

## Effect of Troxerutin on Oxidative Stress Induced by Myocardial Ischemia / Reperfusion in Diabetic Rats

**Hatam Ahmadi**<sup>1</sup>, **Homiera Hatami Nemati**<sup>2</sup>, **Reza Badalzadeh**

1. Assistant Professor of animal physiology, Department of Basic Sciences, Farhangian University, Tehran, Iran, (Corresponding Author). Tel: 041-34422924, Email: hahmadi@cfu.ac.ir, ORCID ID: 0000-0001-5435-1920

2. Associate Professor of animal physiology, Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran, ORCID ID: 0000-0003-2940-2671

3. Associate Professor of physiology, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, ORCID ID: 0000-0002-0339-5904

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Diabetes is one of the major risk factors for ischemic heart disease. The aim of this study was to investigate the effect of antioxidant drug troxerutin (TXR) on ischemia-reperfusion-induced myocardial injury in experimental streptozotocin-induced diabetic rats.

**Materials and Methods:** Male Wistar rats (250-270 g) were divided into four groups including control, troxerutin, streptozotocin and streptozotocin + troxerutin groups. Diabetes was induced in the rats by intraperitoneal injection of 50 mg / kg streptozotocin and rats were studied for 10 weeks. Rats in the streptozotocin + troxerutin group received troxerutin by oral gavage for 4 weeks from the 7th week onwards. The hearts of the rats in all groups were placed in the Langendrov apparatus after separation from the body and subjected to local ischemia for 30 minutes followed by reperfusion for 60 minutes. The amount of lactate dehydrogenase enzyme in coronary artery as well as the parameters of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in myocardial tissue during ischemia-reperfusion were measured using special kits.

**Results:** Body weight and the amount of superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes were significantly decreased in the diabetic rats ( $P < 0.05$ ). Troxerutin in the streptozotocin + troxerutin group improved the levels of these enzymes to normal levels ( $P < 0.05$ ), whereas lactate dehydrogenase level decreased in this group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** In this study troxerutin reduced the severity of ischemia-reperfusion injury in the diabetic rats.

**Keywords:** Troxerutin, Streptozotocin, Oxidative stress, Ischemia-reperfusion

**Received:** Feb 16, 2020

**Accepted:** Jan 14, 2021

**How to cite the article:** Hatam Ahmadi, Homiera Hatami Nemati, Reza Badalzadeh. Effect of Troxerutin on Oxidative Stress Induced by Myocardial Ischemia / Reperfusion in Diabetic Rats. SJKU 2021;26(7):11-22.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

## تأثیر تر و گزروتین بر استرس اکسیداتیو ناشی از ایسکمی - خونرسانی مجدد میوکارد در موشهای صحرایی دیابتی

حاجم احمدی<sup>۱</sup>، حمیرا حانمی نعمتی<sup>۲</sup>، رضا بدل زاده<sup>۳</sup>

۱. استادیار فیزیولوژی جانوری، گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران، تلفن ثابت: ۰۴۱-۳۴۴۲۲۹۲۴، پست الکترونیک: hahmadi@cfu.ac.ir، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۵۴۳۵-۱۹۲۰

۲. دانشی‌ار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۲۹۴۰-۲۶۷۱

۳. دانشیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۰۳۳۹-۵۹۰۴

### چکیده

**زمینه و هدف:** دیابت یکی از عوامل اصلی افزایش ریسک بیماری ایسکمی قلب است. هدف از این مطالعه بررسی اثر داروی تر و گزروتین با خاصیت آنتی اکسیدانی بر آسیب ناشی از ایسکمی - خونرسانی مجدد میوکارد در موش صحرایی دیابتی تجربی ناشی از تزریق استرپتوزتوسین است.

**مواد و روش‌ها:** موشهای نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۷۰ گرم) به ۴ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه تر و گزروتین، گروه استرپتوزتوسین و گروه استرپتوزتوسین + تر و گزروتین. دیابت در رت‌ها با تزریق داخل صفاقی دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزتوسین القاء شد و رت‌ها به مدت ۱۰ هفته مورد مطالعه قرار گرفتند. موشهای گروه استرپتوزتوسین + تر و گزروتین از هفته هفتم به بعد، داروی تر و گزروتین را به صورت گاوآژ خوراکی به مدت ۴ هفته دریافت کردند. قلب رت‌های تمامی گروه‌ها بعد از جدا شدن از بدن، در دستگاه لانگندروف قرار داده شد و بعد از اعمال ایسکمی به مدت ۳۰ دقیقه، بلافاصله به مدت ۶۰ دقیقه جریان خون مجدد برقرار شد. مقدار آنزیم لاکتات دهیدروژناز در جریان خون کرونری و نیز پارامترهای سوپراکسید دسموتاز و گلوکوتایون پراکسیداز در بافت میوکارد تحت ایسکمی - رپرفیوژن با استفاده از کیت‌های ویژه اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** وزن بدن و مقدار آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز و گلوکوتایون پراکسیداز در موشهای دیابتی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری پیدا کرد ( $P < 0.05$ ). تر و گزروتین در گروه استرپتوزتوسین + تر و گزروتین، موجب بهبودی مقدار این آنزیم‌ها به مقادیر طبیعی شد ( $P < 0.05$ )، در صورتیکه مقدار لاکتات دهیدروژناز در این گروه کاهش یافت ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که تر و گزروتین شدت آسیب ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن جریان خون میوکارد موشهای صحرایی دیابتی را کاهش می‌دهد.

**کلمات کلیدی:** تر و گزروتین، استرپتوزتوسین، استرس اکسیداتیو، ایسکمی - رپرفیوژن

وصول مقاله: ۹۸/۱۱/۲۷ اصلاحیه نهایی: ۹۹/۱۰/۲ پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۵



بیماریهای قلبی و سکنه مغزی است (۱۰). همچنین گزارش شده که ۲۵ تا ۵۰ درصد مرگ و میرها در بیماران مبتلا به AMI در افرادی بوده که هم زمان مبتلا به هیپرگلیسمی هم بوده اند (۱۱). دیابت و هیپرگلیسمی باعث التهاب سیستمیک، اختلال عملکرد اندوتلیال و تشدید ایجاد لخته خون می شود (۱۰). در بیماران دیابتی، پاسخ التهابی به ایسکمی - رپرفیوژن به دلیل نقش تحریک کننده دیابت در تجمع لکوسیت ها و فعال سازی چسبندگی مولکولها و سیتوکین ها تشدید می شود (۱۲).

استرپتوزوتوسین (Streptozotocin, STZ) به عنوان یک آنتی بیوتیک، دارویی شناخته شده است که با نکروز و تخریب سلول های بتای پانکراس، به منظور القاء دیابت نوع ۱ در حیوانات آزمایشگاهی استفاده فراوان دارد (۱۲ و ۱۱). استرپتوزوتوسین از طریق ناقل گلوکز ۲ وارد سلول های بتای پانکراس شده و با ایجاد رادیکال های آزاد، موجب تکه تکه شدن DNA این سلول ها و در نتیجه کاهش انسولین و افزایش قند خون می شود (۱۵).

تروگزروتین (Troloxerutin, TXR) معروف به ویتامین P4، فلاونوئیدی طبیعی است که در چای، قهوه، دانه های غلات و انواع میوه ها و سبزیجات وجود دارد (۱۶) و دارای اعمال مهم آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و نیز فعالیت ضد توموری و ضد آپوپتوزی است (۱۷). همچنین تروگزروتین در بهبود عملکرد مویرگی و کاهش شکنندگی دیواره مویرگی نقش دارد (۱۸). گزارش شده که تزریق داخل صفاقی تروگزروتین موجب کاهش آسیب مغزی ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن می شود (۴). تروگزروتین در برابر آسیب مجدد جریان خون میوکارد دیابتی اثر محافظتی دارد (۱۹). با توجه به اهمیت موضوع، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر تروگزروتین بر آسیب ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن جریان خون در قلب جدا شده موشهای صحرایی دیابتی انجام شد.

## مواد و روش ها

از نظر بالینی، ایسکمی قلبی یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان به حساب می آید. راهکارهای درمانی برای محافظت از ایسکمی میوکارد به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. طی سه دهه گذشته، درمان با خون رسانی مجدد (رپرفیوژن) عروق کرونر در درمان و مدیریت انفارکتوس حاد میوکارد (Acute Myocardial Infarction, AMI) رایج شده است (۱). با وجود اینکه رپرفیوژن خون به عنوان راهکاری مفید برای درمان و بهبود وضعیت سندرم حاد عروق کرونر، به خصوص انفارکتوس حاد میوکارد در نظر گرفته شده است؛ اما رپرفیوژن خون به عنوان شمشیری دو لبه معرفی شده است؛ زیرا ممکن است طیفی از آسیب های ناشی از رپرفیوژن خون منجر به تشدید و مضاعف شدن آسیب ناشی از ایسکمی شود (۲۲، ۳). ایسکمی مغزی و بدنال آن رپرفیوژن جریان خون، شرایطی پاتولوژیک در سیستم عصبی است که معمولاً باعث هیپوکسی مغزی، انفارکتوس یا سکنه مغزی می شود (۴). آسیب ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن جریان خون ممکن است به انفارکتوس میوکارد، آریتمی قلبی و اختلال در انقباض منجر شود (۵). برخی از عوامل مانند استرس اکسیداتیو، اتوفاژی، افزایش کلسیم خارج سلولی، التهاب و اختلال عملکرد میتوکندری در روند پاتولوژیک ناشی از آسیب ایسکمی - رپرفیوژن میوکارد نقش دارند (۳). استرس اکسیداتیو یکی از مهم ترین اختلالات ناشی از آسیب رپرفیوژن است که عمدتاً ناشی از تشکیل رادیکال های آزاد اکسیژن است (۶). همچنین ایسکمی - رپرفیوژن می تواند با افزایش تولید رادیکال های آزاد، موجب القاء پراکسیداسیون لیپیدی و مرگ سلولی شود (۷)؛ بنابراین داروهایی که پروسه های پاتولوژیک را هدف قرار دهند، می توانند در صدمات ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن مؤثر باشند. برخی مطالعات نشان داده که هیپرگلیسمی در بیماران دیابتی می تواند موجب تشدید وخامت سندرم حاد عروق کرونر شود (۸ و ۹). ۶۵٪ از مرگ و میر در افراد مبتلا به دیابت ناشی از

حیوانات و داروهای مورد استفاده:

موشهای صحرایی نر با محدوده وزن بدنی ۲۷۰-۲۵۰ گرم، در اتاق حیوانات با دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتیگراد و تنظیم نور با دوره‌ی تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته (روشنایی از ساعت ۷ صبح) نگهداری می‌شدند. هنگام کار با رت‌ها موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد (کد تصویب ۲۲۵۲۹۵۴). علت انتخاب موش‌های نر، ساده‌تر بودن سیستم هورمونی و نیز تداخل کمتر هورمون‌های جنسی با داروها بود. ایجاد نکرور سلول‌های بتای پانکراس و القاء دیابت توسط استرپتوزوتوسین در حیوانات آزمایشگاهی، به دو روش تجویز دوز پایین دارو در چند مرحله و یا استفاده از تک دوز بالای این دارو ایجاد می‌شود (۲۰). در این مطالعه، موشهای صحرایی نر با تزریق داخل صفاقی تک دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین، طی ۴۸ ساعت به دیابت نوع ۱ مبتلا می‌شدند (۱۴). ۷۲ ساعت بعد از القای دیابت، نمونه‌گیری خون با خراش مختصر به دم رت‌ها به منظور اندازه‌گیری میزان قند خون با استفاده از دستگاه گلوکومتر (Boehringer Mannheim Indianapolis, IN) صورت می‌گرفت. حیوانات با سطح قند خون بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم در روز به عنوان رت دیابتی در نظر گرفته شدند (۲۱). رت‌هایی که با وجود تزریق استرپتوزوتوسین، دیابت ایجاد نشده نبود از گروه خارج و با رت دیابتی جایگزین می‌شدند. زمان مطالعه بر روی گروههای آزمایشی ۱۰ هفته بود. پس از ۶ هفته، گروههای درمانی دریافت‌کننده تروگزروتین (۹۸٫۷۶٪ Baoji Fangsheng، چین)، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در آب مقطر در روز از این دارو را به مدت ۴ هفته با لوله گاوآژ به موازات کام رت دریافت کردند. دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی تروگزروتین بر پایه مطالعات دیگر محققین انتخاب شد (۲۲ و ۱۶).

گروهبندی

رت‌های نر به طور تصادفی به ۴ گروه ۷ تایی تقسیم و به مدت ۱۰ هفته مورد بررسی قرار گرفتند: ۱- گروه کنترل

که هیچ دارویی دریافت نکردند. ۲- گروه تروگزروتین که به مدت ۴ هفته قبل از جراحی، دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز داروی تروگزروتین را از طریق گاوآژ دریافت کردند. ۳- گروه دیابتی که ۱۰ هفته قبل از جراحی با تزریق داخل صفاقی تک دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین دیابتی شده بودند. ۴- گروه دیابتی+ تروگزروتین که ۱۰ هفته قبل از جراحی با تزریق استرپتوزوتوسین داخل صفاقی تک دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین دیابتی شده بودند و از هفته هفتم به بعد، دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز تروگزروتین را به مدت ۴ هفته از طریق گاوآژ دریافت کردند.

پس از ۱۰ هفته، همه رت‌ها بعد از تزریق داخل صفاقی ۵۰۰ واحد در میلی‌لیتر هپارین، با تزریق داخل صفاقی ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم زایلازین بیهوش شدند. قلب حیوانات پس از باز کردن قفسه سینه، به سرعت خارج و در دستگاه قلب ایزوله لانگندروف منتقل شد. شریانهای کرونر قلب جانور در شرایط فشار ثابت ۷۵-۸۰ میلی‌مترجیوه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد توسط محلول پرفیوژن کربس-هنسلیت (محلولی با غلظت یون‌های مشابه یون‌های موجود در پلاسما مشروب می‌شد که به قلب ایزوله لانگندروف مشهور است) (۲۴ و ۲۳). به منظور ایجاد ایسکمی و انفارکتوس میوکارد، شریان کرونری نزولی قدامی چپ (Left Anterior Descending, LAD) قلب رت‌های تمامی گروهها، به مدت ۳۰ دقیقه از ابتدای آن توسط نخ سیلک ۰/۴ بسته می‌شد. سپس با باز کردن نخ به مدت ۶۰ دقیقه، قلب ایزوله تحت رپرفیوژن قرار می‌گرفت. در ادامه، بخشی از عضله بطنی که تحت ایسکمی و رپرفیوژن قرار گرفته بود، جدا و به منظور بررسی پارامترهای آسیب میوکارد قلبی در دمای ۸۰- نگهداری می‌شد. کاهش فعالیت قلب ایزوله بر روی دستگاه و نیز سقوط فوری در جریان خون کرونری بعنوان شاخص انسداد مؤثر عروق کرونر در نظر گرفته می‌شود.

مطالعات بیوشیمیایی:

گلوکز خون (طرف چپ شکل ۲،  $P > 0.05$ ) رت‌های دریافت کننده این دارو نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد. همچنین اعمال تروگزروتین تغییری معنی‌دار در مقدار LDH جریان خون کرونری قلب ایزوله (طرف چپ شکل ۳،  $P > 0.05$ ) و نیز مقدار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD - (طرف چپ شکل ۴،  $P > 0.05$ ) و GPx (طرف چپ شکل ۵،  $P > 0.05$ ) در میوکارد قلب ایجاد نکرد. نتایج تحقیق نشان داد که تجویز دوز بکاررفته تروگزروتین به تنهایی اثری پیشگیرانه بر پارامترهای مرتبط با آسیب‌های سلولی و بافتی بیماران با ریسک بالای ایسکمی-جریان خون کرونری ندارد.

همچنین نتایج تحقیق نشان دارد که اعمال داخل صفاقی تک دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزتوسین ۱۰ هفته قبل از جراحی و القاء ایسکمی-رپرفیوژن ناحیه‌ای در قلب ایزوله، موجب کاهش معنی‌دار وزن بدن موشهای صحرائی نسبت به گروه کنترل شده (وسط شکل ۱،  $P < 0.05$ ) و با افزایش قند خون این گروه از رت‌ها در مقایسه با گروه کنترل باعث دیابتی کردن آنها می‌شود (وسط شکل ۲،  $P < 0.05$ ). همچنین تجویز داخل صفاقی استرپتوزتوسین موجب کاهش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD (وسط شکل ۴،  $P < 0.05$ )، بافت میوکارد تحت ایسکمی-رپرفیوژن نسبت به گروه کنترل شد، در صورتیکه تغییری در میزان آنزیم LDH ایجاد نکرد (وسط شکل ۳،  $P > 0.05$ ). نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز دوز بکاررفته استرپتوزتوسین در موشهای صحرائی با کاهش وزن و نیز دیابتی کردن آنها موجب تشدید آسیب‌های بافتی و سلولی ناشی از ایسکمی-رپرفیوژن می‌شود که به صورت افزایش پارامترهای استرس اکسیداتیو دیده می‌شود.

بررسی تداخل اثر داروها نشان داد که تزریق داخل صفاقی دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تروگزروتین به مدت ۴ هفته قبل از جراحی در گروه موشهای صحرائی دریافت کننده تروگزروتین + استرپتوزتوسین، موجب کاهش وزن بدن

۱۰ دقیقه بعد از رپرفیوژن، جریان خون کرونری برای اندازه‌گیری آنزیم لاکتات دهیدروژناز (Lactate Dehydrogenase, LDH) نمونه‌برداری شد. غلظت LDH بر حسب واحد در لیتر در جریان کرونری با استفاده از کیت مربوطه (پارس آزمون، ایران) اندازه‌گیری و به عنوان شاخصی از آسیب سلولی در نظر شد. برای اندازه‌گیری سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تقریباً ۰/۵ گرم از بافت بطنی تحت آسیب ایسکمی-رپرفیوژن برداشته و هموژنیزه می‌شد. بافت هموژنیزه در دمای ۴ درجه سانتیگراد در دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی از بافت هموژنیزه شده خارج و به سرعت در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای تعیین سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری می‌شد (۲۵). میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (Super Oxide Dismutase, SOD) با استفاده از کیت تجاری مدل Delmas-Bevviex و آنزیم گلووتاتیون پراکسیداز (Glutathione Peroxidase, GPx) با استفاده از روش پاکلیا و والننتین (Paglia and Valentin) تعیین می‌شد (۲۶).

آنالیز آماری:

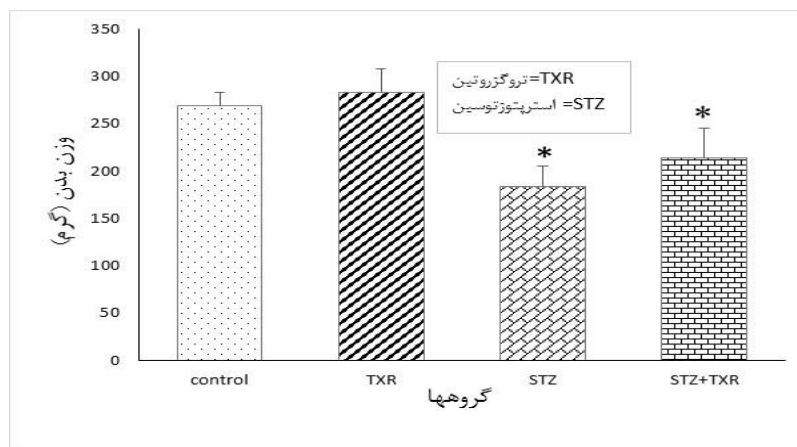
سنجش مقدار LDH و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی GPx و SOD در بین گروه‌های مختلف به کمک آزمون ANOVA یک طرفه با استفاده از نرم افزار SPSS-16 استفاده می‌شد. بعد از معنی‌دار بودن تفاوتها، برای مقایسه تفاوت گروه‌های آزمایشی از آزمون post hoc Tukey استفاده می‌شد. مقدار معنی‌دار  $P < 0.05$  برای معنی‌دار بودن تفاوت گروه‌ها در نظر گرفته شد. نمودارها از طریق نرم افزار Excel ۲۰۱۰ رسم گردید.

### یافته‌ها

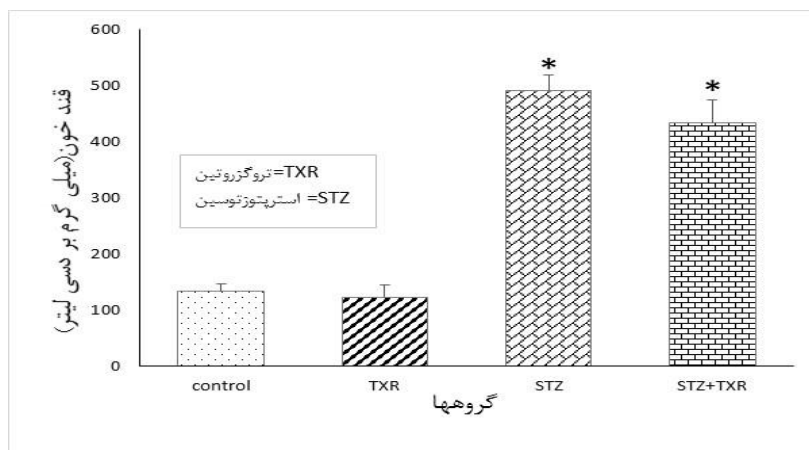
تحلیل واریانس یک طرفه و post hoc Tukey نشان داد که تزریق درون صفاقی دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تروگزروتین، ۴ هفته قبل از جراحی، تغییری معنی‌دار در پارامترهای وزن بدن (طرف چپ شکل ۱،  $P > 0.05$ ) و

( $P < 0.05$ ). نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز تروگزروتین، اگرچه قادر به بهبودی و تعدیل میزان آنزیمهای آنتی اکسیدانی و نیز آنزیم LDH در گروه تروگزروتین + استرپتوزتوسین نسبت به گروه رتھای دیابتی می شود؛ اما احتمالاً به دلیل دیگر آسیب های سلولی و بافتی ناشی از تجویز استرپتوزتوسین، قادر به بهبودی وزن و مقدار قند خون موشهای صحرایی این گروه نشد.

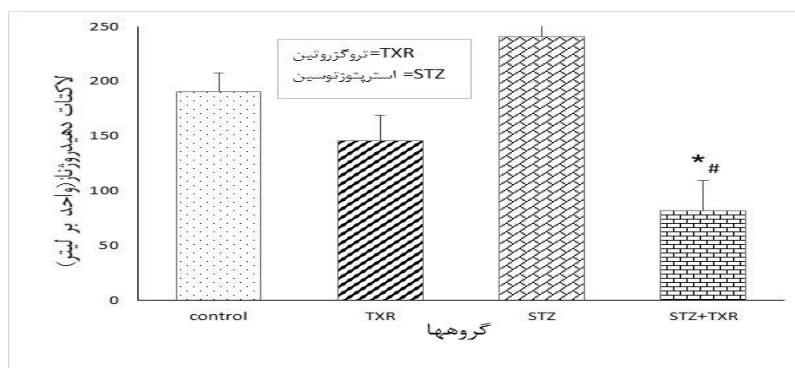
(طرف راست شکل ۱،  $P < 0.05$ ) و افزایش قند خون آن ها نسبت به گروه کنترل شد (طرف راست شکل ۲،  $P < 0.05$ ). همچنین مقدار آنزیمهای آنتی اکسیدانی SOD (طرف راست شکل ۴،  $P < 0.05$ ) و GPx (طرف راست شکل ۵،  $P < 0.05$ ) بافت میوکارڈ تحت ایسکمی - رپرفیوژن در گروه رتھای تروگزروتین + استرپتوزتوسین نسبت به گروه رتھای دیابتی افزایش و مقدار LDH آن ها نسبت به گروه دریافت کننده استرپتوزتوسین کاهش یافت (طرف راست شکل ۳،



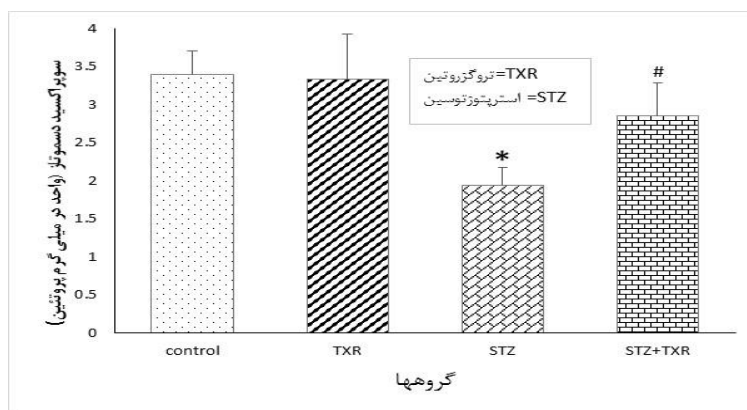
شکل ۱: تأثیر استرپتوزتوسین، تروگزروتین و برهم کنش اثر آنها بر وزن بدن موشهای صحرایی. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شده اند (علامت \* بیانگر  $P < 0.05$  نسبت به گروه کنترل است).



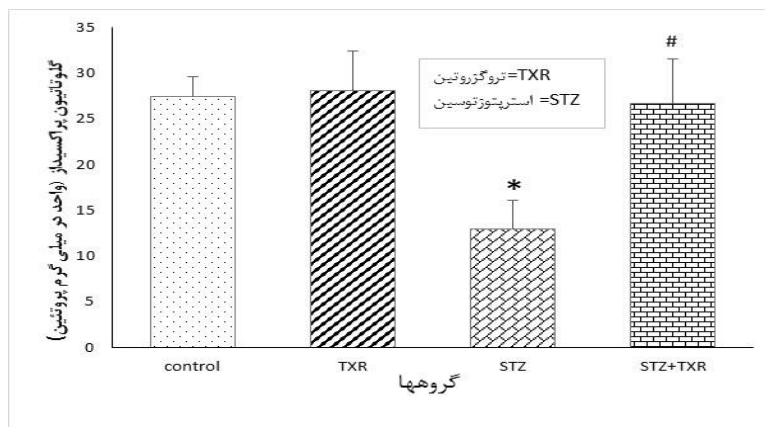
شکل ۲: تأثیر استرپتوزتوسین، تروگزروتین و برهم کنش اثر آنها بر مقدار قند خون موشهای صحرایی. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شده اند (علامت \* بیانگر  $P < 0.05$  نسبت به گروه کنترل است).



شکل ۳: تأثیر استرپتوزتوسین، تر وگزروتین و برهم کنش اثر آن‌ها بر مقدار LDH جریان خون کرونری قلب تحت ایسکمی - رپرفیوژن. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شده‌اند (علامت \* بیانگر  $P < 0.05$  نسبت به گروه کنترل و # بیانگر  $P < 0.05$  نسبت به گروه دریافت کننده استرپتوزتوسین است).



شکل ۴: تأثیر استرپتوزتوسین، تر وگزروتین و برهم کنش اثر آنها بر مقدار آنزیم SOD بافت میوکارد تحت ایسکمی - رپرفیوژن. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شده‌اند (علامت \* بیانگر  $P < 0.05$  نسبت به گروه کنترل و # بیانگر  $P < 0.05$  نسبت به گروه دریافت کننده استرپتوزتوسین است).



شکل ۵: تأثیر استرپتوزتوسین، تر وگزروتین و برهم کنش اثر آنها بر مقدار آنزیم GPX بافت میوکارد تحت ایسکمی - رپرفیوژن. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شده‌اند (علامت \* بیانگر  $P < 0.05$  نسبت به گروه کنترل و # بیانگر  $P < 0.05$  نسبت به گروه دریافت کننده استرپتوزتوسین است).

## بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق درون صفاقی دوز بکار رفته استرپتوزتوسین، با القاء دیابت نوع ۱ در موشهای صحرایی نر موجب کاهش وزن بدن، افزایش قند خون و نیز کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی SOD و GPx شده و در نتیجه در تشدید اثرات ناشی از آسیب ایسکمی مقطعی و برقراری مجدد جریان خون در میوکارد قلب مؤثر است. تجویز خوراکی تروگزروتین به تنهایی اثری پیشگیرانه بر پارامترهای مرتبط با آسیب های ناشی از ایسکمی-رپرفیوژن جریان خون کرونری ندارد. مطالعه بر روی برهم کنش داروها در این تحقیق نشان داد که تروگزروتین دارای اثرات محافظتی در آسیب میوکارد ناشی از ایسکمی مقطعی-رپرفیوژن در قلب جدا شده از موش صحرایی دیابتی است. تجویز تروگزروتین باعث کاهش سطح لاکتات دهیدروژناز، به عنوان شاخصی از آسیب سلولی و با افزایش میزان آنزیم های آنتی اکسیدانی SOD و GPx، باعث بهبودی شاخص های استرس اکسیداتیو در موشهای صحرایی دیابتی می شود.

تزریق تک دوز ۵۰ mg/kg استرپتوزتوسین با تخریب سلولهای بتای پانکراس، می تواند دیابت نوع یک مزمن ایجاد کند. دیابت به مدت کمتر از ۴ هفته به عنوان مدل تجربی دیابت حاد و بیش از ۴ هفته به عنوان مدل دیابت مزمن در نظر گرفته شده است (۵). نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق داخل صفاقی تک دوز ۵۰ میلی گرم برکیلوگرم استرپتوزتوسین موجب کاهش وزن بدن و افزایش قند خون در رتها می شود. نتایج این تحقیق با نتایج مطالعات قبلی همخوانی دارد. گزارش شده که مصرف دوز پایین استرپتوزتوسین موجب افزایش قابل توجهی در سطح گلوکز خون می شود (۲۷). همچنین اعمال استرپتوزتوسین در این مطالعه باعث کاهش میزان آنزیم های آنتی اکسیدانی SOD و GPx در قلب ایزوله تحت ایسکمی-رپرفیوژن موش های صحرایی می شود. مرگ و میر ناشی از انفارکتوس حاد میوکارد در بیماران دیابتی در مقایسه با افراد غیر دیابتی

تقریباً دو برابر است (۲۸). پاتوژنز کاردیومیوپاتی دیابتی (Dilated Cardio Myopathy, DCM) پیچیده است و افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از اختلال در متابولیسم گلوکز ممکن است یکی از کلیدهای اصلی DCM باشد (۲۹). علائم کاردیومیوپاتی، بیماری عروق کرونری و هیپرتانسیون در بیماران دیابتی مقاوم به انسولین بیشتر گزارش شده است (۳۰). افزایش مقدار گونه های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) در بیماران دیابتی ممکن است با تجمع کلاژن بین سلول های میوسیتی، اثری مخرب بر لیسیدهای غشایی و تخریب فیبروتیک کاردیومیوسیتی داشته باشد (۳۱) و نیز موجب بروز پاسخ التهابی شود (۳۲). افزایش قند خون ممکن است سطح ROS را در میوسیت های قلبی افزایش دهد و مقدار زیاد ROS باعث القاء استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی، منجر به تولید میوکاردیوپاتی دیابتی سیتوتوکسیک می شود (۳۳). آسیب ایسکمی میوکارد در موشهای صحرایی دیابتی به مدت ۱۰ هفته در مطالعه حاضر با مطالعات قبلی همخوانی دارد. طول مدت دیابت کمتر از ۲ هفته، حساسیت قلب به آسیب ایسکمیک را کاهش می دهد، در صورتی که افزایش مدت دیابت به بیش از ۴ هفته باعث افزایش حساسیت و در نتیجه آسیب پذیری به ایسکمی-رپرفیوژن می شود (۳۴).

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم تروگزروتین در روز با لوله گاوآژ به مدت ۴ هفته قبل از جراحی، بر هیچکدام از پارامترهای وزن بدن، قند خون و نیز پارامترهای مرتبط با آسیب سلولی و بافتی در قلب ایزوله تحت ایسکمی-رپرفیوژن در موشهای صحرایی اثر معنی دار ندارد. نتایج حاصل از تزریق تروگزروتین بر قند خون در این مطالعه با نتایج برخی از مطالعات قبلی همخوانی دارد. گزارش شده در رت های مبتلا به رتینوپاتی، تزریق درون صفاقی تروگزروتین تأثیری معنی دار روی قند خون و وزن بدن ندارد (۱۳). همچنین در تناقض با یافته های این تحقیق، گزارش شده که اعمال تروگزروتین به مدت

ميوكار، تروگروتين از طريق مسير PI3K / Akt و با كاهش فعاليت GSK-3 $\beta$  و متعاقباً كاهش آپوپتوز، در برابر آسيب مجدد جريان خون ميوكار ديابتي اثر محافظتي دارد. (۱۹).

### نتيجه گيري

بر پايه نتايج حاصل از اين پژوهش مي توان چنين بيان داشت كه ديابت مزمن القايي ناشي از تزريق داخل صفاقي استرپتوزتوسين در موشهاي صحرايي، ضمن اثرات نامناسب بر وزن بدن و قند خون جانور، مي تواند با كاهش فعاليت آنزيمهاي آنتي اكسيداني و بروز استرس اكسيداتيوي، در تشديد آسيب ميوكار قلب تحت ايسكمي-رپرفيوژن نقش داشته باشد. فعال سازي سيستم آنتي اكسيداني ميوكار و پيشگيري از استرس اكسيداتيوي نقش مهمي در اين مطالعه داشت. نتايج اين مطالعه نشان داد كه تجويز تروگروتين، با كاهش پارامترهاي استرس اكسيداتيوي (بهبود فعاليت آنزيم-هاي آنتي اكسيداني SOD و GPX) در رتھاي ديابتي القاء شده از مصرف تجويز استرپتوزتوسين، مي تواند به عنوان داروي احتمالي در پيشگيري و درمان آسيب هاي ناشي از ايسكمي - رپرفيوژن جريان خون در افراد ديابتي مورد مطالعات بيشتر قرار گيرد.

### تشكر و قدرداني

بدنيوسيله از معاونت محترم پژوهشي دانشگاه تبريز بابت حمايت مالي و تأمين اعتبار جهت انجام طرح پايان نامه (با كد تصويب شده ۲۲۵۲۹۵۴) قدرداني مي گردد. هيچگونه تعارض منافع توسط نويسندگان براي انتشار اين مقاله وجود ندارد.

۲۰ هفته در موش هاي داراي رژيم غذايي با كلسترول بالا، موجب كاهش سطح گلوکز خون مي شود (۳۵). تفاوت مدت زمان تجويز تروگروتين در تحقيق حاضر (۴ هفته) با مطالعه قبلي (۲۰ هفته)، ممكن است از دلايل عدم همخواني نتايج اين مطالعه با نتايج مطالعه قبلي باشد. دوز بكار رفته تروگروتين به صورت درون صفاقي، در مطالعه حاضر تأثيري بر سلولهاي بتاي پانكراس نداشته است. از ديگر نتايج اين مطالعه در مورد تداخل اثر تروگروتين و استرپتوزتوسين نشان داد كه تزريق داخل صفاقي تروگروتين مي تواند با بهبود وزن بدن و افزايش فعاليت آنزيمهاي آنتي اكسيداني SOD و GPX و نيز با كاهش انتشار لاکتات دهيدروژناز، شدت آسيب ديدگي ناشي از ايسكمي-رپرفيوژن ميوكار در موشهاي صحرايي ديابتي را كاهش دهد. برهم كنش تروگروتين با داروهاي ديگر در مطالعات قبلي مورد بررسي صورت گرفته است. تجويز تروگروتين در حيوانات تيمار شده با D-Galactose به طور معني داري فعاليت آنتي اكسيداني SOD، CAT و GPX را در مقايسه با D-gal تنها افزايش داد (۲۲). برهم-كنش اثر استرپتوزتوسين و برخي از داروهاي با ويژگي هاي آنتي اكسيداني در مطالعات ديگر بررسي شده است. درمان با كوركومين يا آنالوگهاي آن مي تواند برخي از نارساييهاي قلبي ناشي از ديابت ناشي از استرپتوزتوسين، از جمله متابوليسم گلوکز، استرس اكسيداتيوي و فيروز ميوكار را بهبود ببخشد (۳۶۳۷). همچنين تداخل اثر استرپتوزتوسين و تروگروتين در ديگر اندامهاي بدن بررسي شده است. نتايج مطالعه بر روي رتھاي دچار رتينوپاتي بيانگر آن است كه اعمال آنتي اكسيدان قوي مانند تروگروتين در مراحل اوليه رتينوپاتي ناشي از تزريق استرپتوزتوسين مفيد است (۱۳). همچنين تروگروتين داراي اثرات آنتي آريتمي در قلب رتھاي ديابتي است (۳۶). تأثير محافظتي تروگروتين ممكن است به فعاليت آنتي اكسيداني اين بيوفلاونويد در پاكسازي و مهار توليد زياد راديكالهاي آزاد و نيز فعاليت ضد التهابي آن مرتبط باشد (۳۷). در زمينه آسيب ايسكمي-رپرفيوژن

## منابع

1. Moensa A.L, Claeysa M.J, Timmermansb J.P, Vrintsa C.J. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process . *Int J Cardiol.* 2005; 100: 179 – 190.
2. Lansberg MG, Bluhmki E, Thijs VN. Efficacy and safety of tissue plasminogen activator 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke: a meta-analysis. *Stroke.* 2009; 40:2438–2441.
3. Yellon DM, Baxter GF. Protecting the ischemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality? *Heart.* 2000;83(4):381 –7.
4. Sui R, Zang L, Bai Y. Administration of troxerutin and cerebroprotein hydrolysate injection alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by down-regulating caspase molecules. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2019; 15:2345-2352.
5. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter G. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev.* 2007;59: 418-458.
6. Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am. J. med.* 2000;109(4): 315-323.
7. Fan W, Philip S, Granowitz C, Toth PP, Wong ND. Residual Hypertriglyceridemia and Estimated Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk by Statin Use in U.S. Adults With Diabetes: National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2014. *Diabetes Care.* 2019;42(12):2307-2314.
8. Ding XS, Wu SS, Chen H, Zhao XQ, Li HW. High admission glucose levels predict worse short-term clinical outcome in non-diabetic patients with acute myocardial infarction: a retrospective observational study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2019;19(1):163-174.
9. Arnold SV, Lipska KJ, Li Y, Mcguire DK, Goyal A. Prevalence of glucose abnormalities among patients presenting with an acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 2014;168(4):466–470.
10. Yumei Ye, Perez-Polo JR, Aguilar D, Birnbaum Y. The potential effects of anti-diabetic medications on myocardial ischemia–reperfusion injury. *Basic Res Cardio.* 2011;106:925–952.
11. Mansour AA, Wanoose HL. Acute phase hyperglycemia among patients hospitalized with acute coronary syndrome: prevalence and prognostic significance. *Am J Cardiol.* 2014;114(12):1789–1793.
12. Badalzadeh R, Azimi A, Alihemmati A, Yousefi B, Chronic Type-I diabetes could not impede the anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of combined postconditioning with ischemia and cyclosporine A in myocardial reperfusion injury. *J Physiol Biochem.* 2017;73(1): 111-120.

13. Chung HK, Choi SM, Kwak HH, Ahn BO, et al. Efficacy of troxerutin on streptozotocin-induced rat model in the early stage of diabetic retinopathy. *Arzneim Forsch Drug Res.* 2005; 55(10): 573-580.
14. Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr protoc Pharmacol.* 2015;5(47):1-20.
15. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB, et al., STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes.* 1994;43(11): 1326-1333.
16. Liliang Shu, Zhang W, Huang C, Huang G, Su G. Troxerutin Protects Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Via Pi3k/Akt Pathway in Rats. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44:1939-1948.
17. Zhao H, Liu Y, Zeng J, Li D, Zhang W, Huang Y. Troxerutin and Cerebroprotein Hydrolysate Injection Protects Neurovascular Units from Oxygen-Glucose Deprivation and Reoxygenation-Induced Injury In Vitro. *Evid-Based Compl Altern Med.* 2018; 2: 98-108.
18. Maurya DK, Balakrishnan S, Salvi VP, Nair CK: Protection of cellular DNA from gamma-radiation-induced damages and enhancement in DNA repair by troxerutin. *Mol Cell Biochem.* 2005; 280:57-68.
19. Lu J, Wu DM, Hu B, Zheng YL, Zhang ZF, Wang YJ: NGF-Dependent activation of TrkA pathway: A mechanism for the neuroprotective effect of troxerutin in D-galactose-treated mice. *Brain Pathol.* 2010; 20:952-965.
20. Wu K.K, Huan Y. Diabetic atherosclerosis mouse models. *Atheroscl.* 2007; 191:241-249.
21. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007;357(11): 1121-1135.
22. Fan, S.-h., et al., Troxerutin protects the mouse kidney from d-galactose-caused injury through anti-inflammation and anti-oxidation. *Int Immunopharmacol.* 2009; 9(1): 91-96.
23. Feyzizadeh S, Badalzadeh R, Application of ischemic postconditioning's algorithms in tissues protection: response to methodological gaps in preclinical and clinical studies. *J Cell Mol Med.* 2017;21 (10): 2257–2267.
24. Hill A.J, et al., In vitro studies of human hearts. *Ann Thorac Surg.* 2005. 79(1): 168-177
25. Hummel SG, Fischer AJ, Martin SM, Schafer FQ, Buetner GR. Nitric oxide as a cellular antioxidant: a little goes a long way. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40:501–6.
26. Alam M.N, Bristi NJ, Rafiquzzaman M Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J.* 2013; 21(2):143-152
27. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 2005; 52:313-320.
28. Abbott R.D, Donahue RP, Kanne WBI, Wilson PWF, et al., The impact of diabetes on survival following myocardial infarction in men vs women. *J Am Med Inform Assoc.* 1988; 260(23): 3456-3460
29. Asrih M, Steffens S. Emerging role of epigenetics and miRNA in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol.* 2013;22(2):117–25.

30. Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol*. 2016; 12: 144-153.
31. Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Am Heart Assoc*. 2007; 115: 3213-3223.
32. Marzilli M, Huqi A. Cardioprotective therapy in reperfusion injury: lessons from the European Myocardial Infarction Project-Free Radicals (EMIP-FR). *Heart Metab*. 2010; 46 (1):35-37.
33. Xiang L, Zhang Q, Chi C, Wu G, Lin Z, Li J, et al. Curcumin analog A13 alleviates oxidative stress by activating Nrf2/ARE pathway and ameliorates fibrosis in the myocardium of high-fat-diet and streptozotocin-induced diabetic rats. *Xiang et al. Diabetol Metab Syndr*. 2020; 12:1
34. Galinanes, M. and A.G. Fowler, Role of clinical pathologies in myocardial injury following ischaemia and reperfusion. *Cardiol Res*. 2004; 61(3):512-521.
35. Lu, J., et al., Troxerutin protects against high cholesterol-induced cognitive deficits in mice. *Brain*. 2011; 134(3):783-797.
36. Najafia, M, Noroozi E, Javadic A, Badalzadeh R. Anti-arrhythmogenic and anti-inflammatory effects of troxerutin in ischemia/reperfusion injury of diabetic myocardium. *Biomed Pharmacother*. 2018;102: 385-391.
37. Badalzadeh R, Layeghzadeh N, Alihemmati A, Mohammadi M, Beneficial effect of troxerutin on diabetes-induced vascular damages in rat aorta: histopathological alterations and antioxidation mechanism. *Int J Clin Endocrinol Metab*. 2015;13 (2): 259-269.