

ارزیابی تغییرات شاخص‌های سرمی آسیب قلبی در موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان

یعقوب حاجی صادقی^{۱*}، مجید فرتاش‌وند^۲

۱- عضو انجمن علمی دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: y.hajisadegi@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۵/۱۱/۲۷ پذیرش نهایی: ۹۶/۸/۱۷)

چکیده

دیابت ملیتوس اختلالی متابولیکی است که از شیوع بالایی در سراسر جهان برخوردار می‌باشد و افزایش سطح قند خون و در پی آن آسیب‌های جدی را در عروق و بافت‌های مختلف بدن سبب می‌گردد. هدف از این مطالعه ارزیابی تغییرات میزان شاخص‌های سرمی آسیب قلبی در موش‌های صحرایی دچار دیابت تجربی بود. بدین منظور تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر ویستار به طور تصادفی در ۲ گروه ۱۵ تایی شاهد سالم و تیمار دیابتی تقسیم شدند. دیابت ملیتوس تجربی نیز با تزریق داخل صفاقی تک دز آلوکسان (۱۲۰ mg/kg) ایجاد گردید. چهار هفته پس از القاء دیابت، شاخص‌های سرمی آسیب قلبی در موش‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری شد. متوسط قند خون گروه دیابتی $263/1 \pm 36$ mg/dl و گروه شاهد $96/7 \pm 12$ mg/dl بود که حاکی از وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین دو گروه بود ($p=0/000$). میزان سرمی cTnI (تروپونین I قلبی) در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت تجربی به طور معنی‌داری بیشتر از موش‌های صحرایی گروه شاهد بود ($p=0/002$). هم‌چنین فعالیت سرمی آنزیم‌های AST (آسپارات آمینوترانسفراز)، LDH (لاکتات دهیدروژناز) و CK-MB (کراتین کیناز قلبی- مغزی) در گروه دیابت تجربی در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بود. در این مطالعه از لحاظ ارتباط بین مقدار قند خون و میزان تروپونین I قلبی سرم ($r=0/685$, $p=0/010$) و نیز سطح فعالیت سرمی آنزیم‌ها شامل AST ($r=0/862$, $p=0/000$)، LDH ($r=0/760$, $p=0/008$) و CK-MB ($r=0/590$, $p=0/014$) همبستگی مستقیم و معنی‌دار برآورد گردید. در این مطالعه افزایش میزان cTnI سرم همراه با بالا رفتن میزان فعالیت آنزیم‌های سرمی شاخص قلب در موش‌های صحرایی دچار دیابت در مقایسه با گروه شاهد موید بروز درجاتی از آسیب عضله قلب است.

کلیدواژه‌ها: تروپونین قلبی، دیابت، آلوکسان، موش صحرایی.

مقدمه

بیماری دیابت یک اختلال مزمن در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی و پروتئین بوده و باعث افزایش سطح قند خون می‌شود که در پی آن آسیب‌های جدی را در اغلب سیستم‌های بدن ایجاد می‌کند و سبب بروز عوارض فوری یا دیررس بیماری می‌شود (Kesari et al., 2006). این بیماری عوارضی مثل عوارض قلبی-عروقی، کلیوی، عصبی، چشمی، جنسی و عفونت‌های هم‌زمان را به دنبال دارد (Heshmati et al., 2014). بیماران دیابتی در معرض خطر بروز گرفتگی شریان کرونر و مرگ ناشی از آن قرار دارند. دستورالعمل‌های اجرایی جدید توصیه می‌کنند که بیماری دیابت باید همانند بیماری عروق کرونر درمان شده و بیماران دیابتی باید بر این اساس مدیریت شوند (Al-Mallah et al., 2008). شواهدی وجود دارد که دیابت قندی می‌تواند منجر به بروز نارسایی احتقانی قلب حتی بدون بروز بیماری شریان کرونری یا پرفشاری خون گردد (Joseph et al., 2005). مطالعات تجربی نشان‌دهنده بروز آشفستگی در ظرفیت دیاستولی بطن چپ در سگ-های دچار دیابت می‌باشد (Fein et al., 1981). همچنین نکرز وسیع سلول‌های قلبی و جایگزینی فیبرهای انقباضی با بافت همبند در بیماران دیابتی مبتلا به نارسایی احتقانی قلب همانند مدل‌های حیوانی گزارش شده است (Kita et al., 1991; Rodrigues et al., 1995). علاوه بر این، تغییرات تحت‌سلولی در سلول‌های عضله قلبی ناشی از تغییرات کیفی در پروتئین‌های تنظیمی و انقباضی نشان داده شده است (Joseph et al., 2005).

هدف از این مطالعه، ارزیابی تغییرات سرمی تروپونین I قلبی (cTnI) که به عنوان یک شاخص اختصاصی برای شناسایی نکرز میوکارد محسوب می‌شود، به همراه سایر شاخص‌های سرمی هم‌چون کراتین کیناز قلبی-مغزی (CK-MB)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) در موش‌های صحرایی دچار دیابت تجربی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تیمار-شاهد تجربی مداخله‌ای بوده و در سال ۱۳۹۴ در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام شد. در این مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی بود.

برای انجام این تحقیق، تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی 20 ± 250 گرم، به طور تصادفی در ۲ گروه ۱۵ تایی شامل گروه‌های شاهد سالم و تیمار دیابتی توزیع شدند. شرایط تغذیه و نگه‌داری برای دو گروه یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای 21 ± 2 درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. جیره غذایی استاندارد پلیت شده و آب به‌طور آزاد در دسترس موش‌ها قرار گرفت. به‌منظور عادت کردن موش‌ها به شرایط محیط و نیز اطمینان از سلامت آنها، به مدت یک هفته بدون مداخله نگه‌داری شده و پس از آن دیابت تجربی در آنها ایجاد گردید. برای دیابتی کردن موش‌ها محلول تازه تهیه‌شده آلوکسان با دوز 120 mg/kg به‌صورت محلول در آب مقطر (۵ درصد)، بعد از ۱۵ ساعت پرهیز غذایی،

آزمون t مستقل، در سطح معنی‌داری $p < 0/05$ توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۹ مورد واکاوی قرار گرفت. همچنین به منظور تعیین ارتباط پارامترها با یکدیگر از آزمون همبستگی پیرسون استفاده گردید.

یافته‌ها

در تمامی موش‌های تحت مطالعه در گروه تیمار (دیابتی ناشی از آلوکسان) ۵ تا ۱۱ روز (متوسط $8/4 \pm 0/6$ روز) پس از تجویز آلوکسان با استفاده از نوار گلوکومتر، قند بالای 240 mg/dl ثبت شد و در گروه شاهد قند سرم در محدوده طبیعی قرار داشت. در پایان دوره آزمایش، متوسط قند خون گروه دیابتی $263/1 \pm 36 \text{ mg/dl}$ و گروه شاهد $96/7 \pm 12 \text{ mg/dl}$ بود که حاکی از وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین دو گروه بود ($p = 0/000$).

همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، میزان سرمی cTnI در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت تجربی بیشتر از موش‌های صحرایی سالم (گروه شاهد) بود که این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p = 0/002$). همچنین سایر شاخص‌های سرمی آسیب قلبی در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت تجربی در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بود.

به صورت داخل صفاقی به موش‌های گروه دیابتی تزریق شد (Lachin and Reza, 2012). به صورت دوره‌ای از موش‌ها از طریق سینوس پشت کره چشم خون‌گیری شده و گلوکز خون با استفاده از دستگاه گلوکومتر سنجیده می‌شد. موش‌های با قند خون بالای 240 mg/dl به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند (Gupta et al., 2005). در انتهای دوره نیز جهت اطمینان از سطح گلوکز خون، مجدداً قند خون با استفاده از کیت سنجش گلوکز اندازه‌گیری شد. پس از ۴ هفته از تمامی موش‌ها از طریق قطع دم خون‌گیری انجام شد. سرم نمونه‌های خون توسط سانتریفیوژ با سرعت 2500 دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 30 درجه سانتی‌گراد جدا شد و مقادیر شاخص‌های بیوشیمیایی آسیب قلبی در سرم شامل تروپونین I قلبی سرم با استفاده از روش الکتروکمی‌لومینسانس و با استفاده از روش مرسوم برای بیماران انسانی (LIASOIN®, DiaSorin, Italy) مورد آزمایش قرار گرفت. سایر آنزیم‌های قلبی شامل لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و کراتین کیناز قلبی - مغزی (CK-MB) با استفاده از کیت‌های اندازه‌گیری مختص خود (پارس آزمون، ایران) و دستگاه اسپکتروفوتومتر و روش رنگ‌سنجی سنجیده شدند.

- تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های به دست آمده کمی، به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ ارائه و اختلاف معنی‌دار بین دو گروه مبتلا به دیابت ملیتوس تجربی و سالم با استفاده از

جدول ۱- مقادیر سرمی cTnI، AST، CK-MB و LDH در موش‌های مبتلا به دیابت تجربی و شاهد ($\text{mean} \pm \text{SD}$)

LDH	CK-MB	AST	cTnI	
$1121/7 \pm 40$	$225/8 \pm 53$	$101/6 \pm 7$	$0/03 \pm 0/00$	گروه شاهد
$1459/3 \pm 66$	$590/4 \pm 91$	$233/2 \pm 24$	$1/69 \pm 0/28$	گروه دیابت تجربی
$0/012$	$0/000$	$0/009$	$0/002$	عدد p

بازه زمانی یک‌ساله معنی‌دار نبوده است (Mongeon *et al.*, 2013).

شواهدی از وجود ارتباط بین وقوع مرگ ناگهانی و دیابت ملیتوس وجود دارد (Vasiliadis *et al.*, 2014). به طوری که احتمال بروز انفارکتوس میوکارد در بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس ۳-۲ برابر افراد سالم است (Laakso, 2001). معمولاً تعدادی از شریان‌های کرونری درگیر شده و بروز انفارکتوس‌های مخفی و بدون علامت در بیماران دیابتی بیشتر است (Takeda, 2010). پرفشاری خون به عنوان یک عامل خطر ساز اضافی باعث تشدید بیماری ایسکمیک قلب می‌شود (Turner *et al.*, 1998). همچنین، دیابت ملیتوس به عنوان یک عامل خطر ساز در بروز فیبریلاسیون بطنی است که به نارسایی قلبی می‌انجامد و وقوع آن را ناشی از فیبروز، تغییرات غشای پایه مویرگ‌های میوکارد و وقوع آنوریسم‌های ریز می‌دانند (Vasiliadis *et al.*, 2014). در الکتروکاردیوگرام افراد دیابتی چندین مورد غیرطبیعی گزارش شده است که اغلب آنها به قطعه QT و موج T ارتباط دارد (Pourmoghaddas and Hekmatnia, 2003). طولانی شدن قطعه QT به عنوان یک شاخص افزایش خطر آریتمی بطنی بدخیم محسوب می‌شود (Vasiliadis *et al.*, 2014).

در سال‌های اخیر مطالعات متعددی جهت روشن ساختن مکانیسم کاردیومیوپاتی ناشی از دیابت انجام یافته است. مکانیسم‌های اصلی اختلالات قلبی در دیابت ملیتوس عبارتند از: آترواسکلروز عروق کرونر، میکروآنژیوپاتی، اختلالات اعصاب خودکار قلب و بازآرایی (remodeling) سلولی میوکارد (Takeda, 2010). نکروز وسیع سلول‌های قلبی و جایگزینی

در این مطالعه بین مقدار قند خون و میزان تروپونین I قلبی سرم ($r=0/685$, $p=0/010$) و نیز سطح فعالیت سرمی آنزیم‌ها شامل AST ($r=0/862$, $p=0/000$), LDH ($r=0/760$, $p=0/008$) و CK-MB ($r=0/590$) همبستگی مستقیم و معنی‌داری مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

اگر چه پاتوژنز دیابت نوع ۲ دقیقاً مشخص نشده است، لیکن مدارک موجود اختلال در متابولیسم گلوکز و چربی را در این امر دخیل می‌دانند (Kesari *et al.*, 2006). اختلالات قلبی یکی از مهم‌ترین عوارض دیابت قندی است و بیماری ایسکمیک قلب شایع‌ترین شکل از این اختلالات در بیماران دیابتی محسوب می‌شود که با مرگ و میر بالا همراه است. کاردیومیوپاتی دیابتی نوعی از اختلال قلبی بدون هیچ حالت غیرعادی در عروق کرونری است (Takeda, 2010). اولین تغییر عملکردی قلب در دیابت ملیتوس مربوط به اختلال عملکردی دیاستولی می‌باشد (Cosson and Kevorkian, 2003; Fang *et al.*, 2003) که در مراحل بعدی به اختلال عملکردی سیستولی و نارسایی قلبی می‌انجامد (Mandavia *et al.*, 2012). در بطن چپ و راست موش‌های صحرایی دیابتی هیچ تغییر معنی‌داری در محتوای تروپونین I و بیان ژن TnI دیده نشده است، اما میزان فسفریلاسیون TnI در قلب دیابتی حدود ۴۰ درصد بیشتر بود که این تغییر بر اساس درمان با انسولین قابل برگشت بود (Liu *et al.*, 1996). همچنین تغییرات cTnT در بیماران انسانی دچار دیابت بررسی شده است و نشان داده شده است که این تغییرات در

عروقی، اختلال در تنظیم نیتريت اكسيد و فعال شدن بیش از حد سیستم رنین-آنژیوتانسین-آلدسترون همگی سبب آسیب قلبی می‌شوند (Mandavia et al., 2012). به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی، در این مطالعه افزایش میزان cTnI سرم همراه با بالا رفتن میزان فعالیت سایر آنزیم‌های سرمی شاخص قلب در موش‌های صحرایی دچار دیابت در مقایسه با گروه شاهد، موید بروز درجاتی از آسیب عضله قلب است. هر چند به مطالعات بیشتری در جهت تعیین اهمیت این افزایش و ارتباط با آن با پیش‌آگهی بیماری نیاز است.

سپاسگزاری

این مطالعه مستخرج از طرح تحقیقاتی مصوب و با حمایت مالی انجمن علمی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به انجام رسیده است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که در این مطالعه هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

فیبرهای انقباضی با بافت همبند در بیماران دیابتی مبتلا به نارسایی احتقانی قلب همانند مدل‌های حیوانی گزارش شده است. اختلال در برداشت کلسیم توسط شبکه سارکوپلاسمی و کاهش پمپ کلسیم سارکولمی و فعالیت مبادله‌کننده کلسیم-سدیم از سایر مواردی است که در اختلال مکانیکی قلب نقش دارند (Joseph et al., 2005)، هرچند شواهد متناقضی در این خصوص وجود دارد (Zhang et al., 2008; Ligeti et al., 2006).

یک شکل موقتی از کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک در نوزادانی که مادرشان به دیابت مبتلاست، گزارش شده است، به طوری که مقدار کراتین کیناز قلبی-مغزی و تروپونین I قلبی سرم در این نوزادان نسبت به گروه کنترل بالاتر بوده است (Oran et al., 2003). مطالعات پیشین نشان داده است که پروتئین‌های انقباضی در قلب دیابتی مختل می‌شوند (Liu et al., 1996). بروز اختلالات عملکردی قلب از جمله کاهش چشمگیر نیروی انقباضی و استراحت و اختلال پمپ قلب در دیابت بالینی و تجربی گزارش شده است (Oran et al., 2003). به‌هم‌خوردن متابولیسم انسولین، استرس اکسیداتیو، افزایش اسیدهای چرب گردش خون و سمیت لیپیدها و در مرحله بعد، آسیب به نفوذپذیری

منابع

- Al-Mallah, M., Zuberi, O., Arida, M. and Kim, H.E., (2008). Positive troponin in diabetic ketoacidosis without evident acute coronary syndrome predicts adverse cardiac events. *Clinical Cardiology*, 31(2): 67-71.
- Cosson, S. and Kevorkian, J.P. (2003). Left ventricular diastolic dysfunction: an early sign of diabetic cardiomyopathy? *Diabetes Metabolism*, 29: 455-466.

- Fang, Z.Y., Yuda, S., Anderson, V., Anderson, V., Short, L., Case, C., *et al.* (2003). Echocardiographic detection of early diastolic myocardial disease, *Journal of the American College of Cardiology*, 41: 611-617.
- Fein, F.S., Strobeck, J.E., Malhotra, A., Scheuer, J. and Sonnenblick, E.H. (1981). Reversibility of diabetic cardiomyopathy with insulin in rats. *Circulation Research*, 49(6): 1251-1261.
- Gupta, R.K., Kesari, A.N., Murthy, P.S., Chandra, R., Tandon, V. and Watal, G. (2005). Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1): 75-81.
- Heshmati, H., Behnampour, N., Khorasani, F. and Moghadam, Z. (2014). Prevalence of chronic complications of diabetes and its related factors in referred type 2 diabetes patients in Freydonkenar diabetes center. *Journal of Neyshabur University of Medical Sciences*, 1(1): 36-43. [In Persian]
- Joseph, T., Coirault, C., Dubourg, O. and Lecarpentier, Y., (2005). Changes in crossbridge mechanical properties in diabetic rat cardiomyopathy. *Basic Research in Cardiology*, 100(3): 231-239.
- Kesari, A.N., Gupta, R.K., Singh, S.K., Diwakar, S. and Watal, G. (2006). Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of *Aegle marmelos* seed extract in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3): 374-379.
- Kita, Y., Shimizu, M., Sugihara, N., Yoshio, H., Shibayama, S. and Takeda, R. (1991). Correlation between histological changes and mechanical dysfunction in diabetic rat hearts. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 11: 177-188.
- Laakso, M. (2001). Cardiovascular disease in type 2 diabetes: challenge for treatment and prevention, *Journal of Internal Medicine*, 249: 225-235.
- Lachin, T. and Reza, H. (2012). Anti diabetic effect of cherries in alloxan induced diabetic rats. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic and Immune Drug Discovery*, 6(1): 67-72.
- Ligeti, L., Szenczi, O., Prestia, C.M., Szabó, C., Horváth, K., Marcsek, Z.L., *et al.* (2006). Altered calcium handling is an early sign of streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *International Journal of Molecular Medicine*, 17(6): 1035-1043.
- Liu, X., Takeda, N. and Dhalla, N.S. (1996). Troponin I phosphorylation in heart homogenate from diabetic rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1316(2): 78-84.
- Mandavia, C.H., Pulakat, L., DeMarco, V. and Sowers, J.R. (2012). Over-nutrition, obesity and metabolic cardiomyopathy. *Metabolism*, 61(9): 1205-1210.
- Mongeon, F.P., Dorais, M., Lorier, J.L., Froment, D., Letendre, E. and Rinfret, S. (2009). Effect of hemodialysis, coronary artery disease and diabetes on cardiac troponin-I: a prospective survey over one year. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 3: 69-77.
- Oran, B., Cam, L., Başpınar, O., Baysal, T., Reisli, I., Peru, H., *et al.* (2003). Cardiac troponin-I in the serum of infants of diabetic mothers. *Cardiology in the Young*, 13: 248-252.
- Pourmoghaddas, A. and Hekmatnia, A. (2003). The relationship between QTc interval and cardiac autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 249: 125-128.
- Rodrigues, B., Cam, M.C. and McNeill, J.H. (1995). Myocardial substrate metabolism: implications for diabetic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27: 169-179.

-
- Takeda, N. (2010). Cardiac disturbances in diabetes mellitus. *Pathophysiology*, 17: 83-88.
 - Turner, R.C., Millns, H., Neil, H.A., Stratton, I.M., Manley, S.E., Matthews, D.R., *et al.* (1998). Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *British Medical Journal*, 317: 693-694.
 - Vasiliadis, I., Kolovou, G., Mavrogeni, S., Nair, D.R. and Mikhailidis, D.P. (2014). Sudden cardiac death and diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications* 28: 573-579.
 - Zhang, L., Cannell, M.B., Phillips, A.R.J., Cooper, G.J.S. and Ward, M.L. (2008). Altered Calcium Homeostasis Does Not Explain the Contractile Deficit of Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes*, 57(8): 2158-2166.

Archive of SID