

تأثیر آتورواستاتین بر استرس اکسیداتیو پانکراس موش صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

دکتر محمدتقی محمدی^۱، مهدی رضائی بیناباج^۱، محمد حسین میرجلیلی^۱، مجتبی قائدنیای جهرمی^۱، مهوش جعفری^۲، فاطمه سالم^۲

(۱) گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، (۲) گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: اقدسیه، سه راه اراج، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران، دکتر محمدتقی محمدی؛
e-mail: Mohammadi.mohammad@yahoo.com

چکیده

مقدمه: پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند داروی آتورواستاتین سبب مهار استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت در بسیاری از بافت‌های بدن می‌شود. بر این اساس پژوهش حاضر در نظر داشت تا اثرات درمانی داروی آتورواستاتین بر پاسخ استرس اکسیداتیو بافت پانکراس در موش صحرایی دیابتی را مورد بررسی قرار دهد. مواد و روش‌ها: به منظور انجام پژوهش، موش‌های صحرایی به صورت تصادفی در چهار گروه طبیعی، طبیعی درمان شده، دیابتی و دیابتی درمان شده تقسیم شدند (هر گروه تعداد=۵). به منظور القا دیابت از تزریق داخل وریدی استرپتوزوتوسین (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) استفاده گردید. بعد از گذشت ۳۰ روز از درمان حیوانات زیر بیهوشی عمیق کشته و پانکراس جدا شد. پس از هموژنیزه کردن بافت‌ها، فعالیت آنزیم‌های سوپراکساید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، غلظت گلوتاتیون (GSH) و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) بافت پانکراس تعیین گردید. یافته‌ها: در گروه کنترل دیابتی علاوه بر افزایش گلوکز خون (۷۸٪) فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در مقایسه با گروه طبیعی به طور معنی‌داری افزایش داشت. هم‌چنین، القا دیابت سبب کاهش سطح گلوتاتیون به میزان ۴۰٪ شده و میزان MDA را ۵۳٪ افزایش داد. درمان با آتورواستاتین توانست از افزایش معنی‌دار فعالیت SOD جلوگیری نماید و میزان گلوتاتیون را به حد طبیعی برساند. نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر افزایش قند خون ناشی از القا دیابت سبب افزایش رادیکال‌های آزاد و بروز استرس اکسیداتیو در بافت پانکراس موش صحرایی می‌شود. هم‌چنین، درمان با آتورواستاتین با مهار تولید این رادیکال‌ها از استرس اکسیداتیو این بافت در زمان دیابت جلوگیری می‌نماید.

واژگان کلیدی: آتورواستاتین، افزایش قند خون، استرس اکسیداتیو، استرپتوزوتوسین، سوپراکساید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون
دریافت مقاله: ۹۱/۸/۹ - دریافت اصلاحیه: ۹۱/۱۰/۱۱ - پذیرش مقاله: ۹۱/۱۰/۱۷

مقدمه

افزایش مقاومت به انسولین می‌باشد (دیابت نوع دوم). دیابت با علایمی از قبیل هیپرگلیسمی (قند خون بالا)، پراداری، پرنوشی، پرخوری و ظاهر شدن گلوکز در ادرار مشخص می‌شود.^{۲،۳} این سندرم در طی زمان‌های طولانی با عوارض وخیم و غیر قابل برگشت مانند رتینوپاتی، نفروپاتی، نوروپاتی و آسیب‌های عروقی همراه است.^{۵،۴}

دیابت شیرین یک بیماری متابولیکی مزمن بوده و در حال حاضر بیش از ۳۴۷ میلیون انسان مبتلا به این بیماری در جهان وجود دارد.^۱ علت دیابت یا به علت کاهش ترشح انسولین به دلیل تخریب سلول‌های بتا بوده (دیابت نوع اول) و یا کاهش پاسخ‌دهی گیرنده‌های محیطی انسولین به دلیل

از تغییرات ایجاد شده سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در طول دیابت را مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (Wistar) تهیه شده از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله در محدوده‌ی وزنی ۲۶۰-۲۴۰ گرم استفاده شد. تمام آزمایش‌ها بر اساس 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 مناسب، درجه‌ی حرارت 22 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد و با دسترسی آزاد به آب و غذا در طی دوره آزمایش نگهداری می شدند.

به منظور ایجاد دیابت قندی نوع اول (دیابت وابسته به انسولین) از تزریق داخل وریدی استرپتوزوتوسین (STZ) استفاده گردید. پس از بیهوش کردن حیوان با ترکیب کتامین (۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلانین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، ۴۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن موش از محلول از پیش تهیه شده استرپتوزوتوسین از راه ورید جانبی دم تزریق انجام شد. ۵ روز بعد از تزریق حیوانات با علایم پرنوشتی، پرادراری و وجود گلوکز در ادرار که با استفاده از نوار آنزیمی (Enzyme strip) مشخص می‌گردید به عنوان حیوان دیابتی انتخاب و وارد دوره آزمایش گردیدند.

برای انجام پژوهش حاضر حیوانات مورد آزمایش به صورت تصادفی در ۴ گروه به شرح زیر قرار گرفتند:

۱- گروه کنترل طبیعی: حیوانات این گروه حیوانات سالم و طبیعی بودند که از آن‌ها به عنوان گروه کنترل طبیعی استفاده گردید.

۲- گروه طبیعی درمان شده (طبیعی و آتورواستاتین): تمام مراحل انجام آزمایش در این گروه مانند گروه کنترل طبیعی بود با این تفاوت که حیوانات این گروه روزانه به مدت ۳۰ روز از داروی آتورواستاتین (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به صورت خوراکی دریافت کردند.

۳- گروه کنترل دیابتی: دیابت نوع اول در حیوانات این گروه با تزریق داخل وریدی استرپتوزوتوسین القا گردید. پس از ۵ روز و پس از ثابت شدن علایم دیابت (پرنوشتی و پرادراری) از حیوانات این گروه به عنوان کنترل دیابتی استفاده شد.

افزایش قند خون مزمن ناشی از دیابت به واسطه‌ی تولید و تجمع رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) سبب بروز فرآیند استرس اکسیداتیو در بافت‌های بدن، به ویژه سلول‌های بتای پانکراس می‌گردد.^{۶،۷} تشکیل این رادیکال‌ها سبب تخریب درشت مولکول‌های حیاتی سلول‌ها، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و در نهایت آسیب سلولی می‌شود.^{۸،۹} سیستم آنتی‌اکسیدانی به واسطه‌ی سیستم آنزیمی، دفاع اصلی بدن در برابر آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد بوده که آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز جزئی از آن به شمار می‌روند.^{۱۰-۱۱} از سوی دیگر گلوکاتیون مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی بوده که با استرس اکسیداتیو مقابله می‌نماید.^{۱۱} بر اساس یافته‌های پژوهش‌های اخیر تشکیل ROS ها در برخی از مدل‌های آزمایشگاهی دیابت و بروز استرس اکسیداتیو در پانکراس یکی از مسیرهای آسیب زنده‌ی هیپرگلیسمی ناشی از دیابت می‌باشد.^{۱۲} بر این اساس، با جلوگیری از ازدیاد ROS ها در بافت پانکراس می‌توان تا حدود زیادی اثرات مخرب آن در طی دیابت را مهار نمود.

پژوهش‌های اخیر اثرات بسیار سودمندی از داروهای گروه استاتین‌ها را در جلوگیری از اختلالات قلبی - عروقی در برخی شرایط بیماری‌زایی مانند دیابت شیرین را مستقل از اثرات کاهندگی کلسترول خون گزارش کرده‌اند.^{۱۳} بین اثرات چندگانه‌ی استاتین‌ها اعمال ضد التهابی و ضد استرس اکسیداتیو این داروها در شرایط بیماری‌زایی زمینه‌های پژوهشی گسترده‌ای را برای مصرف این داروها به وجود آورده است.^{۱۴} استاتین‌ها جز داروهای کاهنده‌ی کلسترول خون بوده که به واسطه‌ی مهار آنزیم ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوکوتاریل کوآنزیم-آ (HMG-CoA) ردوکتاز سبب کاهش سنتز کلسترول در کبد می‌گردند. در پژوهش Lefer سیمواستاتین اثرات ضد التهابی قوی بر قلب حیوانات دیابتی داشته و از راه افزایش تولید نیتریک اکساید سبب محافظت قلب در برابر ایسکمی گردید.^{۱۵} همچنین، در پژوهش دیگری پیتواستاتین اثرات مهاری بر استرس اکسیداتیو قلب در زمان هیپوکسی بطن داشته،^{۱۶} و حتی در یک بررسی استفاده از استاتین‌ها منجر به بهبود عملکرد اندوتلیوم عروق مغز در موش صحرایی دیابتی شده است.^{۱۷} بنابراین پژوهش حاضر در نظر داشت تا اثرات ضد استرس اکسیداتیو داروی آتورواستاتین بر بافت پانکراس موش صحرایی در جلوگیری

دقیقه تجزیه می‌شود. فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

برای سنجش میزان گلوکاتاتیون بافت از روش Tietz استفاده شد.^{۲۰} غلظت مناسبی از نمونه‌ی همورنه با ۱۰ میکرولیتر اسید سولفوسالسیلیک ۵٪ مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی 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٪ محلول در سیترات سدیم ۱٪ واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر در طی ۵ دقیقه رویت شد. با استفاده از محلول گلوکاتاتیون ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منحنی استاندارد گلوکاتاتیون رسم گردیده و غلظت گلوکاتاتیون بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید. محلول استاندارد گلوکاتاتیون در غلظت‌های ۲۰۰ - ۲۵ میکرو مولار تهیه شد.

برای تعیین فرآورده‌ی نهایی پراکسیداسیون لیپیدها میزان مالون دی آلدئید (MDA) از روش Satho استفاده شد.^{۲۱} به ۵۰۰ میکرولیتر بافت همورنه ۱/۵ میلی‌لیتر، تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰٪ اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی را برداشته و ۲ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک ۰/۶۷٪ 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 g سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول موج ۵۲۲ نانومتر خوانده شد. غلظت MDA با استفاده از ۱، ۱، ۳ و ۳ تترا اتوکسی پروپان به عنوان استاندارد تعیین شده و MDA بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. محلول استاندارد MDA در غلظت‌های ۲۰-۰/۲ میکرومولار در اسید سولفوریک ۱۰٪ تهیه شد.

برای تعیین غلظت پروتئین از روش براد فورد استفاده گردید.^{۲۲} حجم معینی از عصاره‌ی بافتی با رقت مناسب برداشته و به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول برادفورد با رقت ۱:۳ به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه اینکوبه گردید. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب رویت شد. برای رسم منحنی استاندارد ابتدا محلول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آلبومین سرم گاوی (BSA) تهیه گردید. سپس غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم

۴- گروه دیابتی درمان شده (دیابتی و آتورواستاتین): تمام مراحل انجام آزمایش در این گروه مانند گروه کنترل دیابتی بود، با این تفاوت که حیوانات این گروه روزانه به مدت ۳۰ روز از داروی آتورواستاتین (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به صورت خوراکی دریافت کردند.

در پایان ۳۰ روز دوره‌ی آزمایش، تمام حیوانات تحت بیهوشی عمیق قرار گرفته و بعد از خونگیری از راه قلب (برای اندازه‌گیری گلوکز خون) بافت پانکراس جدا گردیده و به سرعت به داخل نیتروژن مایع و سپس به فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد انتقال پیدا کرد. در روز آزمایش، بافت‌های منجمد شده به دقت توزین، و به نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات سالین همورنیزه شده، سپس نمونه‌ها در ۱۴۰۰۰ گرم و ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. از محلول رویی برای سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی مورد نظر استفاده شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز (SOD) از روش Winterbourn استفاده شد.^{۱۸} ۰/۲ میلی‌لیتر EDTA ۰/۱ مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر نیتروبلوتترانزولیموم (NBT) ۱/۵ میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر بافت همورنیزه (یا بافر برای کنترل) به یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۰/۰۵ میلی‌لیتر ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار 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 رویت شد. یک واحد فعالیت SOD مقدار آنزیمی که نیاز است تا ۵۰٪ از سرعت احیا NBT مهار شود. فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Abei استفاده شد.^{۱۹} به حجم معینی از عصاره‌ی بافتی، اتانول مطلق (۰/۰۱ میلی‌لیتر/ میلی‌لیتر) اضافه و مدت ۳۰ دقیقه در یخ اینکوبه گردید. سپس تریتون ۱۰۰ X - ۱۰٪ با غلظت نهایی ۱٪ اضافه شد. این محلول برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم به کار برده شد. واکنش با اضافه کردن ۰/۰۵ میلی‌لیتر H2O2 ۳۰ میلی‌مولار به نمونه‌ی بافتی در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار pH=۷ شروع شد. سپس جذب در طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت کاتالاز مقدار یک میکرومول از H2O2 است که در یک

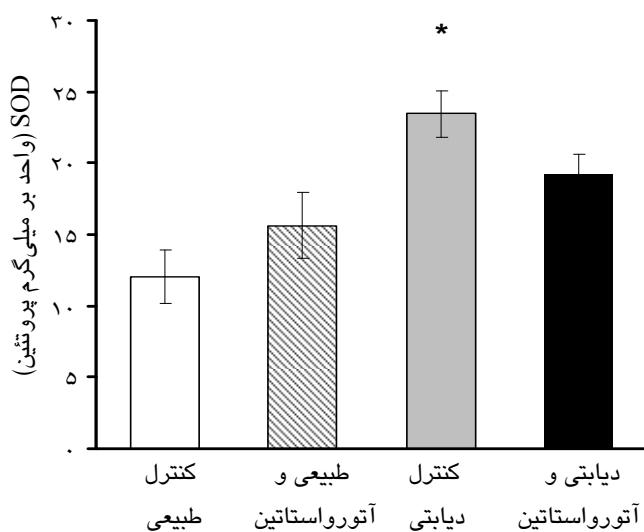
درمان با آتورواستاتین تغییرات معنی‌داری در میزان گلوکز خون حیوانات دیابتی درمان شده در مقایسه با حیوانات کنترل دیابتی ایجاد نکرد.

جدول ۱- تغییرات مصرف آب آشامیدنی (میلی‌لیتر) در گروه‌های مورد بررسی. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است.

آب مصرفی (میلی‌لیتر)	کنترل طبیعی	کنترل دیابتی	طبیعی و آتورواستاتین	دیابتی و آتورواستاتین
روز ۵	۳۲ $\pm$ ۲	۳۲ $\pm$ ۳	۱۹۵ $\pm$ ۸*	۱۸۵ $\pm$ ۱۰*
روز ۱۵	۳۹ $\pm$ ۲	۳۹ $\pm$ ۳	۲۰۱ $\pm$ ۱۲*	۱۹۹ $\pm$ ۸*
روز ۳۰	۲۸ $\pm$ ۱	۲۵ $\pm$ ۳	۲۱۱ $\pm$ ۱۵*	۲۰۸ $\pm$ ۱۸*

* تفاوت معنی‌دار با $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل طبیعی.

نمودار ۲ میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) بافت پانکراس بر حسب واحد/میلی‌گرم پروتئین را در گروه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد. اندازه‌گیری میزان فعالیت این آنزیم پس از ۳۰ روز از القا دیابت افزایش معنی‌داری در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه کنترل طبیعی نشان داد، به طوری که میزان فعالیت این آنزیم در گروه کنترل طبیعی و کنترل دیابتی به ترتیب برابر با $12/0 \pm 1/7$ و $23/4 \pm 1/6$ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود. یافته‌های ارائه شده در نمودار گویای این واقعیت است که درمان با داروی آتورواستاتین به مدت ۳۰ روز توانست از افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در گروه دیابتی درمان شده جلوگیری نماید.



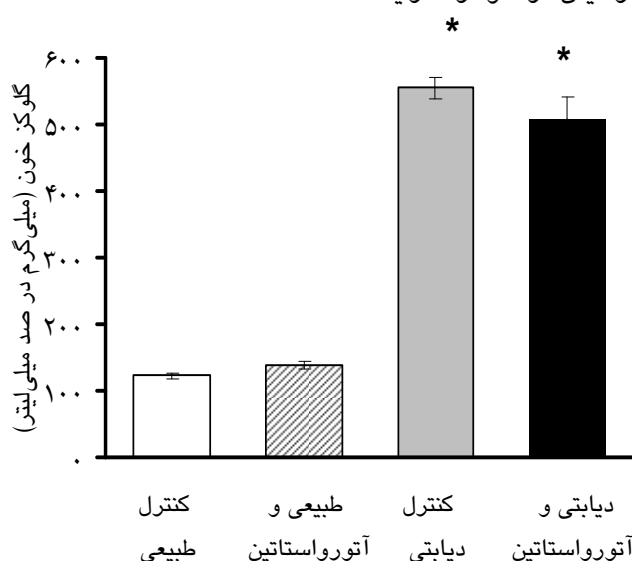
نمودار ۲- میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) بافت پانکراس حیوانات طبیعی و دیابتی شده بعد از گذشت ۳۰ روز از القا دیابت: درمان با آتورواستاتین از افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD در حیوانات دیابتی جلوگیری می‌کند. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف

در میلی‌لیتر از آن ساخته و به عنوان غلظت‌های استاندارد استفاده شد.

یافته‌های به دست آمده به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است. برای مقایسه‌ی داده‌های به دست آمده از نرم‌افزار SPSS و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی (Tukey's post-hoc test) استفاده و در تمام مقایسه‌ها $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

میزان گلوکز خون گروه‌های مورد بررسی در پایان آزمایش در نمودار ۱ ارائه شده است.

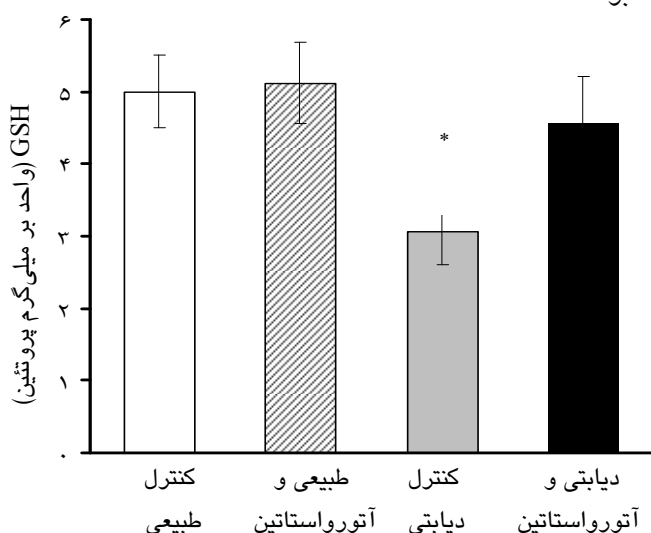


نمودار ۱- تغییرات غلظت گلوکز خون (میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر): القا دیابت در گروه‌های دیابتی با استفاده از تزریق داخل وریدی استرپتوزوتوسین (STZ) منجر به افزایش معنی‌دار گلوکز خون می‌شود که درمان با آتورواستاتین تاثیری بر آن ندارد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است. * تفاوت معنی‌دار با $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل طبیعی.

سطح گلوکز خون حیوانات گروه کنترل طبیعی 123 ± 4 میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر بود که ۳۰ روز درمان با داروی آتورواستاتین تغییر قابل ملاحظه و معنی‌داری بر میزان گلوکز خون حیوانات طبیعی ایجاد نکرد. بروز علائم پرادراری، وجود گلوکز در ادرار و افزایش پرنوشی دلیلی قاطع بر بروز دیابت نوع اول در حیوانات دیابتی شده بود (جدول ۱).

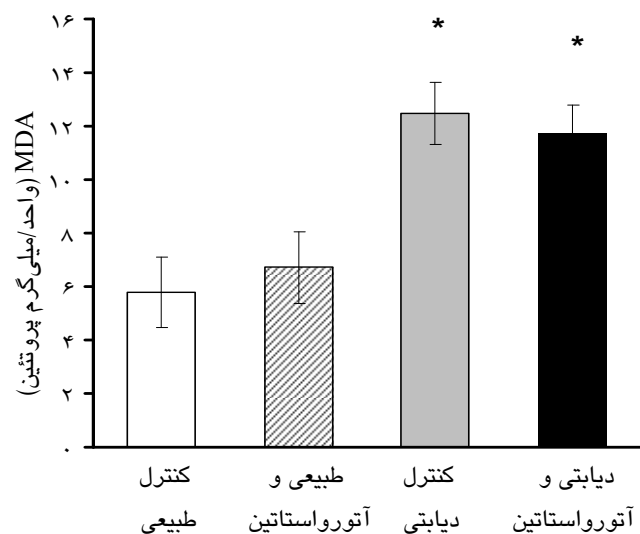
از سوی دیگر میزان گلوکز خون حیوانات کنترل دیابتی بعد از گذشت ۳۰ روز از القا دیابت به میزان ۷۸٪ افزایش داشت (555 ± 16 میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر)، که ۳۰ روز

به ترتیب برابر با $5/0 \pm 0/5$ و $3/0 \pm 0/4$ نانومول بر میلی گرم پروتئین بود. درمان با داروی آتورواستاتین در گروه دیابتی به مدت ۳۰ روز توانست از کاهش معنی دار غلظت گلوکاتایون جلوگیری نماید، به طوری که میزان آن در گروه دیابتی درمان شده برابر با $4/5 \pm 0/6$ نانومول بر میلی گرم پروتئین بود.



نمودار ۴- غلظت گلوکاتایون (GSH) بافت پانکراس حیوانات نرمال و دیابتی شده بعد از گذشت ۳۰ روز از القاء دیابت و تاثیر درمانی آتورواستاتین بر آن: آتورواستاتین از کاهش معنی دار GSH در طی دیابت جلوگیری می کند. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است. * تفاوت معنی دار با $P < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل طبیعی.

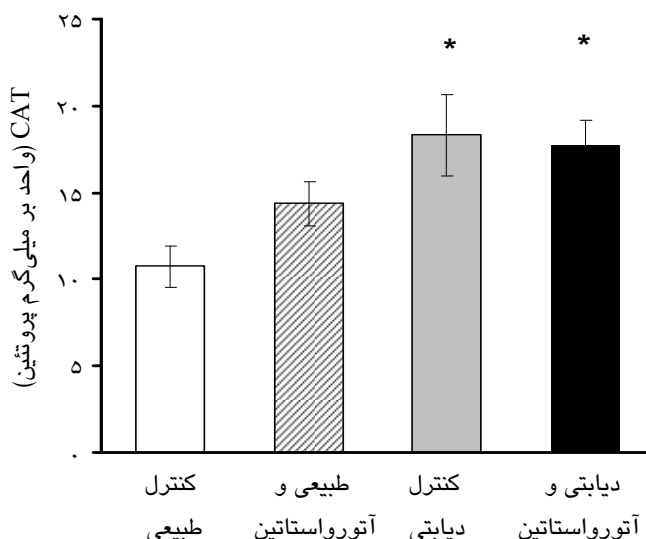
تغییرات غلظت مالون دی آلدئید (MDA) بافت پانکراس بر حسب نانومول بر میلی گرم پروتئین در نمودار ۵ نشان داده شده است.



نمودار ۵- غلظت مالون دی آلدئید (MDA) بافت پانکراس در گروه های مورد مطالعه: القاء دیابت سبب افزایش

معیار نشان داده شده است. * تفاوت معنی دار با $P < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل طبیعی.

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بافت پانکراس بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین در حیوانات گروه های طبیعی و دیابتی شده در نمودار ۳ ارایه شده است.



نمودار ۳- فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) بافت پانکراس در گروه های مورد مطالعه: القاء دیابت سبب افزایش فعالیت آنزیم CAT می شود که درمان با آتورواستاتین بر فعالیت آن بی تاثیر است. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است. * تفاوت معنی دار با $P < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل طبیعی.

القاء دیابت در طی ۳۰ روز سبب افزایش فعالیت این آنزیم (۴۱٪) در حیوانات گروه کنترل دیابتی گردید. مقایسه ای آماری یافته های به دست آمده از دو گروه کنترل طبیعی و گروه کنترل دیابتی معنی دار بوده و میزان فعالیت این آنزیم در دو گروه مورد نظر به ترتیب برابر با $10/7 \pm 1/2$ و $18/3 \pm 2/3$ واحد/میلی گرم پروتئین بود. درمان با داروی آتورواستاتین به مدت ۳۰ روز هیچ تاثیر معنی داری در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه طبیعی درمان شده و دیابتی درمان شده به ترتیب در مقایسه با گروه کنترل طبیعی و کنترل دیابتی به وجود نیاورد.

نمودار ۴ تغییرات غلظت گلوکاتایون بافت پانکراس بر حسب نانومول بر میلی گرم پروتئین در گروه های مورد بررسی را نشان می دهد. میزان غلظت گلوکاتایون پانکراس در حیوانات گروه کنترل دیابتی در مقایسه با حیوانات گروه کنترل طبیعی به طور معنی داری به میزان ۴۰٪ کاهش داشت، به طوری که مقدار آن در گروه کنترل طبیعی و کنترل دیابتی

معنی‌دار در میزان MDA می‌شود که درمان با آتورواستاتین بر میزان آن بی‌تاثیر است. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است. * تفاوت معنی‌دار با $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل طبیعی.

القا دیابت در طی ۳۰ روز میزان غلظت MDA پانکراس را در حیوانات گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه کنترل طبیعی به طور معنی‌داری به میزان ۵۳٪ افزایش داد. درمان با داروی آتورواستاتین به مدت ۳۰ روز هیچ تغییر معنی‌داری در میزان غلظت MDA گروه طبیعی درمان شده و گروه دیابتی درمان شده به ترتیب در مقایسه با گروه کنترل طبیعی و گروه کنترل دیابتی ایجاد نکرد.

بحث

افزایش تولید گونه‌های آزاد اکسیژن (ROS) در بافت‌های مختلف بدن به ویژه بافت پانکراس یکی از فاکتورهای اصلی آسیب رسان در دیابت شیرین می‌باشد.^{۵،۱۲} افزایش تولید این رادیکال‌های مخرب به دلیل افزایش قند خون علاوه بر تخریب و مرگ سلول‌های بتا از راه تغییر در عملکرد این سلول‌ها سبب تشدید دیابت می‌شود.^{۲۳} یافته‌های به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد القا دیابت علاوه بر افزایش گلوکز خون (۷۸٪) از راه تغییر در سیستم آنتی‌اکسیدان بافت پانکراس سبب بروز استرس اکسیداتیو در این بافت شده، زیرا فعالیت آنزیم‌های SOD و کاتالاز، مقدار گلوکاتایون و در نهایت میزان MDA (شاخص پراکسیدایون لیپیدها) بافت پانکراس در طی دیابت تغییر پیدا کرد.

به منظور القا دیابت نوع اول در پژوهش حاضر از تزریق داخل وریدی استرپتوزوتوسین استفاده گردید. استرپتوزوتوسین یک آنالوگ گلوکز بوده که برای سلول‌های بتای پانکراس سمی و کشنده است و به طور ویژه سبب آسیب به این سلول‌ها می‌شود.^{۲۴} در بررسی حاضر علاوه بر پرنوشی، پرادراری و وجود گلوکز در ادرار که با تغییر رنگ نوار آنزیمی ویژه مشخص می‌گردید افزایش گلوکز خون به عنوان شاخص اصلی دیابت در نظر گرفته شد. هیپرگلیسمی از علایم اولیه‌ی دیابت بوده و مسئول اصلی بروز عوارض مزمن دیابت به شمار می‌آید.^{۲۵} بر اساس یافته‌های به دست آمده تزریق داخل وریدی استرپتوزوتوسین بعد از ۵ روز سبب بروز علایم دیابت از جمله پرنوشی و پرادراری شده (جدول ۱)، و توانست گلوکز خون را به میزان ۷۸٪ افزایش دهد (نمودار ۱). بر پایه‌ی پژوهش‌ها افزایش قند خون ایجاد

شده ناشی از دیابت به دلیل فعال کردن فاکتورهای مخرب به ویژه افزایش تولید ROS ها در بافت پانکراس موجب آسیب به سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس می‌شود.^{۲۶} از سوی دیگر آتورواستاتین در پژوهش حاضر نتوانست بر میزان گلوکز خون به صورت معنی‌داری موثر باشد (نمودار ۱). این یافته‌ها با برخی بررسی‌ها همخوانی داشته،^{۱۷} و تاییدی بر این نکته است که آتورواستاتین بر گلوکز خون حیوانات دیابتی موثر نمی‌باشد.

در پژوهش حاضر رابطه‌ی مستقیمی بین تغییرات گلوکز خون با میزان تغییرات آنزیم‌های درگیر در فرآیند تولید ROS ها و بروز استرس اکسیداتیو وجود داشت. زیرا در میزان فعالیت آنزیم‌های درگیر در فرآیند استرس اکسیداتیو از جمله کاتالاز و SOD افزایش معنی‌داری در پاسخ به دیابت وجود داشت (نمودار ۲ و ۳). افزایش تولید ROS ها (آنیون‌های سوپراکسید و هیدروکسیل) در برخی شرایط بیماری‌زایی مانند دیابت ساختار و عملکرد پروتئین‌ها، بیان ژن و مسیرهای پیام رسانی، بسیاری از فاکتورهای رشد را تحت تاثیر قرار می‌دهند.^{۱۱} بر این اساس افزایش تولید ROS ها در برخی از شرایط بیماری‌زایی با تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ارتباط است.^۹ تحت شرایط فیزیولوژی اثرات سمی این رادیکال‌ها توسط آنزیم‌هایی مانند SOD، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز خنثی می‌شود.^{۷-۸} آنزیم کاتالاز نقش مهمی در تبدیل هیدروژن پراکسید به آب دارد، این آنزیم مانند SOD از تجمع یون هیدروژن پراکسید و ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت‌ها جلوگیری می‌نماید.^۷ داده‌های کمی در ارتباط با تغییرات آنزیم SOD و کاتالاز بافت پانکراس هنگام ایجاد استرس اکسیداتیو در مواجهه با هیپرگلیسمی وجود دارد، اما در بررسی‌های انجام شده توسط بعضی از پژوهش‌گران افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در برخی بافت‌های بدن به عنوان شاخصی از بروز استرس اکسیداتیو می‌باشد.^۶ از آنجا که سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت پانکراس در مقایسه با سایر بافت در حالت طبیعی بسیار پایین است،^{۲۶} بنابراین افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در بررسی حاضر به احتمال زیاد در پاسخ به غلظت بالای ROS بوده که در نتیجه هیپرگلیسمی افزایش پیدا کرده است.

در بررسی حاضر تغییر در مقدار گلوکاتایون یکی دیگر از شاخص‌های استرس اکسیداتیو بوده میزان غلظت آن کاهش معنی‌داری در گروه کنترل دیابتی داشته است (نمودار ۴). زیرا گلوکاتایون به عنوان جمع‌آوری کننده‌ی رادیکال‌های آزاد

می‌باشد. همچنین، در پژوهش حاضر آتورواستاتین توانست از کاهش معنی‌دار گلوکاتینون در حین دیابت جلوگیری کرده و حتی مقدار آن را به مقدار طبیعی برساند (نمودار ۴). از آنجا که گلوکاتینون به عنوان جمع‌آوری‌کننده‌ی ROS عمل می‌کند،^{۷،۲۷} افزایش آن توسط آتورواستاتین یکی از راه‌های کاهش این رادیکال‌ها در بافت پانکراس در حین دیابت بوده که می‌تواند با بروز استرس اکسیداتیو مقابله نماید. یافته‌های به دست آمده در بررسی حاضر با اثرات ضد استرس اکسیداتیو آتورواستاتین در سایر بافت‌های بدن مانند قلب و مغز در برخی شرایط بیماری‌زایی نظیر فشار خون بالا، نارسایی قلبی و حتی دیابت همخوانی دارد.^{۱۴،۲۸،۲۹} اگرچه در پژوهش حاضر میزان MDA به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها در پاسخ به درمان تحت تاثیر قرار نگرفته که این شاید به دلیل شدت بالای دیابت و یا نیاز به درمان طولانی‌مدت با آتورواستاتین باشد. نکته‌ی جالب توجه دیگری که در بررسی حاضر به دست آمد این بود که آتورواستاتین بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی پانکراس در شرایط طبیعی هیچ تغییری ایجاد نکرد. در کل می‌توان گفت آتورواستاتین می‌تواند از راه مهار فرآیند استرس اکسیداتیو پانکراس از آسیب‌های ایجاد شده به واسطه‌ی رادیکال‌های آزاد در طی دیابت جلوگیری به عمل آورد.

به طور خلاصه یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد القا دیابت نوع اول از راه تغییر در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت پانکراس سبب افزایش تولید ROS و ایجاد استرس اکسیداتیو در این بافت می‌گردد. همچنین، بر اساس یافته‌های بررسی کنونی داروی آتورواستاتین این توانایی را دارد که از تغییر آنزیم‌ها و فاکتورهای درگیر در تولید ROS در زمان دیابت که منجر به بروز استرس اکسیداتیو در بافت پانکراس شده جلوگیری نماید.

سپاسگزاری: به این‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله که هزینه‌های مالی پژوهش حاضر را فراهم نموده و همچنین از همکاری گروه بیوشیمی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله به منظور انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی این طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

عمل می‌نماید،^{۲۷} بنابراین کاهش غلظت آن سبب تجمع ROS شده و منجر به بروز استرس اکسیداتیو در بافت پانکراس گردیده است. همچنین، در بررسی حاضر میزان MDA (شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها) بافت پانکراس در گروه دیابتی افزایش معنی‌داری داشت (نمودار ۵). در هنگام بروز استرس اکسیداتیو به طور معمول میزان MDA افزایش پیدا می‌کند، که نشان‌دهنده‌ی القا استرس اکسیداتیو و میزان پراکسیداسیون لیپیدها است.^{۱۱،۲۷} به هر حال افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم SOD و کاتالاز، کاهش مقدار گلوکاتینون و همچنین افزایش میزان MDA بافت پانکراس در گروه کنترل دیابتی دلیلی قاطع بر بروز پدیده‌ی استرس اکسیداتیو در این بافت می‌باشد.

یافته‌های به دست آمده در بررسی حاضر افزایش تولید ROS و بروز فرآیند استرس اکسیداتیو در بافت پانکراس حیوان دیابتی را به خوبی نشان می‌دهد. با جلوگیری از بروز پدیده‌ی استرس اکسیداتیو در بافت پانکراس می‌توان شدت پیشرفت دیابت را کاهش داد، زیرا توانایی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی پانکراس در مقابل ROS در مقایسه با سایر بافت‌های بدن در سطح بسیار پایینی بوده و سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس در معرض آسیب بیشتری در مقابل این رادیکال‌ها قرار دارند.^{۲۶} بنابراین، جلوگیری از افزایش تولید این رادیکال‌ها در بافت پانکراس توسط داروهای مصرفی دیابت می‌تواند از اهمیت بسزایی برخوردار باشد. در پژوهش حاضر تاثیر داروی آتورواستاتین بر بروز استرس اکسیداتیو پانکراس، که در حین دیابت ایجاد شده، مورد بررسی قرار گرفت. کاربرد بالینی داروی آتورواستاتین توسط کاهش کستروکول خون از راه مهار آنزیم HMG Co-A ردوکتاز کبدی می‌باشد. درمان با آتورواستاتین در این بررسی از افزایش معنی‌دار آنزیم SOD، که به واسطه‌ی دیابت افزایش یافته بود، جلوگیری به عمل آورد (نمودار ۲). به احتمال زیاد این اثر به دلیل کاهش تولید آنیون‌های سوپراکسید بوده که آتورواستاتین به دلایل ناشناخته و یا با افزایش مقدار گلوکاتینون سبب کاهش آن شده که این خود نشان‌دهنده‌ی کاهش استرس اکسیداتیو به واسطه‌ی این دارو

References

1. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 2011; 378: 31-40.
2. Poitout V. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta-cell: myth or reality? *Biochem Soc Trans* 2008; 36: 901-4.
3. Yoon JW, Jun HS. Cellular and molecular roles of beta cell autoantigens, macrophages and T cells in the pat-

- hogenesis of autoimmune diabetes. *Arch Pharm Res* 1999; 22: 437-47.
4. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106: 473-81.
5. Luitse MJ, Biessels GJ, Rutten GE, Kappelle LJ. Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 2012; 11: 261-71.
6. Jacob MH, Pontes MR, Araujo AS, Barp J, Irigoyen MC, Llesuy SF, et al. Aortic-banding induces myocardial oxidative stress and changes in concentration and activity of antioxidants in male Wistar rats. *Life Sci* 2006; 79: 2187-93.
7. Tsutsui HS, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. *Cardiovasc Res* 2009; 81: 449-56.
8. Scandalios JG. The rise of ROS. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 483-6.
9. Sindhu RK, Roberts CK, Ehdaie A, Zhan CD, Vaziri ND. Effects of aortic coarctation on aortic antioxidant enzymes and NADPH oxidase protein expression. *Life Sci* 2005; 76: 945-53.
10. 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* 2004; 165: 219-26.
11. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative Stress and Mitochondrial DNA Damage in Heart Failure. *Circ J* 2008; Suppl A: 31-7.
12. Ramachandran B, Ravi K, Narayanan V, Kandaswamy M, Subramanian S. Protective effect of macrocyclic binuclear oxovanadium complex on oxidative stress in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2004; 149: 9-21.
13. Arboix A, Garcia-Eroles L, Oliveres M, Targa C, Balcells M, Massons J. Pretreatment with statins improves early outcome in patients with first-ever ischaemic stroke: a pleiotropic effect of statins or a beneficial effect of hypercholesterolemia? *BMC Neurol* 2010; 10: 47.
14. Li J, Sun YM, Wang LF, Li ZQ, Pan W, Cao HY. Comparison of effects of simvastatin versus atorvastatin on oxidative stress in patients with coronary heart disease. *Clin Cardiol* 2010; 33: 222-7.
15. Lefer DJ, Scalia R, Jones SP, Sharp BR, Hoffmeyer MR, Farvid AR, et al. HMG-CoA reductase inhibition protects the diabetic myocardium from ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2001; 15: 1454-6.
16. Inamoto S, Yoshioka T, Yamashita C, Miyamura M, Mori T, Ukimura A, et al. Pitavastatin reduces oxidative stress and attenuates intermittent hypoxia-induced left ventricular remodeling in lean mice. *Hypertens Res* 2010; 33: 579-86.
17. Mooradian AD, Haas MJ, Batejko O, Hovsepian M, Feman SS. Statins ameliorate endothelial barrier permeability changes in the cerebral tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 2005; 54: 2977-82.
18. Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975; 85: 337-41.
19. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-6.
20. Tietz F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amount of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Biochim* 1969; 27: 502-22.
21. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90: 37-43.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
23. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 24-38.
24. Ohly P, Gleichmann H. Metallothionein: in vitro induction with zinc and streptozotocin in pancreatic islets of mice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1995; 103: 79-82.
25. Graves DT, Kayal RA. Diabetic complications and dysregulated innate immunity. *Front Biosci* 2008; 13: 1227-39.
26. Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94: 623-32.
27. Polizio AH, Gorzalczy S, Taira C, Pena C. Aortic coarctation induces oxidative stress in rat tissues. *Life Sci* 2006; 79: 596-600.
28. Murrow JR, Sher S, Ali S, Uphoff I, Patel R, Porkert M, et al. The differential effect of statins on oxidative stress and endothelial function: atorvastatin versus pravastatin. *J Clin Lipidol* 2012; 6: 42-9.
29. Castro PF, Miranda R, Verdejo HE, Greig D, Gabrielli LA, Alcaïno H, et al. Pleiotropic effects of atorvastatin in heart failure: role in oxidative stress, inflammation, endothelial function, and exercise capacity. *J Heart Lung Transplant* 2008; 27: 435-41.

Original Article

Effect of Atorvastatin on Pancreatic Oxidative Stress in Streptozotocin-induced Diabetic Rat

Mohammadi M¹, Ramezani Binabaj M¹, Mirjalili M¹, Gaedniaye Jahromi M¹, Jafari M², Salem F²

¹Department of Physiology and Biophysics, & ²Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran

e-mail: Mohammadi.mohammadt@yahoo.com

Received: 30/10/2012 Accepted: 06/01/2013

Abstract

Introduction: Previous studies have shown that atorvastatin inhibits oxidative stress in different tissues of body during certain pathological conditions. The aim of this study was to examine the effects of atorvastatin treatment as an antioxidant to prevent pancreatic oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Materials and Method:** The experiment was performed in four groups of rats (n=5 each) normal, normal treated, diabetic and diabetic treated, who were made diabetic by intravenous injection of streptozotocin (40 mg/kg). After 30 days of treatment, pancreas tissue was removed under deep anesthesia. After tissue homogenization, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, as well as glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels were determined by biochemical methods. **Results:** In addition to increased blood glucose levels in diabetic rats (78%), enzymes activities of SOD and CAT were significantly increased, compared to the normal rats. Also, induction of diabetes significantly decreased the GSH content of pancreas by 40%, and increased MDA level by 53%. Finally treatment with atorvastatin significantly increased the content of GSH and prevented augmentation of SOD activity. **Conclusion:** Based on findings of this study, diabetic-induced hyperglycemia provokes the production of pancreas free radicals that lead to oxidative stress. Also, treatment with atorvastatin may prevent hyperglycemia-induced oxidative stress in the pancreas tissue of these animals.

Keywords: Atorvastatin, Hyperglycemia, Oxidative stress, Streptozotocin, Superoxide dismutase, Catalase, Glutathione