

اثر لوزارتان بر دانسیتهی مویرگی عضله قلبی در رت‌های دیابتی شده

دکتر علیرضا فلاح زاده^۱، دکتر نوشین افشار مقدم^۲، دکتر مجید خزاعی^۳

چکیده

مقدمه: اثرات تحریکی و یا مهاری آنژیوتانسین II بر آنژیوژنز اغلب به گیرنده‌ی نوع I نسبت داده می‌شود. با این حال تنها تعداد اندکی از مطالعات به بررسی نقش گیرنده‌ی نوع I آنژیوتانسین II بر تغییرات عروقی در قلب در دیابت پرداخته‌اند. در این مطالعه، اثر لوزارتان (بلوکر گیرنده‌ی نوع I آنژیوتانسین II) بر دانسیتهی مویرگی عضله قلبی در رت‌های دیابتی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه ۱۸ رت سفید نر در سه گروه شاهد، دیابتی و دیابتی دریافت کننده لوزارتان قرار گرفتند. گروه ۲ و ۳ توسط استرپتوزوتوسین (۵۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به صورت دوز واحد و داخل صفاقی) دیابتی شدند. رت‌ها در گروه ۳ روزانه به میزان ۱۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم لوزارتان به صورت داخل صفاقی (Interaperitoneal یا IP) و به مدت ۲۱ روز دریافت کردند. رت‌ها در گروه ۲ حلال دارو (سالین) با حجم مساوی دریافت کردند. در ابتدا و انتهای آزمایش از رت‌ها خون‌گیری شد و قلب آن‌ها جهت بررسی دانسیتهی مویرگی از بدن خارج شد.

یافته‌ها: دانسیتهی مویرگی عضله قلبی در حیوانات دیابتی به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کمتر بود ($P < 0.05$). مصرف لوزارتان تغییر معنی‌داری در دانسیتهی مویرگی عضله قلب رت‌های دیابتی ایجاد نکرد ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد مصرف لوزارتان نمی‌تواند اثر مفیدی بر افزایش دانسیتهی مویرگی در قلب رت‌های دیابتی داشته باشد.

واژگان کلیدی: لوزارتان، آنژیوتانسین II، دانسیتهی مویرگی، دیابت

مقدمه

و در بیشتر موارد علت مرگ و میر در افراد مبتلا به دیابت، مشکلات عروقی می‌باشد (۵).

آنژیوژنز و انشعاب‌زایی عروق خونی، در افراد مبتلا به دیابت به اندازه‌ی کافی صورت نمی‌گیرد (۵).

از جمله عوامل مؤثر بر آنژیوژنز که در سال‌های اخیر مطالعه بر روی آن انجام گرفته است، آنژیوتانسین II

می‌باشد (۸-۶). اکثر اعمال فیزیولوژیک آنژیوتانسین II

از طریق گیرنده‌ی نوع I آن اعمال می‌شود (۱۰-۹).

اثر آنژیوتانسین II بر آنژیوژنز نیز اغلب به گیرنده‌ی نوع I نسبت داده می‌شود (۱۳-۱۱). نتیجه‌ی اثر

تحریک گیرنده‌ی نوع I آنژیوتانسین هم به صورت تحریک آنژیوژنز (۱۴، ۱۲) و هم به صورت مهار

دیابت از جمله شایع‌ترین بیماری‌های مزمن در جهان می‌باشد. مشخصه‌ی اصلی این بیماری افزایش قند خون به علت نقص در ترشح انسولین یا اختلال در عملکرد انسولین و یا هر دو مورد می‌باشد. در دیابت نوع I، تخریب سلول‌های بتای پانکراس باعث کاهش نسبی یا مطلق انسولین می‌گردد. در صورت عدم کنترل قند خون، دیابت باعث تغییرات پاتولوژیک زیادی مانند اختلال در عملکرد کلیه و گوارش، دستگاه ایمنی، ترمیم بافت‌ها و همچنین آسیب‌های میکرووسکولار در بدن می‌گردد (۱). اختلال در عملکرد عروق بدن از مهم‌ترین عوارض افزایش قند خون در زمان دیابت است (۴-۲)

^۱ گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

^۲ دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۳ دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید خزاعی

شد. بقیه‌ی رت‌ها پس از دیابتی شدن در گروه ۲ و ۳ به ترتیب به عنوان دیابتی (D) و دیابتی تحت درمان با لوزارتان (DL) قرار داده شدند.

رت‌های گروه ۳ لوزارتان را به عنوان بلوکر گیرنده‌ی نوع I آنژیوتانسین به میزان روزانه ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و به صورت داخل صفاقی (Interaperitoneal یا IP) (۱۹)، به مدت ۲۱ روز دریافت کردند. رت‌ها در گروه ۲ حلال دارو (سالین) با حجم مساوی دریافت کردند.

در ابتدا و انتهای آزمایش نمونه‌های خونی از رت‌ها تهیه شد. سپس رت‌ها با دوز بالای ماده‌ی بیهوشی قربانی شدند و قلب آن‌ها جهت بررسی‌های ایمونوهیستوکمیستری (IHC) از بدن خارج شد. بافت قلب پس از شستشو با نرمال سالین جهت تهیه‌ی بلوک‌های بافتی در محلول فیکس کننده‌ی فرمالین قرار داده شد.

اندازه‌گیری غلظت‌های سرمی NO (Nitric oxide) و VEGF (Vascular endothelial growth factor) و sVEGF-R1

نمونه‌های سرمی از دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد به دمای اتاق آورده شد و غلظت سرمی NO با روش تعیین غلظت سرمی متابولیت پایدار NO یعنی نیتريت و با استفاده از روش Promega corp Madison USA اندازه‌گیری شد (۲۰). همچنین سطوح سرمی VEGF و sVEGF-R1 نیز با روش Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) و کیت‌های مخصوص اندازه‌گیری این عوامل (R&D system minneapolis USA) اندازه‌گیری شد.

تعیین دانسیته‌ی مویرگی در عضله‌ی قلبی:

از نمونه‌های بافت قلب که در فرمالین قرار داده شده بود، بلوک بافتی تهیه شد. سپس سکشن‌های عرضی با ضخامت ۵ میکرومتر از قسمت نوک قلب آماده شد.

آنژیوژنز (۱۶-۱۵) گزارش شده است. با این حال تنها تعداد اندکی از مطالعات به بررسی نقش گیرنده‌ی نوع I آنژیوتانسین بر تغییرات عروقی در زمان دیابت پرداخته‌اند.

در این مطالعه اثر لوزارتان (بلوکر گیرنده‌ی نوع I آنژیوتانسین) بر دانسیته‌ی مویرگی عضله‌ی قلبی در رت‌های دیابتی شده مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

حیوانات:

تمام مراحل این مطالعه مورد تأیید کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان قرار گرفت. در این مطالعه از ۱۸ رت سفید نر از نژاد ویستار در محدوده‌ی وزنی 230 ± 30 گرم و طول عمر ۱۲-۱۰ هفته استفاده شد. در طول مطالعه حیوانات به صورت دوتایی در یک قفس و در حیوان‌خانه با دمای معمولی بین ۲۵-۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد با سیکل ۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی قرار گرفتند و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند.

ایجاد دیابت:

پس از سازش حیوانات با محیط حیوان‌خانه، جهت ایجاد دیابت از استرپتوزوتوسین به میزان ۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، حل شده در سالین سرد و به صورت دوز واحد و تزریق داخل صفاقی استفاده شد (۱۸-۱۷). پس از گذشت ۴۸ ساعت قند خون رت‌ها توسط دستگاه گلوکومتر (Acon laboratories, Inc., USA) اندازه‌گیری شد و حیوانات با قند خون بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر دیابتی در نظر گرفته شدند (۱۷).

طراحی آزمایش:

رت‌ها به طور تصادفی در سه گروه ۶ تایی قرار داده شدند. گروه ۱ به عنوان شاهد سالم (C) در نظر گرفته

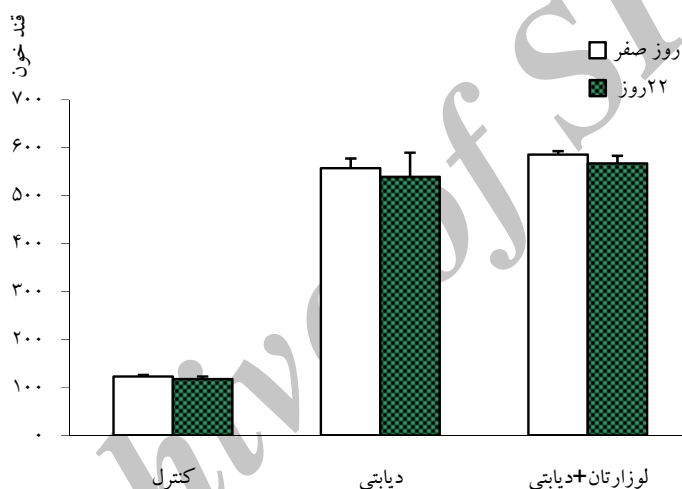
یافته‌ها

قد خون و وزن بدن رت‌های مورد آزمایش به ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

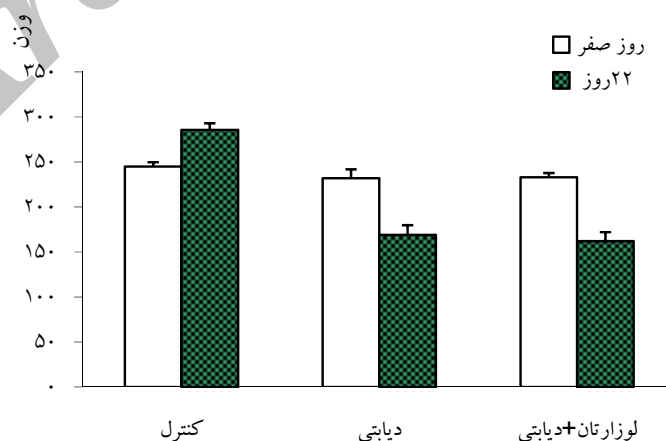
قد خون در گروه شاهد در ابتدا و انتهای آزمایش تفاوت معنی‌داری نداشت. قند خون در دو گروه دیابتی مورد آزمایش در مقایسه با هم در شروع و در پایان آزمایش و همچنین قبل و بعد از آزمایش تفاوت معنی‌داری نداشت.

وزن بدن حیوانات در گروه ۱ بعد از انجام آزمایش

جهت مشخص شدن سلول‌های اندوتلیال مویرگی از روش رنگ‌آمیزی IHC با آنتی‌بادی Anti-CD31 (Rat monoclonal antibody, Abcam, Cambridge, UK) استفاده شد. ۱۵ فیلد میکروسکوپ نوری ($\times 400$) از سه مقطع میکروسکوپی از هر نمونه‌ی بافتی انتخاب گردید و سلول‌های اندوتلیال رنگ گرفته توسط دو پاتولوژیست مورد شمارش قرار گرفت. میانگین تعداد مویرگ‌ها در هر نمونه‌ی بافتی به صورت تعداد در میلی‌متر مربع محاسبه و گزارش شد.



شکل ۱. سطح گلوکز خون (بر حسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در رت‌های مورد آزمایش قبل (روز صفر) و بعد از آزمایش (روز ۲۲)



شکل ۲. وزن بدن (بر حسب گرم) در رت‌های مورد آزمایش قبل (روز صفر) و بعد از آزمایش (روز ۲۲)

*: تفاوت معنی‌دار با روز صفر

غلظت سرمی VEGF در دو گروه شاهد و دیابتی تفاوت معنی‌داری با هم نداشت و لوزارتان تغییر معنی‌داری در غلظت سرمی VEGF ایجاد نکرد ($P > 0/05$).

دانسیته‌ی مویرگی مربوط به عضله‌ی قلب در گروه‌های مورد آزمایش در شکل ۳ نمایش داده شده است. دیابت تجربی ایجاد شده در رت‌ها، دانسیته‌ی مویرگی عضله‌ی قلب را در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0/05$). تجویز لوزارتان با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز به مدت ۲۱ روز تغییر معنی‌داری در دانسیته‌ی مویرگی عضله‌ی قلب در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی حلال دارو ایجاد نکرد ($P > 0/05$).

نمونه‌هایی از لام‌های رنگ‌آمیزی شده از بافت قلبی گروه‌های مختلف در شکل ۴ نشان داده شده است.

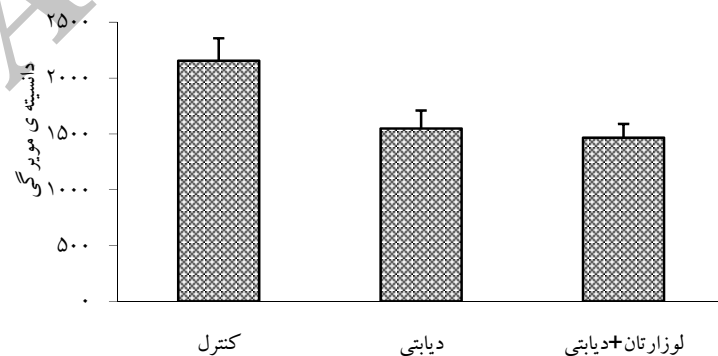
بحث

در این مطالعه اثر لوزارتان بر دانسیته‌ی مویرگی عضله‌ی قلبی رت در زمان دیابت مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، دیابت غلظت سرمی NO و نسبت VEGF/sVEGF-R1 را به طور معنی‌داری کاهش داد. لوزارتان تغییر معنی‌داری در جهت کاهش غلظت سرمی NO و نسبت VEGF/sVEGF-R1 ایجاد نکرد.

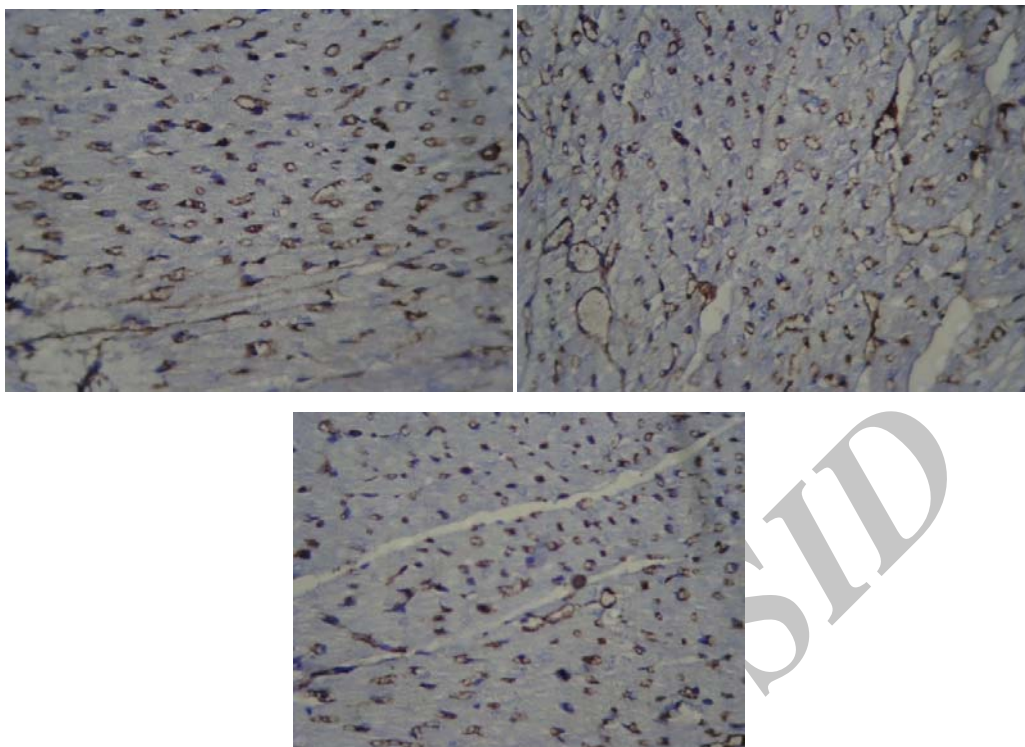
به طور معنی‌داری نسبت به روز صفر افزایش یافت، اما در گروه‌های ۲ و ۳ بعد از آزمایش به طور معنی‌داری نسبت به روز صفر کاهش یافت ($P < 0/05$). تجویز داروی لوزارتان تغییر معنی‌داری در قند خون و وزن بدن حیوانات در مقایسه با گروه مبتلا به دیابت دریافت‌کننده‌ی حلال دارو ایجاد نکرد ($P > 0/05$).

نتایج نشان داد دیابت باعث کاهش معنی‌دار غلظت سرمی NO ($15/11 \pm 2/44$) در مقابل $17/72 \pm 1/33$ میکرومول در لیتر) و نسبت VEGF/sVEGF-R1 گردید ($P < 0/05$). غلظت سرمی sVEGF-R1 در دیابت به طور معنی‌داری افزایش یافت ($977/23 \pm 67/94$) در مقابل $50/51 \pm 591/91$ پیکوگرم در دسی‌لیتر) ($P < 0/05$). ولی غلظت سرمی VEGF تغییر معنی‌داری نداشت ($120/44 \pm 18/41$) در مقابل $125/73 \pm 12/32$ پیکوگرم در دسی‌لیتر). لوزارتان تغییر معنی‌داری در سطح سرمی NO و نسبت VEGF/sVEGF-R1 در روز ۲۲ ایجاد نکرد ($P > 0/05$).

غلظت سرمی sVEGF-R1 در گروه دیابتی به طور معنی‌داری بیشتر از روز صفر بود ($P < 0/05$), اما لوزارتان تأثیر معنی‌داری بر سطح سرمی sVEGF-R1 در دیابت نداشت ($977/23 \pm 67/94$ پیکوگرم در دسی‌لیتر در مقابل $925/76 \pm 53/13$) ($P > 0/05$).



شکل ۳. دانسیته‌ی مویرگی بر حسب میلی‌متر مربع در عضله‌ی قلبی در گروه‌های مورد آزمایش
*: تفاوت معنی‌دار با روز صفر



شکل ۴. نمونه‌های بافت‌شناسی رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی Anti CD31 جهت بررسی دانسیته‌ی مویرگی. فلش‌ها سلول‌های CD31 مثبت را نشان می‌دهند.

مشاهده شد. از دلایل کاهش دانسیته‌ی مویرگی ممکن است کاهش NO باشد. از جمله مکانیزم‌های احتمالی که برای کاهش تولید NO در زمان دیابت مطرح شده است، می‌توان به افزایش تولید سوپراکسید (۲۶)، فعال شدن پروتئین کیناز C (۲۳) و کاهش فعالیت و بیان NO سینتاز اندوتلیومی اشاره کرد (۲۷، ۲۳).

VEGF از مهم‌ترین عوامل آنژیوژنیک است و گیرنده‌های آن VEGF-R1 و VEGF-R2 می‌باشند. VEGF-R1 دارای یک فرم محلول (Soluble VEGF-R1) می‌باشد. این گیرنده به عنوان یک Ligand trap عمل می‌کند و عملکرد آنژیوژنیک VEGF را کاهش می‌دهد (۲۸-۲۹). Thomas و Kendal گزارش کردند که افزایش بیان VEGF-R1 می‌تواند عمل VEGF را آنتاگونیست کند و باعث مهار فعالیت میتوژنی در

دیابت و لوزارتان در زمان دیابت اثر معنی‌داری بر غلظت سرمی VEGF نداشتند. با این حال غلظت سرمی sVEGF-R1 در دیابت به طور معنی‌داری افزایش یافت و لوزارتان نتوانست تغییر معنی‌داری در غلظت سرمی sVEGF-R1 در حیوانات دیابتی داشته باشد.

NO از جمله عواملی است که در روند آنژیوژنز نقش مهمی دارد (۲۲-۲۱، ۵). بر اساس مطالعات قبلی هیپرگلیسمی تولید عروقی NO را کاهش (۲۴-۲۳) و غیر فعال شدن آن را افزایش می‌دهد (۲۵). کاهش تولید NO در موش‌های eNOS-/- باعث اختلال در تکامل عروق قلب و آنژیوژنز قلبی می‌شود (۲۲). در مطالعه‌ی ما نیز با گذشت ۲۲ روز از زمان ایجاد دیابت در رت‌ها، غلظت سرمی NO به طور معنی‌داری کاهش یافت. این کاهش در دانسیته‌ی مویرگی نیز

اسکلتی می‌باشد. همچنین Shimizu و همکاران بیان کردند که بلاک گیرنده‌ی نوع I آنژیوتانسین، آنژیوژنز ناشی از VEGF را در قلب Hamster مهار می‌کند (۴۲). Rakusan و همکاران عنوان کردند که اگر چه بلوکر گیرنده‌ی نوع I آنژیوتانسین، آنژیوژنز ناشی از هیپوکسی مزمن را مهار می‌کند، اما تغییر معنی‌داری در بیان VEGF و نیتریک اکسید سنتاز نوع ۳ در قلب Hamster ایجاد نمی‌کند (۱۲).

در مطالعه‌ی ما لوزارتان به عنوان بلوکر گیرنده‌ی نوع I آنژیوتانسین تغییر معنی‌داری در غلظت سرمی VEGF، NO، VEGF و sVEGF-R1 و VEGF/sVEGF-R1 نسبت به گروه دریافت کننده‌ی حلال دارو ایجاد نکرد و شاید به دلیل عدم تغییر عوامل فوق به وسیله‌ی لوزارتان، دانسیته‌ی مویرگی عضله‌ی قلب در رت‌های دیابتی درمان شده با لوزارتان نسبت به گروه دیابت تغییر معنی‌داری نشان نداد.

نتیجه‌گیری

تزریق داخل صفاقی بلوکر گیرنده‌ی نوع I آنژیوتانسین در رت‌های دیابتی به مدت ۲۱ روز و با دوز ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن در روز تغییر معنی‌داری در دانسیته‌ی مویرگی عضله‌ی قلبی ایجاد نکرد. بنابراین با توجه به اثرات مفید پیشنهادی برای این دارو در مدل‌های غیر دیابتی، این دارو جهت بهبود آنژیوژنز قلب در زمان دیابت پیشنهاد نمی‌گردد.

تشکر و قدردانی

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل تأمین هزینه‌های انجام طرح قدردانی می‌گردد.

سلول‌های اندوتلیال عروقی گردد (۳۰). علاوه بر این، مطالعات قبلی عنوان کردند که افزایش بیان VEGF-R1 رشد و متاستاز تومورها را مهار می‌کند (۳۱). همچنین با مهار آنژیوژنز باعث سرکوب تومورها می‌شود (۳۲-۳۳). Ambati و همکاران عنوان کردند که Corneal avascularity در چشم ناشی از عمل تنظیمی و آنتاگونیستی sVEGF-R1 بر روی VEGF می‌باشد (۳۴). اگر چه در مورد VEGF گزارش‌هایی مبنی بر افزایش (۳۵)، کاهش (۳۶) و عدم تغییر (۳۷-۳۸) این عامل در زمان دیابت وجود دارد، اما در برخی گزارش‌ها عنوان شده است که مسیر سیگنالینگ VEGF در زمان دیابت دچار اشکال می‌شود (۳، ۳۵). در مطالعه‌ی ما اگر چه غلظت سرمی VEGF تغییر معنی‌داری نداشت، اما نسبت VEGF/sVEGF-R1 به طور معنی‌داری کاهش یافت. بنابراین می‌توان عنوان کرد که کاهش نسبت VEGF/sVEGF-R1 از جمله عوامل احتمالی در کاهش دانسیته‌ی مویرگی عضله‌ی قلب در زمان دیابت می‌باشد.

در مورد اثر بلاکرها‌ی گیرنده‌ی نوع I آنژیوتانسین بر دانسیته‌ی مویرگی و آنژیوژنز گزارش‌های مختلفی وجود دارد. از طرفی گزارش شده است که بلوکرهای گیرنده‌ی نوع I آنژیوتانسین تشکیل عروق جدید و دانسیته‌ی مویرگی میوکارد را بعد از انفارکتوس میوکارد افزایش می‌دهند (۳۹، ۱۵). در طرف مقابل بیان شده است که آنژیوژنز ناشی از هیپوکسی متناوب مزمن (Chronic intermitant hypoxia) به وسیله‌ی بلاکر گیرنده‌ی نوع I آنژیوتانسین، (Irbesartan) به طور کامل مهار می‌شود (۱۲). علاوه بر این گزارش شده است که مهار گیرنده‌ی نوع I آنژیوتانسین دارای اثر مهاری بر آنژیوژنز ناشی از ایسکمی (۴۰) و آنژیوژنز ناشی تحریک الکتریکی (۴۱) در عضله‌ی

References

1. Morrison EY, Ragoobirsingh D, Thompson H, Fletcher C, Smith-Richardson S, McFarlane S, et al. Phasic insulin dependent diabetes mellitus: manifestations and cellular mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(7): 1996-2001.
2. Boodhwani M, Sodha NR, Mieno S, Xu SH, Feng J, Ramlawi B, et al. Functional, cellular, and molecular characterization of the angiogenic response to chronic myocardial ischemia in diabetes. *Circulation* 2007; 116(11 Suppl): I31-7.
3. Hazarika S, Dokun AO, Li Y, Popel AS, Kontos CD, Annex BH. Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus: differential regulation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *Circ Res* 2007; 101(9): 948-56.
4. Kivela R, Silvennoinen M, Touvra AM, Lehti TM, Kainulainen H, Vihko V. Effects of experimental type 1 diabetes and exercise training on angiogenic gene expression and capillarization in skeletal muscle. *FASEB J* 2006; 20(9): 1570-2.
5. Silvestre JS, Levy BI. Molecular basis of angiopathy in diabetes mellitus. *Circ Res* 2006; 98(1): 4-6.
6. Li P, Kondo T, Numaguchi Y, Kobayashi K, Aoki M, Inoue N, et al. Role of bradykinin, nitric oxide, and angiotensin II type 2 receptor in imidapril-induced angiogenesis. *Hypertension* 2008; 51(2): 252-8.
7. Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG. Nonclassic endogenous novel [corrected] regulators of angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2007; 59(2): 185-205.
8. Walther T, Menrad A, Orzechowski HD, Siemeister G, Paul M, Schirner M. Differential regulation of in vivo angiogenesis by angiotensin II receptors. *FASEB J* 2003; 17(14): 2061-7.
9. Munk VC, Sanchez de ML, Petrimpol M, Butz N, Banfi A, Eriksson U, et al. Angiotensin II induces angiogenesis in the hypoxic adult mouse heart in vitro through an AT2-B2 receptor pathway. *Hypertension* 2007; 49(5): 1178-85.
10. Watanabe T, Barker TA, Berk BC. Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects. *Hypertension* 2005; 45(2): 163-9.
11. Emanuelli C, Salis MB, Stacca T, Pinna A, Gaspa L, Madeddu P. Angiotensin AT(1) receptor signalling modulates reparative angiogenesis induced by limb ischaemia. *Br J Pharmacol* 2002; 135(1): 87-92.
12. Rakusan K, Chvojikova Z, Oliviero P, Ostadalova I, Kolar F, Chassagne C, et al. ANG II type I receptor antagonist irbesartan inhibits coronary angiogenesis stimulated by chronic intermittent hypoxia in neonatal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(3): H1237-H1244.
13. Tamarat R, Silvestre JS, Kubis N, Benessiano J, Duriez M, deGasparo M, et al. Endothelial nitric oxide synthase lies downstream from angiotensin II-induced angiogenesis in ischemic hindlimb. *Hypertension* 2002; 39(3): 830-5.
14. Michel F, Ambroisine ML, Duriez M, Delcayre C, Levy BI, Silvestre JS. Aldosterone enhances ischemia-induced neovascularization through angiotensin II-dependent pathway. *Circulation* 2004; 109(16): 1933-7.
15. de Boer RA, Pinto YM, Suurmeijer AJ, Pokharel S, Scholtens E, Humler M, et al. Increased expression of cardiac angiotensin II type 1 (AT(1)) receptors decreases myocardial microvessel density after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2003; 57(2): 434-42.
16. Munzenmaier DH, Greene AS. Chronic angiotensin II AT1 receptor blockade increases cerebral cortical microvessel density. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(2): H512-H516.
17. Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Imani A. Protective effect of enalapril on vascular reactivity of the rat aorta. *Vascul Pharmacol* 2004; 40(6): 301-7.
18. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; 50(6): 537-46.
19. Moosavi SM, Johns EJ. Effect of renal perfusion pressure on renal function, renin release and renin and angiotensinogen gene expression in rats. *J Physiol* 1999; 520 Pt 1: 261-9.
20. Khazaei M, Nematbakhsh M. The effect of hypertension on serum nitric oxide and vascular endothelial growth factor concentrations. A study in DOCA-Salt hypertensive ovariectomized rats. *Regul Pept* 2006; 135(1-2): 91-4.
21. Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL. Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281(6): H2528-H2538.
22. Zhao X, Lu X, Feng Q. Deficiency in endothelial nitric oxide synthase impairs myocardial angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(6): H2371-H2378.
23. Bohlen HG, Nase GP. Arteriolar nitric oxide concentration is decreased during hyperglycemia-induced betaII PKC activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(2): H621-H627.
24. Lash JM, Nase GP, Bohlen HG. Acute hyperglycemia depresses arteriolar NO formation in skeletal muscle. *Am J Physiol* 1999;

- 277 (4 Pt 2): H1513-H1520.
25. Brodsky SV, Morrishow AM, Dharia N, Gross SS, Goligorsky MS. Glucose scavenging of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(3): F480-F486.
 26. Bagi Z, Toth E, Koller A, Kaley G. Microvascular dysfunction after transient high glucose is caused by superoxide-dependent reduction in the bioavailability of NO and BH(4). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(2): H626-H633.
 27. Ding Y, Vaziri ND, Coulson R, Kamanna VS, Roh DD. Effects of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279(1): E11-E17.
 28. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(5): 359-71.
 29. Roberts DM, Kearney JB, Johnson JH, Rosenberg MP, Kumar R, Bautch VL. The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. *Am J Pathol* 2004; 164(5): 1531-5.
 30. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(22): 10705-9.
 31. Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G, Soroceanu L, Heike Y, Gillespie GY, et al. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(15): 8795-800.
 32. Hasumi Y, Mizukami H, Urabe M, Kohno T, Takeuchi K, Kume A, et al. Soluble FLT-1 expression suppresses carcinomatous ascites in nude mice bearing ovarian cancer. *Cancer Res* 2002; 62(7): 2019-23.
 33. Takei Y, Mizukami H, Saga Y, Yoshimura I, Hasumi Y, Takayama T, et al. Suppression of ovarian cancer by muscle-mediated expression of soluble VEGFR-1/Flt-1 using adeno-associated virus serotype 1-derived vector. *Int J Cancer* 2007; 120(2): 278-84.
 34. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* 2006; 443(7114): 993-7.
 35. Sasso FC, Torella D, Carbonara O, Ellison GM, Torella M, Scardone M, et al. Increased vascular endothelial growth factor expression but impaired vascular endothelial growth factor receptor signaling in the myocardium of type 2 diabetic patients with chronic coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(5): 827-34.
 36. Chou E, Suzuma I, Way KJ, Opland D, Clermont AC, Naruse K, et al. Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin-resistant and diabetic States: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue. *Circulation* 2002; 105(3): 373-9.
 37. Blann AD, Belgore FM, McCollum CN, Silverman S, Lip PL, Lip GY. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1, in the plasma of patients with coronary or peripheral atherosclerosis, or Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2002; 102(2): 187-94.
 38. Larger E, Marre M, Corvol P, Gasc JM. Hyperglycemia-induced defects in angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane model. *Diabetes* 2004; 53(3): 752-61.
 39. Schieffer B, Wirger A, Meybrunn M, Seitz S, Holtz J, Riede UN, et al. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation* 1994; 89(5): 2273-82.
 40. Sasaki K, Murohara T, Ikeda H, Sugaya T, Shimada T, Shintani S, et al. Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 2002; 109(5): 603-11.
 41. Amaral SL, Linderman JR, Morse MM, Greene AS. Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II and VEGF. *Microcirculation* 2001; 8(1): 57-67.
 42. Shimizu T, Okamoto H, Chiba S, Matsui Y, Sugawara T, Akino M, et al. VEGF-mediated angiogenesis is impaired by angiotensin type 1 receptor blockade in cardiomyopathic hamster hearts. *Cardiovasc Res* 2003; 58(1): 203-12.

Effects of Losartan on Capillary Density in Cardiac Muscles of Diabetic Rats

Ali Reza Fallahzadeh PhD¹, Noushin Afsharmoghaddam MD², Majid Khazaei MD, PhD³

Abstract

Background: Stimulatory and/or inhibitory effects of angiotensin II is attributed to angiotensin receptor I. A few studies investigated the role of angiotensin receptor I on cardiovascular system in diabetic subjects. In this study, we evaluated the effects of losartan, an angiotensin II receptor I blocker, on myocardial capillary density in diabetic rats.

Methods: A total number of 18 male rats were divided into 3 groups of control, diabetic, and diabetic receiving losartan. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (55 mg/kg). A daily dose of 15 mg/kg intraperitoneal losartan was injected to the treatment group. After 21 days, blood samples were taken and myocardial tissue was evaluated by immunohistochemistry.

Findings: Myocardial capillary density in diabetic animals was lower than the control group ($P < 0.05$). Losartan could not significantly change capillary density in myocardial tissue of the diabetic rats ($P > 0.05$).

Conclusion: It seems that losartan administration does not have beneficial effects on myocardial capillary density in diabetic animals.

Keywords: Losartan, Angiotensin II, Capillary density, Diabetes

¹ Department of Physiology, School of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

² Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³ Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Majid Khazaei MD, PhD, Email: khazaei@med.mui.ac.ir