردی قلب را در رت‌های با اورلود فشار و اورلود حجم متوقف می‌کند [18]. در مطالعه‌ی دیگری که در آن رت‌ها به مدت 14 روز با رزوراترول تیمار شده بودند، مشاهده شد قلب‌ها از اثرات زیان‌بار فشار بیش از حد ایجاد شده بواسطه‌ی هیپرتروفی قلبی حفظ شده‌اند [19]. علاوه بر این اثرات ضد فشار خون رزوراترول در چندین مدل حیوانی نشان داده شده است. در موش صحرایی با هیپرتروفی قلبی ایجاد شده با نفرکتومی، درمان خوراکی با رزوراترول (50 mg/kg/day) منجر به کاهش قابل توجهی در فشار خون سیستولیک و کاهش در هیپرتروفی قلبی شده است. این اثرات محافظتی با کاهش در اندوتلین - 1 سرم و افزایش در سطوح سرمی NO بدون تغییر در سطح آنژیوتانسین II در ارتباط بود [20].

در بخش دوم این مطالعه ما به بررسی تغییرات سطح بیان آنزیم NADPH اکسیداز و اجزای کمپلکس آن در هیپرتروفی و اثر رزوراترول بر میزان بیان زیر واحدهای این کمپلکس پرداختیم. نتایج این بخش از مطالعه ما نشان می‌دهد که طی فرآیند هیپرتروفی میوکارد سطح نسخه‌برداری ساب یونیت‌های gp91، P22، P67، Rac1 در بافت بطن چپ به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. شواهد بسیاری در مدل‌های آزمایشگاهی و اپیدمیولوژی وجود دارد که به اهمیت NADPH اکسیداز و ساب یونیت‌های مربوط به این کمپلکس در پاتوژنز بیماری‌های قلبی عروقی اشاره می‌کنند برای مثال:

ساب یونیت‌ها تغییر نکرد اما میزان جابجایی آنها بویژه ساب یونیت $P47^{phox}$ به غشا افزایش می‌یابد [۲۶].

یکی از ساب یونیت‌های تنظیمی مهم در کمپلکس NADPH اکسیداز، پروتئین مونومریک Rac1 است. نتایج مطالعه ما حاکی از افزایش میزان نسخه‌برداری از این ساب یونیت سیتوپلاسمی در بافت هیپرتروف شده میوکارد است. مطالعات گذشته اهمیت بیان و فعالیت این پروتئین را در مدل‌های مختلف بیماری‌های قلبی عروقی نشان داده‌اند. به عنوان مثال در مطالعه‌ای نشان داده شد که در قلب موش‌های دیابتی که Rac1 knockout بودند فعالیت NADPH oxidase، بیان ساب یونیت‌های آن و تولید ROS کاهش یافت. همچنین مارکرهای هیپرتروفي میوکارد شامل فیروز، اندازه سلول‌ها و بیان ژن‌های پروفیبروتیک و هیپرتروفیک در این حیوانات کاهش یافت. به نظر می‌رسد Rac1 از طریق فعال‌سازی NADPH oxidase باعث ریمودلینگ و اختلال عملکرد قلب در موش‌های دیابتی می‌شود که با استرس شبکه اندوپلاسمی و نیز فعال‌سازی التهاب در قلب نیز همراه خواهد شد [۲۷]. در مطالعه Talukder و همکارانش در سلسله آزمایشات بر روی نقش Rac1 در پاتورنز بیماری‌های قلبی عروقی گزارش شد که افزایش بیان Rac1 منجر به هیپرتروفي و سپس گشاد شدن قلب می‌شود که به همراه اختلالات انقباضی در قلب آن را به سمت نارسایی هدایت می‌کند. همچنین افزایش بیان و فعالیت Rac1 در قلب موش‌های صحرایی پیر به عنوان یکی از علل استعداد قلب به آسیب‌های استرس اکسیداتیو در سنین پیری مطرح شد [۲۸].

در واقع افزایش بیان و فعالیت Rac1 یکی از عوامل اصلی پیشرفت هیپرتروفي میوکارد به سمت نارسایی قلبی است [۲۹]. Rac1 با فعال کردن مسیرهای آپوپتوتیک و همچنین افزایش بیان NF-KB روند هیپرتروفي را در قلب تسریع می‌کند [۳۰]. این نقش کلیدی Rac1 در هیپرتروفي میوکارد در هیپرتروفي کاردیومیوسیت‌های ایزوله شده از قلب موش‌های صحرایی نیز مورد تأیید قرار گرفته است [۳۱].

در نهایت بخش آخر مطالعه ما نشان می‌دهد که تجویز روزوراترول با دوز ۱ mg/kg/day به موش‌های صحرایی دچار هیپرتروفي به طور قابل توجهی از افزایش بیان دو ساب یونیت

مطالعه بر روی خوکچه‌های هندی که دچار هیپرتروفي pressure-overload بودند نشان داد که کمپلکس NADPH oxidase یک منبع اصلی برای تولید ROS در بافت هیپرتروف شده میوکارد است که به موازات فعال شدن مسیر MAPK در هیپرتروفي، فعالیت این کمپلکس و نیز بیان ساب یونیت‌های $P67^{phox}$ ، $P22^{phox}$ ، $gp91^{phox}$ و $p47^{phox}$ مربوط به این کمپلکس در بافت میوکارد افزایش می‌یابد [۲۱].

در مطالعه‌ای مشابه این محققان نشان دادند که افزایش سطح پروتئین $gp91^{phox}$ و $P67^{phox}$ نقش مهمی در فعال شدن کمپلکس NADPH oxidase در مدل هیپرتروفي میوکارد ناشی از تنگی آئورت دارند. رهایش ROS از این کمپلکس با مهار آنزیم سنتزکننده نیتریک اکساید (eNOS) در اختلال عملکرد دیاستولی بطن چپ هیپرتروف شده مشارکت می‌نماید [۲۲].

طی مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که تزریق آنژیوتانسین به موش‌های $gp91^{phox}/-$ که ساب یونیت $gp91^{phox}$ در آنها حذف شده بود نتوانست مارکرهای هیپرتروفي (شامل افزایش وزن قلب، فیروز بین بافتی، افزایش ANP mRNA و افزایش (B-MHC) را در این حیوانات افزایش دهد [۲۳]. در گزارشی که توسط Chen و همکارانش ارائه شد نشان داده شده است اعمال هیپوکسی و اکسیژن رسانی مجدد (H-R) در سلول‌های کشت شده افزایش تولید ROS و سوپر اکساید از NADPH اکسیداز را به دنبال داشته مهار فارماکولوژیک NADPH اکسیداز تولید ROS ناشی از H-R را کاهش می‌دهد. همچنین به دنبال H-R با فعال شدن پروتئین کیناز C، پروتئین $P47$ فسفریله شده و به کمپلکس NADPH اکسیداز ملحق می‌شود [۲۴].

همچنین در مطالعه Landmesser و همکارانش بر روی مدل ایسکمی میوکارد، آنژیوتانسین II فعالیت NADPH اکسیداز را در بافت میوکارد را افزایش داده و حذف ساب یونیت $P47$ 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 [۲۵]. مطالعه بر روی نمونه‌های انسانی نیز نشان داده است که سطح فعالیت آنزیم NADPH oxidase در قلب بیماران دچار نارسایی قلبی پیشرفته به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد هرچند سطح

تیمار این سلول‌ها با رزوراترول توانست به طور قابل توجهی میزان فسفریلاسیون ساب یونیت را کاهش داده و تولید ROS را در این سلول‌ها سرکوب نماید [۳۴].

نتیجه‌گیری

داده‌های حاصل از مطالعه ما نشان داد که تجویز رزوراترول با دوز نسبتاً کم به مدت ۱۰ هفته می‌تواند از هیپرتانسیون ناشی از تنگی آئورت شکمی جلوگیری کند. همچنین رزوراترول توانست بیان ساب یونیت‌های $P^{22}Phox$ و $gp91^{phox}$ را در بافت هیپرتروف شده میوکارد کاهش دهد. بنابراین این امکان وجود دارد که بخشی از اثرات کاردیوپروتکتیو رزوراترول از این طریق صورت گرفته باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته فیزیولوژی پزشکی (فاطمه میرعبداللهی) مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد و توسط آن دانشگاه تأمین مالی شده است.

غشایی gp 91 و P22 جلوگیری می‌نماید. این ترکیب گیاهی همچنین بیان ساب یونیت سیتوزولی Rac1 را کاهش داده ولی بر میزان بیان سایر ساب یونیت‌های سیتوزولی تأثیر معنی‌داری نگذاشته است. در همین زمینه چندین مطالعه توسط محققین صورت گرفته به طور مثال: محققان نشان دادند که تجویز رزوراترول (20 mg/kg/day) به مدت ۴ هفته به موش‌های دیابتی توانست عملکرد قلب را بهبود بخشد که این اثر از طریق افزایش رهایش نیتریک اکساید و مهار استرس اکسیداتیو در قلب بود. رزوراترول بیان eNOS را تقویت نموده و با کاهش فعالیت NADPH oxidase و کاهش بیان $gp91^{phox}$ اثرات ضد استرس اکسیداتیو خود را اعمال نمود. در این مطالعه رزوراترول اثری بر سطح بیان $P67^{phox}$ و $P47^{phox}$ نداشت [۳۲]. رزوراترول همچنین سطح فعالیت NADPH oxidase و سطح پروتئین $gp91^{phox}$ را در بافت آئورت موش‌های دیابتی نیز کاهش می‌دهد [۳۳].

Guo و همکاران نشان دادند که تیمار سلول‌های عضله صاف عروقی با غلظت بالای گلوکز باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و افزایش میزان فسفریلاسیون $P47^{phox}$ می‌شود.

منابع

1. Morisco C, Sadoshima J, Trimarco B, Arora R, Vatner DE and Vatner SF. Is treating cardiac hypertrophy salutary or detrimental: the two faces of Janus. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiol.* 2003; 284 (4): H1043-H7.
2. Verdecchia P, Schillaci G, Guerrieri M, Gatteschi C, Benemio G, Boldrini F and Porcellati C. Circadian blood pressure changes and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Circulation.* 1990; 81 (2): 528 - 36.
3. Bedard K and Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 2007; 87 (1): 245 - 313.
4. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4 (3): 181 - 9.
5. Babior BM. The respiratory burst oxidase. *Curr. Opin. Hematol.* 1995; 2: 55 - 60.
6. BelAiba RS, Djordjevic T, Petry A, Diemer K, Bonello S, Banfi, B, Hess J, Pogrebniak A, Bickel C and Görlach A. NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radical Biology & Medicine* 2007; 42 (4): 446 - 59.
7. Han HX and Zhang C. E242T polymorphism of NADPH oxidase $P^{22}Phox$ gene and ischemia cerebrovascular disease. 2004.
8. Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS and Edens WA. Novel homologs of gp91 $phox$. *Trends Biochem. Sci.* 2000; 25: 459 - 61.
9. Li JM, Mullen AM, Yun S, Wientjes F, Brouns GY and Thrasher AJ. Essential role of the NADPH oxidase subunit p 47 ($phox$) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester

- and tumor necrosis factor-alpha. *Circ. Res.* 2002; 909: 143 - 50.
10. Gracia-Sancho J, Villarreal G, Zhang Y and García-Cardena G. Activation of SIRT1 by resveratrol induces KLF2 expression conferring an endothelial vasoprotective phenotype. *Cardiovascular Res.* 2010; 85 (3): 514 - 9.
 11. Mashhadi FD, Reza JZ, Jamhiri M, Hafizi Z, Mehrjardi FZ and Safari F. The effect of resveratrol on angiotensin II levels and the rate of transcription of its receptors in the rat cardiac hypertrophy model. *The J. Physiological Sciences* 2017; 67 (2): 303 - 9.
 12. Seymour AM, Giles L, Ball V, Miller JJ, Clarke K, Carr CA and et al. In vivo assessment of cardiac metabolism and function in the abdominal aortic banding model of compensated cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 2015; 106: 249 - 60.
 13. Gupta PK, DiPette DJ and Supowit SC. Protective effect of resveratrol against pressure overload-induced heart failure. *Food Science & Nutrition* 2014; 2 (3): 218 - 29.
 14. Juric D, Wojciechowski P, Das DK and Netticadan T. Prevention of concentric hypertrophy and diastolic impairment in aortic-banded rats treated with resveratrol. *American J. Physiology-Heart and Circulatory Physiol.* 2007; 292 (5): H2138 - H43.
 15. Safari F, Zarei F, Shekarforoush S, Fekri A, Klishadi MS and Hekmatimoghaddam S. Combined 1, 25-Dihydroxy-vitamin D and Resveratrol: A Novel Therapeutic Approach to Ameliorate Ischemia Reperfusion-Induced Myocardial Injury. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2015; 85 (3 - 4): 174 - 84
 16. Mokni M, Hamlaoui S, Karkouch I, Amri M, Marzouki L, Limam F and Aouani E. Resveratrol Provides Cardioprotection after Ischemia/reperfusion Injury via Modulation of Antioxidant Enzyme Activities. *IJPR.* 2013; 12 (4): 867 - 75.
 17. Becatti M, Taddei N, Cecchi C, Nassi N, Nassi PA and Fiorillo C. SIRT1 modulates 67. MAPK pathways in ischemic-reperfused cardiomyocytes. *CMLS.* 2012; 69 (13): 2245 - 60.
 18. Wojciechowski P, Juric D, Louis XL, Thandapilly SJ, Yu L, Taylor C and Netticadan T. Resveratrol arrests and regresses the development of pressure overload- but not volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats. *JN.* 2010; 140 (5): 962 - 8.
 19. Juric D, Wojciechowski P, Das DK and Netticadan T. Prevention of concentric hypertrophy and diastolic impairment in aortic-banded rats treated with resveratrol. *American J. Physiology-Heart and Circulatory Physiol.* 2007; 292 (5): H 2138 - H 43.
 20. Liu Z, Song Y, Zhang X, Liu Z, Zhang W, Mao W, Wang W, Cui W, Zhang X, Jia X and Li N. Effects of trans-resveratrol on hypertension-induced cardiac hypertrophy using the partially nephrectomized rat model. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiol.* 2005; 32 (12): 1049 - 54.
 21. Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M and Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension.* 2002; 40 (4): 477 - 84.
 22. MacCarthy PA, Grieve DJ, Li JM, Dunster C, Kelly FJ and Shah AM. Impaired endothelial regulation of ventricular relaxation in cardiac hypertrophy: role of reactive oxygen species and NADPH oxidase. *Circulation.* 2001; 104 (24): 2967 - 4.
 23. Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N and Shah AM. Pivotal role of a gp91phox-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 2002; 105 (3): 293 - 6.
 24. Chen JX, Zeng H, Tuo QH, Yu H, Meyrick B and Aschner JL. NADPH oxidase modulates myocardial Akt ERK1/2 activation and angiogenesis after hypoxia-reoxygenation. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007; 292 (4): 1664 - 74.



25. Landmesser U, Doerries C, Grote K, Hilfiker-Kleiner D, Luchtefeld M, Schaefer A, Holland SM, Sorrentino S, Manes C, Schieffer B and Drexler H. Critical role of the NAD (P) H oxidase subunit p47phox for left ventricular remodeling/dysfunction and survival after myocardial infarction. *Circulation Res.* 2007; 100 (6): 894 - 903.
26. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G and Shah AM. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 41 (12): 2164 - 71.
27. Li J, Zhu H, Shen E, Wan L, Arnold JMO and Peng T. Deficiency of Rac1 blocks NADPH oxidase activation, inhibits endoplasmic reticulum stress, and reduces myocardial remodeling in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetes* 2010; 59 (8): 2033 - 42.
28. Talukder MA, Elnakish MT, Yang F, Nishijima Y, Alhaj MA, Velayutham M, Hassanain HH and Zweier JL. Cardiomyocyte-specific overexpression of an active form of Rac predisposes the heart to increased myocardial stunning and ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2013; 15: 304 (2): 294 - 302.
29. Elnakish MT, Awad MM, Hassona MD, Alhaj MA, Kulkarni A, Citro LA, Sayyid M, Abouelnaga ZA, El-Sayed O, Kuppusamy P, Moldovan L, Khan M and Hassanain HH. Cardiac remodeling caused by transgenic overexpression of a corn Rac gene. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011; 301 (3): 868 - 80.
30. Higuchi Y, Otsu K, Nishida K, Hirotani S, Nakayama H, Yamaguchi O, Hikoso S, Kashiwase K, Takeda T, Watanabe T, Mano T, Matsumura Y, Ueno H and Hori M. The small GTP-binding protein Rac1 induces cardiac myocyte hypertrophy through the activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and nuclear factor-kappa B. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (23): 20770 - 77.
31. Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompré AM, Vandecasteele G and Lezoualc'h F. cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* 2005; 97 (12): 1296 - 304.
32. Zhang H, Morgan B, Potter BJ, Ma L, Dellsperger KC, Ungvari Z and Zhang C. Resveratrol improves left ventricular diastolic relaxation in type 2 diabetes by inhibiting oxidative/nitrative stress: in vivo demonstration with magnetic resonance imaging. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010; 299 (4): 985 - 94.
33. Zhang H, Zhang J, Ungvari Z and Zhang C. Resveratrol improves endothelial function: role of TNF {alpha} and vascular oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009; 29 (8): 1164 - 71.
34. Guo R, Li W, Liu B, Li S, Zhang B and Xu Y. Resveratrol protects vascular smooth muscle cells against high glucose-induced oxidative stress and cell proliferation in vitro. *Med. Sci. Monit. Basic. Res.* 2014; 20: 82 - 92.