



## Therapeutic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D and losartan co-administration on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats

Mohsen Sharifi klishadi<sup>1,2</sup>, Farideh Zarei<sup>3</sup>, Shahnaz Shekarforoush<sup>4</sup>, Fereshteh Safari<sup>5</sup>, Fatemeh Safari<sup>2,1\*</sup>

1. Dept. of Physiology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

2. Cardiovascular Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

3. Dept. of Physiology, International Campus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

4. Dept. of Physiology, Arsanjan Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran

5. School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Received: 1 Mar 2014

Accepted: 9 Jul 2014

### Abstract

**Introduction:** Studies support the idea that low levels of vitamin D are associated with a higher risk of heart disease. Losartan has also been prescribed as a drug commonly used for treating hypertension. The aim of the current study was to investigate the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D in combination with a non-hypotensive dose of losartan on myocardial infarct size, reperfusion-induced arrhythmia and cardiac expression of survival factors in the ischemic-reperfused rat heart.

**Methods:** Male rats were randomly divided into untreated ischemia-reperfused rats (IR group) and groups pre-treated with losartan (Los+IR) or vitamin D<sub>3</sub> (VitD+IR) or both of them (Los+VitD+IR). Animals were subjected to 30 min of left coronary artery occlusion followed by 120 min of reperfusion. Infarct size measurement was performed using tetrazolium chloride. Incidence of arrhythmia was analysed according to Lambeth convention. Gene expression was evaluated by real time RT-PCR technique.

**Results:** In VitD+IR and Los+IR groups the infarct size did not differ significantly. In Los+VitD+IR group, the infarct size was decreased by 21.4±7.3% (P<0.001 vs. IR, P<0.05 vs. VitD+IR, P<0.01 vs. Los+IR). The number of ventricular ectopic beats was 201±32 beats in Los+VitD+IR group (P<0.001 vs. IR, P<0.01 vs. VitD+IR, P<0.05 vs Los+IR). The increase of thioredoxin-1 and catalase transcription levels was not significant in Los+IR and VitD+IR groups, however, in Los+VitD+IR group the mRNA levels of these survival factors were markedly increased (P<0.001 vs IR).

**Conclusion:** Co-administration of a non-hypotensive dose of losartan and vitamin D<sub>3</sub> protects the heart against ischemia-reperfusion injury accompanied by an increase in transcription of prosurvival factors.

**Key words:** Myocardial ischemia reperfusion, Vitamin D<sub>3</sub>, Losartan, Thioredoxin-1, catalase

\* Corresponding author e-mail: fa.cardio@gmail.com

Available online at: www.phypha.ir/ppj

## تجویز توام 1,25 dihydroxyvitamin D و لوزارتان آسیب ناشی از ایسکمی رپرفیوژن میوکارد را در موش صحرایی کاهش می‌دهد

محسن شریفی کلیشادی<sup>۱،۲</sup>، فریده زارعی<sup>۳</sup>، شهناز شکر فروش<sup>۴</sup>، فرشته صفری<sup>۵</sup>، فاطمه صفری<sup>۲،۱\*</sup>

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد

۲. مرکز تحقیقات قلب و عروق یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد

۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده بین‌الملل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد

۴. گروه فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، فارس

۵. دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز

پذیرش: ۱۸ تیر ۹۳

دریافت: ۱۰ اسفند ۹۲

### چکیده

**مقدمه:** کمبود ویتامین D ارتباط مستقیم با وقوع بیماریهای قلبی دارد. لوزارتان نیز یک داروی ضد فشار خون با اثرات کاردیوپروتکتیو است. هدف از این مطالعه بررسی اثر مصرف همزمان دوزهای غیر موثر بر فشار خون و ایسکمی 1,25 dihydroxyvitamin D (ویتامین D3) و لوزارتان بر اندازه ناحیه انفارکت، شیوع آریتمی‌های دوره رپرفیوژن و بیان فاکتورهای محافظتی در قلب ایسکمیک موش‌های صحرایی بود.

**روش‌ها:** موش‌های صحرایی نر به گروههای ایسکمی رپرفیوژن بدون درمان (IR)، گروههای تیمار با لوزارتان (Los+IR) و ویتامین D3 (VitD+IR) و گروه دریافت کننده هر دو دارو (Los+VitD+IR) تقسیم شدند. جهت القای ایسکمی شاخه نزولی شریان کرونر چپ به مدت ۳۰ دقیقه مسدود و به مدت ۱۲۰ دقیقه تحت خونرسانی مجدد قرار گرفت. اندازه‌گیری ناحیه انفارکت توسط رنگ آمیزی با تترازولیوم کلراید و آنالیز آریتمی‌ها مطابق قرارداد لامبیس صورت گرفت. میزان بیان ژن‌ها توسط تکنیک real time RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در گروه‌های VitD+IR و Los+IR اندازه ناحیه انفارکت نسبت به گروه IR کاهش معنی‌داری نشان نداد. در گروه Los+VitD+IR اندازه انفارکت به  $21.4 \pm 7.3\%$  رسید ( $P < 0.001$  vs. IR,  $P < 0.05$  vs. VitD+IR,  $P < 0.01$  vs. Los+IR). تعداد ضربانات زودرس بطنی در گروه Los+VitD+IR  $201 \pm 32$  ضربه بود ( $P < 0.001$  vs. IR). این کاهش نسبت به گروه‌های VitD+IR و Los+IR نیز معنی‌دار بود ( $P < 0.05$  و  $P < 0.01$ ). سطح mRNA تیوردوکسین<sup>۱</sup> و کاتالاز در گروه‌های Los+IR و VitD+IR تغییر معنی‌داری نداشت اما در گروه Los+VitD+IR به طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.001$  vs. IR).

**نتیجه‌گیری:** استفاده همزمان از دوز غیر موثر بر ایسکمی لوزارتان و فرم فعال ویتامین D می‌تواند با افزایش بیان فاکتورهای محافظتی در قلب، مقاومت قلب را در برابر آسیب ایسکمی رپرفیوژن افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: ایسکمی رپرفیوژن میوکارد، ویتامین D، لوزارتان، تیوردوکسین<sup>۱</sup>، کاتالاز

### مقدمه

پاتولوژی آسیب ایسکمی رپرفیوژن میوکارد دارد. آنژیوتانسین II نه تنها با تنگ کردن عروق باعث کاهش اکسیژن رسانی به قلب می‌شود بلکه با فعال کردن گیرنده AT1 موجب فعال شدن مسیر سیگنالینگ JAK-STAT و نیز افزایش بیان ژن‌های MAPK، NF- $\kappa$ B، TGF- $\beta$  و fas در کاردیومیوسیت‌ها می‌گردد که از عوامل مهم درگیر در آسیب

فعالیت سیستم رنین - آنژیوتانسین نقش مهمی در

fa.cardio@gmail.com

www.phypha.ir/ppj

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

گیرنده‌های غشایی و هسته‌ای در اکثر سلول‌ها از جمله کاردیومیوسیت‌ها، سلولهای اندوتلیال و سلولهای عضله صاف عروق نقشی فراتر از تنظیم‌کنندگی هموستاز کلسیم را به خود اختصاص داده است [۶، ۲۴]. تحقیقات نشان داده است که موش‌های فاقد گیرنده ویتامین D و یا آنزیم سنتزکننده ویتامین دچار اختلالات ساختاری و عملکردی در قلب هستند که به صورت هیپرتروفی و نارسایی میوکارد بروز می‌کند و درمان با ویتامین D و آنالوگ‌های آن از اختلالات مذکور پیشگیری می‌کند مصرف ویتامین D در موش‌های دچار نارسایی قلبی نیز بهبود قابل توجهی را در عملکرد بطن چپ ایجاد می‌کند [۱۳، ۱۶، ۲۲] اما نقش دقیق این ویتامین در کاهش آسیب ناشی از ایسکمی رپرفیوژن حاد میوکارد و به ویژه مکانیسم‌های مولکولی مسوول، همچنان با ناشناخته‌های فراوانی روبروست. با وجود جایگاه ویژه لوزارتان در گروه داروهای کاردیوپروتکتیو و نیز اهمیت مصرف ویتامین D در افزایش سلامت قلب و عروق که در سالهای اخیر مورد توجه محققان قرار گرفته است گزارشی مبنی بر اثر سینرژیک این دو دارو در افزایش مقاومت قلب در برابر ایسکمی ارائه نشده است لذا در مطالعه حاضر به بررسی اثر مصرف توام 1,25 dihydroxyvitamin D (ویتامین D3) و لوزارتان بر وقوع آریتمی‌های ناشی از رپرفیوژن میوکارد، سایز ناحیه انفارکت و نیز بیان فاکتورهای survival در بافت قلب ایسکمیک خواهیم پرداخت.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی رت‌های نر نژاد ویستار با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم انجام گردید. حیوانات با سیکل روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی انجام گرفت. هدف از این مطالعه در مرحله اول بررسی اثر مصرف همزمان لوزارتان و ویتامین D بر سایز ناحیه انفارکت بطن چپ بود بدین منظور حیوانات به ۵ گروه تقسیم شدند (n=10):

۱- گروه ایسکمی-رپرفیوژن (IR): در این گروه با انسداد شریان LAD به مدت ۳۰ دقیقه و باز کردن مجدد شریان به

ناشی از ایسکمی-رپرفیوژن میوکارد محسوب شده و موجب القای آپوپتوز در کاردیومیوسیت‌ها می‌شوند [۱۱، ۱۵]. آنژیوتانسین II در طی ایسکمی میوکارد تولید ATP در کاردیومیوسیت‌ها را کاهش و در مقابل تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را افزایش داده و موجب پیشرفت استرس اکسیداتیو می‌گردد که سرانجام کاردیومیوسیت‌ها را به سمت مرگ سلولی هدایت خواهد کرد [۷، ۱۲]. با توجه به اثرات مخرب آنژیوتانسین در ایسکمی و رپرفیوژن میوکارد، در سالهای اخیر استفاده از داروهای مهارکننده این سیستم به منظور پیشگیری و درمان آسیب ایسکمی رپرفیوژن میوکارد مورد توجه قرار گرفته است [۵]. لوزارتان یک داروی مهارکننده گیرنده نوع یک آنژیوتانسین (AT1) می‌باشد که بعنوان یک داروی ضد فشار خون به بازار عرضه شد اما مطالعات سال‌های اخیر از جمله مطالعه گروه ما نشان داده است که این دارو مستقل از اثر ضد فشارخونی، می‌تواند با اثر مستقیم بر کاردیومیوسیت‌ها اثرات کاردیوپروتکتیو در قلب اعمال نماید که بسیار به دوز و مدت زمان استفاده دارو وابسته است به طوری که در مطالعه قبل ما مصرف دوز نسبتاً پایین و غیر موثر بر فشار خون داروی لوزارتان به مدت یک هفته کاهش معنی داری در اندازه ناحیه انفارکت و شدت آریتمی‌های دوره ایسکمی ایجاد نکرد در حالیکه با افزایش مدت درمان به ۱۰ هفته اثرات آنتی ایسکمی قابل توجهی ایجاد گردید [۱۸].

با وجود جایگاه داروهای مهارکننده سیستم رنین-آنژیوتانسین در پیشگیری و درمان آسیب ناشی از ایسکمی میوکارد آمار رو به افزایش مرگ و میر ناشی از این بیماری قلبی شاهی بر عدم کفایت این داروها در درمان است. مطالعات اخیر، ارتباط بین کمبود ویتامین D<sub>3</sub> و میزان وقوع بیماری‌های قلبی عروقی را به خوبی نشان داده‌اند [۱۴، ۱۷]. ویتامین D به طور عمده در پوست توسط تبدیل فتوشیمیایی ۷-دهیدروکولسترول به ویتامین D<sub>3</sub> (کوله کلسیفرول) تولید می‌شود و با هیدروکسیلاسیون متوالی در کبد و کلیه‌ها به فرم فعال خود یعنی 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> یا کلسیتریول تبدیل می‌گردد و سرانجام با اتصال به گیرنده‌های خود اثرات فیزیولوژیک گسترده‌ای را در سلول‌ها اعمال می‌کند. به عبارتی امروزه از ویتامین D به جای یک ویتامین بعنوان یک پره هورمون یاد می‌شود که با دارا بودن

میوکارد بود. با توجه به اینکه جهت اندازه‌گیری سایز انفارکت از رنگ‌آمیزی استفاده گردید امکان انجام مطالعه مولکولی در بافت میوکارد ۵ گروه قبل فراهم نبود لذا در ۵ گروه دیگر از حیوانات، مشابه گروه‌های قبل تیمار با دارو و انجام جراحی صورت گرفت با این تفاوت که در پایان رپرفیوژن بافت ایسکمیک بطن چپ جهت انجام مطالعه مولکولی جمع‌آوری گردید (n=5).

با توجه به اینکه در تمام گروه‌های مورد آزمایش (گروه‌های مربوط به اندازه‌گیری سایز انفارکت و گروه‌های مولکولی) ثبت فشار خون و ECG صورت گرفت، در واقع داده‌های فشار خون، ضربان قلب و شدت آریتمی‌های دوره رپرفیوژن در گروه‌های با n=15 مورد آنالیز قرار گرفته است.

اندازه‌گیری سطح سرمی ویتامین D<sub>3</sub> و کلسیم: به منظور اطمینان از عدم تغییر قابل توجه در سطح سرمی ویتامین D و کلسیم در گروه دریافت کننده ویتامین، در پایان رپرفیوژن یک نمونه خون از حیوان گرفته بعد از سانتریفیوژ، سرم را جدا نموده میزان ویتامین D<sub>3</sub> سرم توسط کیت الیزا (Diasource Belgium) و نیز سطح کلسیم توسط کیت مخصوص (شرکت درمان کوا-ایران) به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد.

القای مدل ایسکمی - رپرفیوژن میوکارد: رت‌ها با تزریق داخل صفاقی پنتوباریتال سدیم (۵۰ mg/kg) بیهوش می‌شدند. الکترودهای الکتروکاردیوگرافی به صورت سنجاق‌های زیر جلدی به حیوان وصل می‌شدند تا اشتقاق دوم الکتروکاردیوگرام ثبت گردد. سپس نای کانوله و به ونتیلاتور (تعداد تنفس ۸۰ بار در دقیقه و حجم یک میلی لیتر به ازاء هر ۱۰۰ گرم وزن بدن) متصل می‌گردید (هاروارد-آمریکا). در ادامه شریان کاروتید چپ جهت ثبت فشار خون کانوله می‌شد تا فشار خون به‌طور مستقیم و مداوم ثبت گردد. سپس قفسه سینه در فضای بین دنده‌ای چهارم و پنجم باز شده و پس از پاره کردن پریکارد، نخ ۵-۰ سیلک از زیر شریان LAD عبور داده می‌شد بعد از گذشت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه که حیوان شرایط پایدار خود را مجدداً به دست می‌آورد مرحله بعدی یعنی ایسکمی شروع می‌گردید بدین صورت که دو سر نخ عبور داده شده از زیر رگ از درون یک تیوب کشیده و با تیوب دیگر فیکس می‌شد. انسداد شریان LAD به عنوان فاز ایسکمی به

مدت ۱۲۰ دقیقه مدل ایسکمی رپرفیوژن در حیوانات القا گردید. پس از تزریق اوانس بلو و رنگ‌آمیزی با تترازولیوم کلراید (TTC) اندازه ناحیه انفارکت تعیین گردید.

۲- گروه لوزارتان + ایسکمی رپرفیوژن (Los+IR): این گروه از حیوانات لوزارتان (داروپخش-ایران) را با دوز ۱۰ mg/kg/day به مدت ۱۴ روز به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. سرم فیزیولوژیک بعنوان حلال لوزارتان مورد استفاده قرار گرفت. مطالعات قبل از جمله مطالعه پایلوت گروه ما نشان داد که مصرف لوزارتان با دوز مذکور که دوز نسبتاً پایین لوزارتان محسوب می‌گردد کاهش قابل توجهی در فشار خون حیوانات ایجاد نمی‌کند در مطالعه قبل گروه ما لوزارتان با دوز ۱۰ استفاده شده بود که به مدت ۱ هفته اثر قابل توجهی در کاهش آسیب ایسکمی نداشت اما افزایش دوره درمان به ۴ هفته اثرات آنتی ایسکمی این دارو را آشکار نمود لذا در مطالعه حاضر دارو با دوره درمان کوتاه‌تری استفاده گردید تا بتوانیم اثرات سینرژسم احتمالی را بهتر مورد ارزیابی قرار دهیم.

۳- گروه ویتامین D<sub>3</sub> + ایسکمی رپرفیوژن (VitD+IR): حیوانات این گروه ویتامین D<sub>3</sub> (1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> داروپخش-ایران) را به دوز 0.1 μg/kg/day به مدت ۱۴ روز و با روش تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. سپس با انسداد شریان و بازکردن مجدد شریان مدل ایسکمی رپرفیوژن القا گردید.

۴- گروه شم دارو (Pro+IR): این گروه از حیوانات Propylene glycol را بعنوان حلال ویتامین D دریافت و سپس تحت ایسکمی رپرفیوژن قرار گرفتند.

۵- گروه لوزارتان + ویتامین D<sub>3</sub> + ایسکمی رپرفیوژن (Los+VitD+IR): حیوانات این گروه لوزارتان و ویتامین D را به مدت ۱۴ روز دریافت کرده و سپس تحت القای ایسکمی رپرفیوژن میوکارد قرار گرفتند.

به منظور اطمینان از عدم تغییر قابل توجه در سطح سرمی ویتامین D<sub>3</sub> و کلسیم در گروه دریافت کننده ویتامین، در پایان رپرفیوژن نمونه خون از حیوان گرفته، بعد از سانتریفیوژ سرم را جداسازی نموده و میزان ویتامین D<sub>3</sub> سرم اندازه‌گیری شد.

هدف دیگر از این مطالعه بررسی اثر لوزارتان و ویتامین بر میزان نسخه‌برداری ژن‌های survival در بافت ایسکمیک

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Real time RT-PCR

Gene	Primer Sequences
<b>B-actin</b>	F: 5'-AACCCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT-3' R: 5'-ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG-3'
<b>Trx-1</b>	F: 5'-TTCCTTGAAGTAGACGTGGATGAC-3' R: 5'-AGAGAACTCCCCAACCTTTTGAC-3'
<b>Bcl-2</b>	F: 5'-GATTGTGGCCTTCTTTGAGT-3' R: 5'-ATAGTTCCACAA AGGCATCC-3'
<b>Catalase</b>	F: 5'-CTGACGTCCACCCTGACT -3' R: 5'-GGCAGCTATGTGAGAGCC-3'

ضربانات زودرس بطنی منفرد (PVC)<sup>۱</sup>، بای ژمینی، سالووس و تکیکاردی بطنی مشخص و تعداد هر کدام شمارش شد. هر کمپلکس QRS زودرس قابل تشخیص و مجزا بعنوان یک PVC شناخته شد. تعداد ۴ یا بیش از ۴ کمپلکس PVC پشت سر هم یک اپیزود تکیکاردی بطنی در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که در مدل ایسکمی رپرفیوژن استفاده شده در این مطالعه با برنامه زمانی ۳۰ دقیقه ایسکمی و ۱۲۰ دقیقه در موش صحرایی در زمان ایسکمی آریتمی قابل توجهی مشاهده نمی‌گردد و تنها بعد از بستن شریان st elevation مشاهده می‌گردد اما با شروع رپرفیوژن تعداد زیادی آریتمی در ECG ظاهر می‌گردد. بنابراین آریتمی‌های مورد مطالعه مربوط به دوره رپرفیوژن می‌باشند.

استخراج RNA و انجام RT-PCR: ابتدا بافت از فریزر خارج و بلافاصله توسط بافر RLT موجود در کیت استخراج RNA هموژنیزه گردید. RNA کل طبق دستورالعمل کیت استخراج RNA مخصوص بافت‌های فیروز (کیاژن-آمریکا) استخراج گردید. RNA تهیه شده بلافاصله برای سنتز cDNA استفاده شده و یا در فریزر  $-80^{\circ}\text{C}$  نگه‌داری گردید. جهت محاسبه غلظت RNA در روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه نانودراپ جذب نوری رقت معینی از نمونه در طول موج ۲۶۰ نانومتر قرائت گردید. جهت تهیه cDNA واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RevertAid<sup>TM</sup>-MuLVReverse transcriptas صورت گرفت (فرمنتاز) پس از بهینه سازی واکنش PCR، cDNA مربوط به گروه‌های مورد آزمایش توسط MasterMix (تاکارا) حاوی سایبرگرین و پرایمرهای اختصاصی تحت واکنش

مدت ۳۰ دقیقه ادامه و سپس ۱۲۰ دقیقه رپرفیوژن صورت می‌گرفت. در پایان رپرفیوژن، مجدداً شریان LAD بسته شده و یک میلی لیتر اوانس بلو ۵٪/۵٪ از طریق دهلیز به داخل قلب تزریق می‌شد. در نهایت با شکافتن قفسه سینه به سرعت قلب جدا و برداشته می‌شد. در گروه‌های هدف اندازه‌گیری ناحیه انفارکت طبق دستورالعمل زیر اقدام می‌گردید و در گروه‌های هدف بررسی سطح mRNA پس از شستشو با محلول PBS سرد بلافاصله ناحیه فاقد رنگ آبی اوانس بلو به عنوان ناحیه ایسکمی جدا و به نیتروژن مایع منتقل می‌گردید [۱۸].

اندازه‌گیری ناحیه انفارکت: ۲ ساعت پس از فریز شدن، قلب که در قالب مخصوص برش قلب قرار گرفته بود به برش‌های دو میلی‌متری از نوک تا قاعده برش داده شد. برش‌ها به مدت ۲۰ الی ۳۰ دقیقه در محلول حاوی TTC یک درصد و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. TTC (سیگما-آمریکا) در بافت‌های زنده با NADH و آنزیم دهیدروناز واکنش می‌دهد و باعث رنگ گرفتن بافت می‌شود. سلول‌های مرده به دلیل پارگی غشای سلول این کوفاکتور و آنزیم را از دست داده و رنگ نمی‌گیرند. نواحی سالم که دچار مرگ سلولی نمی‌شوند به رنگ قرمز و نواحی انفارکت شده به رنگ روشن در می‌آیند. برش‌ها روی اسکنر قرار داده شدند و هر دو طرفشان با دقت ۳۰۰ dpi اسکن شد. با استفاده از نرم‌افزار Image Tool مساحت نواحی ایسکمیک و انفارکت هر دو سطح برشها اندازه‌گیری شد و میانگین آنها لحاظ گردید. در پایان اندازه انفارکت به صورت درصدی از ناحیه ایسکمیک گزارش گردید.

بررسی آریتمی‌ها: تعریف و دسته بندی آریتمی های زمان رپرفیوژن بر اساس مدل Lambeth انجام شد [۳] با استفاده از الکتروکاردیوگرام ثبت شده در رپرفیوژن، اپی زود و شیوع

1. Premature ventricular complex (PVC)

**جدول ۲.** غلظت کلسیم و ویتامین D در سرم رتهای گروه ایسکمی رپرفیوژن (IR) و گروه تیمار شده با ویتامین D<sub>3</sub> (VitD+IR). داده‌ها به صورت Mean±S.D. نشان داده شده‌اند.

Groups	Serum concentration of Vitamin D(ng/mL)	Serum concentration of Calcium(mg/dL)
IR	57.42±8.4	9.16±0.6
VitD+IR	63.39±6.1	9.01±1.1

**جدول ۳.** تغییرات فشار خون متوسط شریانی (MAP) و ضربان قلب قبل از بستن شریان LAD (فشار خون پایه)، ۴ دقیقه بعد از بستن شریان (فشار خون ایسکمی) و در پایان رپرفیوژن (فشار خون زمان نمونه‌برداری) در گروه‌های ایسکمی رپرفیوژن بدون درمان (IR) و گروه‌های تیمار شده با ویتامین D<sub>3</sub> (VitD) Propylene glycol، بعنوان حلال ویتامین (Pro) و لوزارتان (Los). داده‌ها به صورت Mean±S.D. نشان داده شده‌اند. \*P<0.05 و \*\*P<0.01 در مقایسه با فشار خون پایه در همان گروه سنجیده شده است. (n=15)

Groups	Baseline		4 min after LAD occlusion		End of reperfusion	
	MAP	HR	MAP	HR	MAP	HR
IR	113 ± 10.2	387 ± 17	76.1 ± 8.4*	419 ± 23	109 ± 7.6	403 ± 24
Vit. D + IR	118 ± 8.7	372 ± 21	89± 10.6	390 ± 31	99.2 ± 10.1	396± 20
Pro + IR	109±9.3	393 ± 26	86.8 ± 11.2	408 ± 19	101.8 ± 11.7	379 ± 28
Los + IR	116 ± 11.2	369 ± 29	81.1 ± 13.7**	374 ± 25	104 ± 13.2	386 ± 31
Vit. D + Los + IR	107 ± 10.4	398 ± 31	78.2 ± 9.8*	414 ± 16	112 ± 9.8	375 ± 26

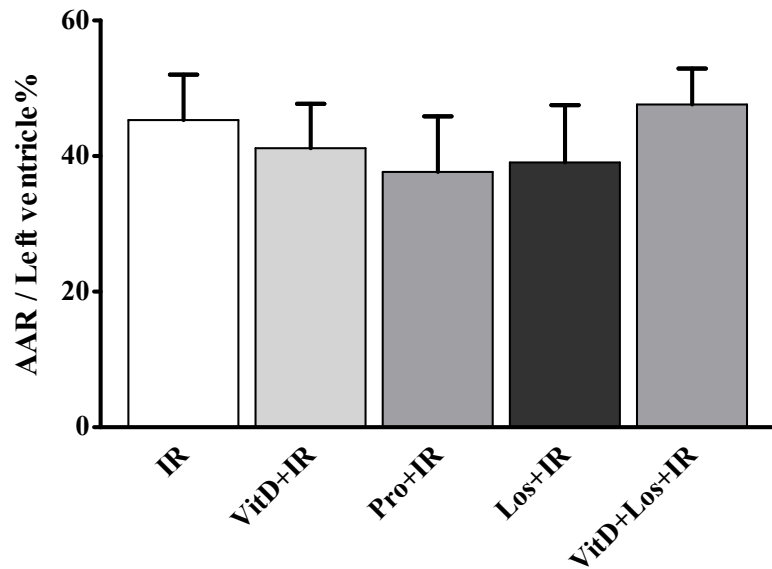
VitD+IR سطح ویتامین D<sub>3</sub> در سرم 63.39±6.1 نانوگرم در میلی لیتر و سطح کلسیم 9.01±1.1 میلی‌گرم در دسی‌لیتر است که نسبت به گروه IR اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد. تغییرات فشار خون و ضربان قلب در طی ایسکمی رپرفیوژن در پاسخ به ویتامین D<sub>3</sub> و لوزارتان: در ابتدای آزمایش شریان کاروتید کانوله و کاتتر درون آن به ترانس‌دیوسر فشار متصل می‌گردید همچنین لیدهای ثبت الکتروکاردیوگرام نیز به اندام‌های مربوطه متصل می‌شدند بنابراین در طول آزمایش فشار خون و الکتروکاردیوگرام به طور مداوم ثبت می‌گردید. فشار خون و ضربان قلب حیوانات قبل از بستن LAD و اعمال ایسکمی به عنوان فشارخون و ضربان قلب پایه در نظر گرفته می‌شود. بلافاصله بعد از بستن شریان، فشار خون به طور ناگهانی کاهش می‌یافت. افت فشار تا ۱۰ الی ۱۵ دقیقه بعد از انسداد ادامه و مجدداً شروع به افزایش می‌کرد. در این مطالعه فشار خون حیوانات ۴ دقیقه بعد از بستن LAD بعنوان فشار خون بعد از ایسکمی و فشار خون در پایان رپرفیوژن بعنوان فشار پایانی یا فشار زمان sampling در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که در طی مرحله ایسکمی فشار خون در هر گروه نسبت به سطح پایه کاهش می‌یابد. اما اختلاف معنی‌داری در میزان فشار خون و ضربان قلب در

RT-PCR قرار گرفتند. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. ژن بتا-اکتین را بعنوان رفرانس در نظر گرفته و محاسبه نسبت بیان ژن هدف به ژن رفرانس مطابق روش Pfaffle صورت گرفت.

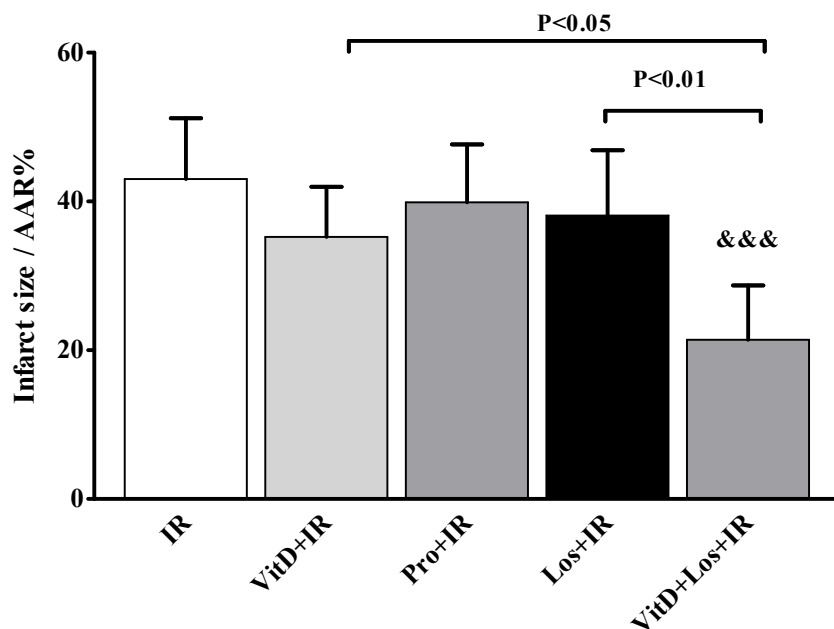
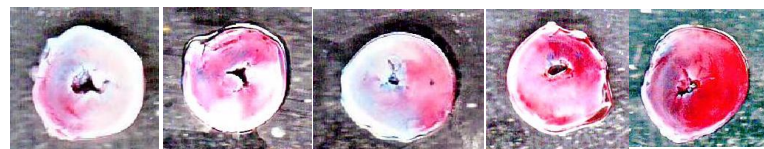
**آنالیز آماری:** پارامترهای همودینامیک در هر گروه با آزمون آماری paired t-test مورد آنالیز قرار گرفت. مقایسه مختلف توسط تست Dunn's multiple و Kruskal-Wallis و comparison post-test صورت گرفت. سطح نسخه‌برداری ژن‌های هدف در بین گروه‌های مختلف با آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست متعاقب Tukey مقایسه گردید. داده‌ها بر اساس Mean ± SD. نشان داده شده‌اند. P<0.05 ملاک معنی‌داری در نظر گرفته شده است.

## یافته‌ها

تغییرات سطح سرمی ویتامین D<sub>3</sub> و کلسیم در پاسخ به مصرف ویتامین: نتیجه اندازه‌گیری ویتامین D<sub>3</sub> و کلسیم در سرم موش‌های گروه IR و گروه VitD+IR که در جدول ۲ نشان داده شده است حاکی از آن است که در گروه



A



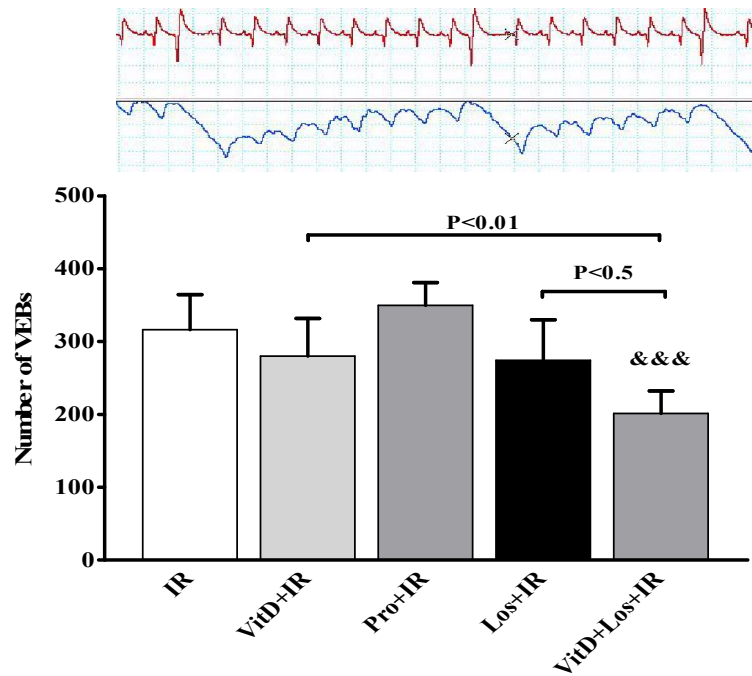
B

**شکل ۱-** نسبت اندازه ناحیه ایسکمی یا ناحیه در معرض خطر (AAR) به بطن چپ در گروههای آزمایش (A). بعد از تزریق رنگ اوانس بلو به داخل دهلیز ناحیه فاقد رنگ قلب اندازه‌گیری و بعنوان ناحیه ایسکمی در نظر گرفته شده است. بعد از قرارگیری برش‌های قلب در محلول TTC ناحیه سفید رنگ بعنوان ناحیه انفارکت قابل تشخیص و اندازه‌گیری می‌باشد که به صورت درصد نسبت به ناحیه ایسکمی در گروههای ایسکمی رپرفیوژن بدون درمان (IR) و گروههای تیمار شده با ویتامین D<sub>3</sub> (VitD)، Propylene glycol بعنوان حلال ویتامین (Pro) و لوزارتان (Los) گزارش گردیده است (B). داده‌ها به صورت Mean±S.D. نشان داده شده‌اند.  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه IR سنجیده شده است. (n=10)

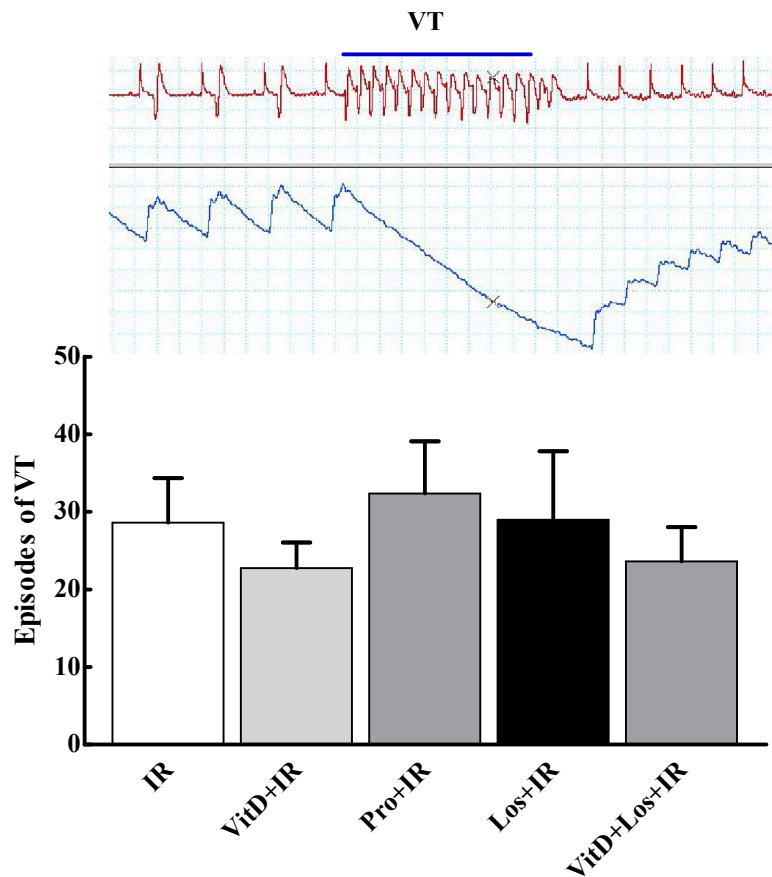
چپ: همانطور که اشاره شد بعد از تزریق اوانس بلو ناحیه فاقد رنگ بعنوان ناحیه ایسکمی در نظر گرفته می‌شود نتایج حاصل از اندازه‌گیری این ناحیه نسبت به مساحت بطن چپ در

شرایط پایه، ایسکمی و رپرفیوژن بین گروههای مختلف تحت مطالعه مشاهده نگردید (جدول ۳).

اثر ویتامین D<sub>3</sub> و لوزارتان بر اندازه ناحیه انفارکت بطن

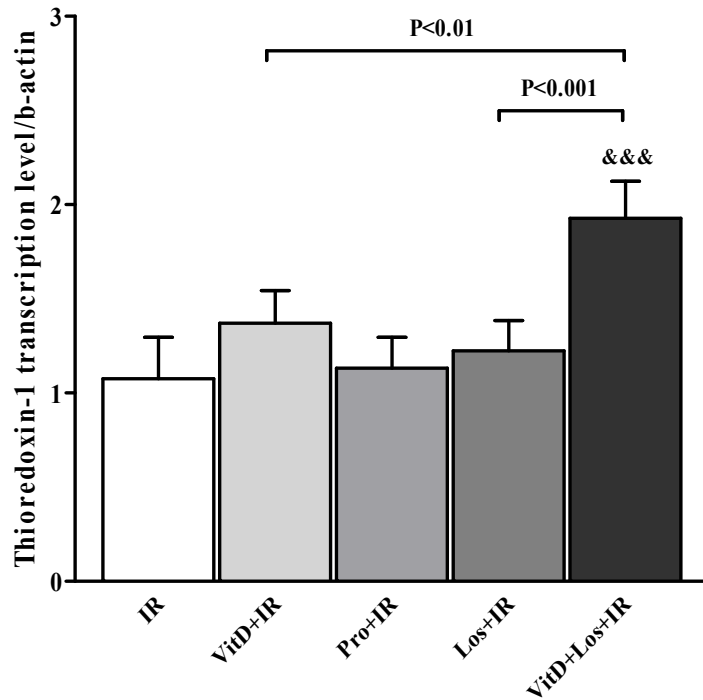


**شکل ۲-** تعداد کل ضربانات نابجای بطنی (VEBs) طی دوره رپر فیوژن در موشهای تحت ایسکمی رپر فیوژن بدون درمان (IR) و گروههای تیمار شده با ویتامین (VitD)، Propylene glycol بعنوان حلال ویتامین (Pro) و لوزارتان (Los)، داده‌ها به صورت Mean±S.D. نشان داده شده‌اند.  $P<0.001$  در مقایسه با گروه IR سنجیده شده است. (n=15)

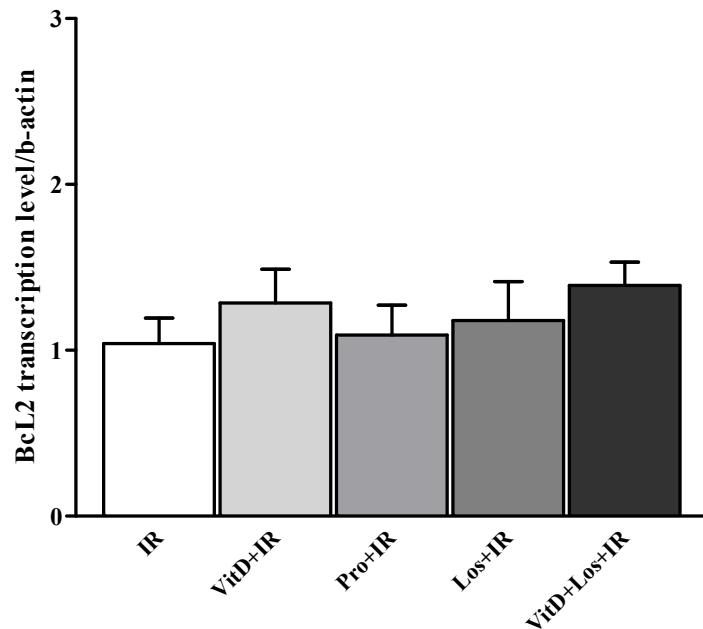


**شکل ۳-** تعداد وقوع تاکیکاردی بطنی (VT) طی دوره رپر فیوژن در موشهای تحت ایسکمی رپر فیوژن بدون درمان (IR) و گروههای تیمار شده با ویتامین D<sub>3</sub> (VitD)، Propylene glycol بعنوان حلال ویتامین (Pro) و لوزارتان (Los)، داده‌ها به صورت Mean±S.D. نشان داده شده‌اند. (n=15)





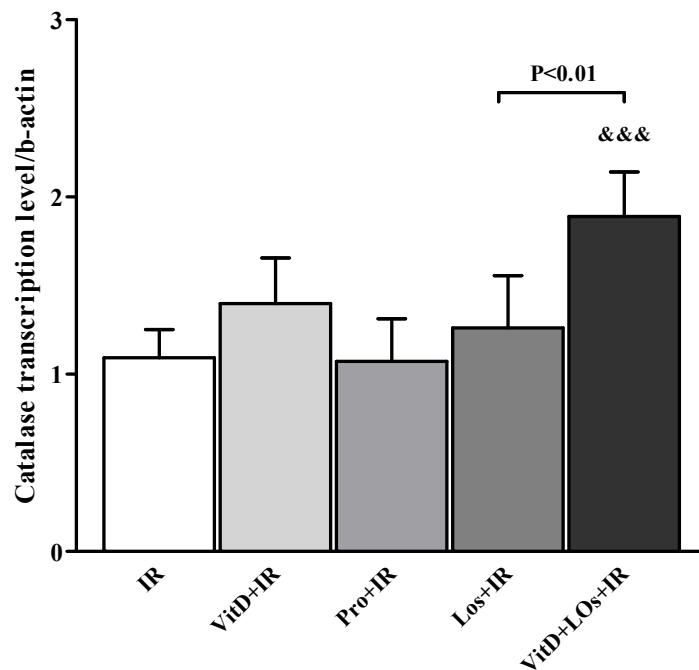
4A



4B

گروه‌های مختلف آزمایش در شکل A-1 نشان داده شده و حاکی از آن است که در بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود ندارد که نشان‌دهنده عدم تفاوت در الگوی ایسکمی در گروه‌های مختلف می‌باشد. رنگ‌آمیزی با TTC ناحیه انفارکت را مشخص می‌سازد همانگونه که در شکل B-1 نشان داده شده است درصد اندازه ناحیه انفارکت نسبت به ناحیه ایسکمی در گروه ایسکمی رپرفیوژن  $43 \pm 8.1\%$  است. در گروه‌های Los+IR و VitD+IR اندازه ناحیه انفارکت به ترتیب  $35.2 \pm 6.7\%$  و  $38.1 \pm 8.8\%$  بود که کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان نمی‌دهد. این در حالیست که در گروه Los+VitD+IR شاهد کاهش معنی‌دار اندازه ناحیه انفارکت در مقایسه با گروه IR بودیم. ( $P < 0.001$ ,  $21.4 \pm 7.3\%$ ) نکته جالب توجه این است که این کاهش در مقایسه با گروه‌های VitD+IR و Los+IR نیز به ترتیب با  $P < 0.05$  و  $P < 0.01$  معنی‌دار می‌باشد. اثر ویتامین D<sub>3</sub> و لوزارتان بر آریتمی‌های دوره رپرفیوژن:

گروه‌های مختلف آزمایش در شکل A-1 نشان داده شده و حاکی از آن است که در بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود ندارد که نشان‌دهنده عدم تفاوت در الگوی ایسکمی در گروه‌های مختلف می‌باشد. رنگ‌آمیزی با TTC ناحیه انفارکت را مشخص می‌سازد همانگونه که در شکل B-1 نشان داده شده است درصد اندازه ناحیه انفارکت نسبت به ناحیه ایسکمی در گروه ایسکمی رپرفیوژن  $43 \pm 8.1\%$  است. در گروه‌های Los+IR و VitD+IR اندازه ناحیه انفارکت به ترتیب  $35.2 \pm 6.7\%$  و  $38.1 \pm 8.8\%$  بود که کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان نمی‌دهد. این در حالیست که در گروه Los+VitD+IR شاهد کاهش معنی‌دار اندازه ناحیه انفارکت در مقایسه با گروه IR بودیم. ( $P < 0.001$ ,  $21.4 \pm 7.3\%$ ) نکته جالب توجه این است که این کاهش در مقایسه با گروه‌های VitD+IR و Los+IR نیز به ترتیب با  $P < 0.05$  و  $P < 0.01$  معنی‌دار می‌باشد. اثر ویتامین D<sub>3</sub> و لوزارتان بر آریتمی‌های دوره رپرفیوژن:



4C

شکل ۴- تغییرات سطح mRNA فاکتورهای تیوردوکسین ۱، Bcl2 و کاتالاز در ناحیه ایسکمی بطن چپ موشهای تحت ایسکمی رپرفیوژن بدون درمان (IR) و گروههای بیمار شده با ویتامین (VitD)، Propylene glycol بعنوان حلال ویتامین (Pro) و لوزارتان (Los)، دادهها به صورت Mean±S.D. نشان داده شدهاند.  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه IR سنجیده شده است. (n=5)

Los+VitD+IR سطح mRNA تیوردوکسین به  $93 \pm 19\%$  افزایش یافت که نسبت به گروههای IR و Los+IR با  $P < 0.001$  و نسبت به گروه VitD+IR با  $P < 0.01$  افزایش معنی داری را نشان می‌دهد.

مصرف ویتامین  $D_3$  و لوزارتان به صورت مجزا و مصرف توأم اثری بر معنی داری بر سطح mRNA Bcl2 در میوکارد ایسکمیک نداشت. این در حالیست که سطح mRNA آنزیم کاتالاز در گروه Los+VitD+IR به میزان  $89 \pm 25\%$  افزایش داشت که نسبت به گروههای IR ( $P < 0.001$ ) و Los+IR ( $P < 0.01$ ) معنی دار می‌باشد (شکل ۴).

## بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مصرف توأم دوز غیر موثر بر ایسکمی لوزارتان و ویتامین  $D_3$  می‌تواند با افزایش فاکتورهای survival، قلب را در برابر آسیب ناشی از ایسکمی رپرفیوژن میوکارد محافظت نموده و اندازه ناحیه انفارکت و شدت آریتمی‌های دوره رپرفیوژن را کاهش دهد. مطالعه قبل گروه ما نشان داد که استفاده از لوزارتان با دوز  $10\text{mg/kg/day}$  به مدت ۱ هفته در موش‌های صحرایی

بررسی الکتروکاردیوگرام ثبت شده از حیوانات حاکی از ظهور تعداد زیادی آریتمی قلبی در شروع رپرفیوژن است که تجزیه و تحلیل آنها طبق مدل لامبس نشان می‌دهد که تعداد ضربانات زودرس بطنی در گروه VitD+IR حدود  $280 \pm 51$  و در گروه Los+IR این تعداد  $274 \pm 54$  ضربان می‌باشد که در هیچ‌یک از گروههای مذکور این کاهش معنی دار نمی‌باشد. بررسی آریتمی‌ها در گروه Los+VitD+IR نشان میدهد که تعداد ضربانات زودرس بطنی به  $201 \pm 32$  ضربه کاهش یافته است که در مقایسه با گروه IR کاهش معنی داری را نشان می‌دهد ( $P < 0.001$ ). کاهش VEBs در این گروه نسبت به گروههای Los+IR و VitD+IR نیز به ترتیب با  $P < 0.01$  و  $P < 0.05$  معنی دار می‌باشد (شکل ۲). شمارش تعداد اپیزودهای تاکی کاردی بطنی در گروههای دارو کاهش معنی داری نسبت به گروه IR نشان نداد (شکل ۳).

اثر ویتامین  $D_3$  و لوزارتان بر میزان نسخه برداری ژن‌های تیوردوکسین، کاتالاز و Bcl2: بررسی میزان نسخه برداری از فاکتورهای survival در پاسخ به ویتامین D و لوزارتان نشان می‌دهد که در گروه VitD+IR و گروه Los+IR سطح mRNA تیوردوکسین ۱ نسبت به گروه IR افزایش معنی داری نشان نمی‌دهد در حالیکه در گروه

همچنان ناشناخته‌اند اما بر اساس مطالعات گذشته، مهار سیستم رنین آنژیوتانسین یکی از تارگت‌های اصلی این ویتامین است. ارتباط معکوس بین سطح سرمی ویتامین و فعالیت رنین پلاسما نشان داده شده است به طوری که ویتامین D بعنوان یک negative regulator سیستم رنین آنژیوتانسین معرفی شده است [۲۷، ۲۹]. در موش‌های فاقد گیرنده ویتامین هیپرتانسین و هیپرتروفی میوکارد به واسطه افزایش بیان رنین، آنژیوتانسین و آلدوسترون ایجاد می‌گردد [۲۶]. لوزارتان نیز یک مهار کننده گیرنده مخرب AT1 آنژیوتانسین است. بنابراین مهار سیستم رنین آنژیوتانسین می‌تواند از مکانیسم‌های مشترک عملکرد لوزارتان و ویتامین D<sub>3</sub> باشد. یکی از عواملی که بهره‌مندی کامل از ترکیبات مهارکننده سیستم رنین آنژیوتانسین و از جمله لوزارتان را محدود می‌سازد افزایش جبرانی تولید رنین در کلیه‌ها و بافت میوکارد است که در نهایت تولید Ang II را افزایش می‌دهد. از طرفی مطالعات نشان داده است که ویتامین D<sub>3</sub> سنتز رنین را کاهش می‌دهد [۲۷]. دو مطالعه اخیر بر روی هیپرتروفی میوکارد و نفروپاتی دیابتیک نشان دادند که استفاده توأم ویتامین D<sub>3</sub> و لوزارتان می‌تواند با پیشگیری از افزایش رنین اثرات پروتکتیو قابل توجهی اعمال نماید. به طوری که مصرف توأم آنالوگ ویتامین D<sub>3</sub> و لوزارتان سطح پپتیدهای ناتیوریتیک دهلیزی و مغزی (ANP و BNP) را به طور قابل توجهی کاهش و کسر تخلیه را افزایش داد. لازم به ذکر است که در مطالعه مذکور لوزارتان با دوز 30 mg/kg/day به مدت ۲ ماه (در آب آشامیدنی) مورد استفاده قرار گرفت. همچنین بیان رنین در گروه لوزارتان افزایش یافته بود که با مصرف توأم هر دو دارو کاهش یافت [۹، ۲۸].

در مطالعه حاضر مصرف لوزارتان و ویتامین D<sub>3</sub> وقوع آریتمی‌های دوره رپرفیوژن را به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش داد. یکی از عوامل مهم در وقوع آریتمی‌ها برهم خوردن هموستاز کلسیم در سلول‌های قلبی است. مطالعات گذشته نشان داده است که ویتامین D<sub>3</sub> با اثرات غیر ژنومی و ژنومی عملکرد کانال‌های کلسیمی را تحت تاثیر قرار می‌دهد بنابراین کاهش وقوع آریتمی‌های دوره رپرفیوژن توسط لوزارتان و ویتامین D<sub>3</sub> می‌تواند ناشی از اثرات سینرژیک احتمالی آنها در تنظیم محتوای کلسیم در کاردیومیوسیت‌ها

اثرات کاردیوپروتکتیو قابل ملاحظه‌ای در قلب اعمال نمی‌کند و بروز اثرات آنتی‌ایسکمیک دوز مذکور مستلزم افزایش دوره درمان به حداقل ۴ هفته می‌باشد. در خصوص ویتامین D<sub>3</sub> نیز مطالعه اخیر گروه ما نشان داد استفاده از ویتامین D<sub>3</sub> با دوز مذکور به مدت ۱۴ روز کاهش معنی‌داری در اندازه ناحیه انفارکت ایجاد نمی‌کند. لذا در مطالعه مذکور از دوزهای نسبتاً کم و غیر موثر دارو استفاده شد تا بهتر بتوان در خصوص اثرات سینرژیک احتمالی آنها قضاوت نمود.

یکی دیگر از معیارهای انتخاب دوزهای مذکور عدم تاثیر دارو بر فشارخون حیوان بود. مطالعه قبل نشان داده بود که لوزارتان با دوز مذکور فشار خون شریانی را به طور معنی‌دار کاهش نمی‌دهد. در خصوص ویتامین D<sub>3</sub> نیز مطالعه Wong و همکارانش نشان داد که مصرف ویتامین D<sub>3</sub> با دوز ۱۰ نانوگرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در حیوانات سالم فشارخون را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد که در مطالعه حاضر نیز مورد تایید قرار گرفت [۲۵]. با توجه به اینکه مصرف ویتامین D<sub>3</sub> ارتباط مستقیم با سطح سرمی ویتامین و همچنین سطح سرمی کلسیم دارد به منظور اطمینان از عدم تغییر قابل توجه پارامترهای مذکور در پاسخ به مصرف ویتامین در پایان هر آزمایش نمونه سرم خون را جدا کرده و اندازه‌گیری ویتامین D<sub>3</sub> انجام گردید. همانگونه که جدول ۲ نشان می‌دهد مصرف دوز مذکور ویتامین D<sub>3</sub> افزایش قابل ملاحظه‌ای در سطح سرمی ویتامین D<sub>3</sub> و کلسیم ایجاد نکرد بنابراین دوز مورد استفاده در واقع دوز اصطلاحاً غیر کلسیمیک ویتامین D<sub>3</sub> بوده است.

در مطالعه kang و همکارانش مصرف paricalcitol به عنوان آنالوگ ویتامین D<sub>3</sub> اندازه ناحیه انفارکت را به طور قابل توجهی کاهش داد اما در این مطالعه ایسکمی به طور مزمین ایجاد گردید به طوری که اندازه ناحیه انفارکت ۴ هفته بعد از بستن شریان LAD مورد بررسی قرار گرفت بنابراین دارو نیز به مدت طولانی (۵ هفته) مورد استفاده قرار گرفت [۱]. در مطالعه ما ویتامین D<sub>3</sub> به فرم 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> با دوز و دوره درمان نسبتاً کوتاهتر مورد استفاده قرار گرفت که می‌توان عدم تاثیر آن بر اندازه ناحیه انفارکت را به دوز و دوره درمان نسبت داد.

مکانیسم‌های مسوول اثرات کاردیوپروتکتیو ویتامین D<sub>3</sub>

و کاتالاز نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. تیوردوکسین ۱ یکی از فاکتورهای survival مهم داخل سلول‌های قلبی است که باعث افزایش مقاومت کاردیومیوسیت‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو و از جمله ایسکمی می‌گردد [۴]. Bcl-2 یکی از تنظیم کننده‌های اصلی مسیر میتوکندریایی آپوپتوز در قلب است که با سرکوب فاکتورهای آپوپتوتیک مانند P53 کاردیومیوسیت‌ها را در برابر آپوپتوز محافظت می‌نماید. موش‌های Bcl2-overexpressed نیز بعد از القای ایسکمی دارای تعداد سلول‌های آپوپتوتیک کمتر بوده و اندازه ناحیه انفارکت ناشی از ایسکمی در آنها کوچکتر است [۲، ۸]. کاتالاز نیز یک آنزیم کاملاً شناخته شده است که از طریق سم‌زدایی H2O2 مقاومت قلب را به آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو افزایش می‌دهد. در مطالعه حاضر مصرف توام ویتامین D<sub>3</sub> و لوزارتان بیان Bcl2 را در قلب تغییر نداد اما بیان کاتالاز و تیوردوکسین ۱ در بافت ایسکمیک قلب به طور معنی‌داری در پاسخ به مصرف توام داروهای مذکور افزایش یافت که بیانگر فعال شدن مسیرهای حفاظتی در کاردیومیوسیت‌ها توسط ویتامین D<sub>3</sub> و لوزارتان است به عبارتی افزایش تولید فاکتورهای حفظ حیات سلول مانند کاتالاز و تیوردوکسین ۱ می‌تواند از مکانیسم‌های بروز اثرات ضد ایسکمی ویتامین D<sub>3</sub> و لوزارتان در قلب باشد.

از یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که می‌توان با استفاده از دوز نسبتاً پایین و غیر موثر بر فشار خون ویتامین D<sub>3</sub> و لوزارتان قلب را در برابر آسیب ایسکمی رپرفیوژن محافظت نموده و اندازه ناحیه انفارکت و شدت آریتمی‌های قلبی ناشی از رپرفیوژن را کاهش داد. شناسایی مکانیسم‌های مولکولی مشترک بین ویتامین D<sub>3</sub> و لوزارتان مستلزم بررسی‌های دقیق‌تر در این زمینه است.

### سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی می‌باشد. نویسندگان این مقاله نهایت سپاسگزاری خود را از جناب آقای دکتر نقدی جهت تامین داروی لوزارتان و ویتامین D<sub>3</sub> اعلام می‌دارند.

باشد که اثبات این فرضیه مستلزم انجام مطالعات دقیق‌تر در این زمینه است. برخی مطالعات به اثر غیر مستقیم ویتامین بر قلب از طریق تنظیم کلسیم اشاره کرده و بر این باورند که ویتامین D<sub>3</sub> با تقویت عملکرد غده پاراتیروئید و افزایش سطح سرمی کلسیم قدرت انقباض قلب را افزایش می‌دهد [۲۰]. در مطالعه حاضر تغییر معنی‌داری در سطح سرمی کلسیم مشاهده نشد بنابراین به نظر می‌رسد اثرات مستقیم ویتامین بر کاردیومیوسیت‌ها نسبت به اثرات غیر مستقیم بر سطح سرمی کلسیم غالب باشد هرچند نمی‌توان قضاوتی در خصوص اثر ویتامین بر تغییرات سطح کلسیم در کاردیومیوسیت‌ها داشت.

گزارشاتی مبنی بر اثر کاهش فشار خون توسط ویتامین D<sub>3</sub> ارائه شده است. مطالعات نشان داده اند که بین سطح سرمی ویتامین و فشار خون سیستولی و دیاستولی افراد رابطه معکوس وجود دارد و در افراد مبتلا به هیپرتانسیون سطح سرمی ویتامین نسبت به افراد با فشار خون طبیعی پایین‌تر است [۱۹]. گروهی از محققان کاهش فشار خون افراد بعد از مواجه شدن با نور ماورای بنفش را نیز به افزایش تولید ویتامین D نسبت داده‌اند [۱۰]. به نظر می‌رسد مهمترین مکانیسم پیشنهاد شده برای اثر هیپوتانسیون ویتامین همچنان مهار سیستم رنین آنژیوتانسین باشد. در مطالعه ما ویتامین D<sub>3</sub> اثری بر سطح فشار خون شریانی نداشت که می‌توان علت آن را دوز نسبتاً پایین ویتامین دانست. ارتباط بین ویتامین D و شیوع بیماری‌های عروق کرونر نیز بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است ویتامین D ریسک فاکتورهای ابتلا به تنگی عروق کرونر مانند دیابت و هیپرتانسیون را تشدید می‌کند اما از طرفی با اثر مستقیم بر اندوتلیوم رگ نیز کلسیفیکاسیون رگ‌های کرونر را کاهش داده و در نهایت احتمال وقوع ایسکمی میوکارد را کاهش می‌دهد [۲۳، ۳۰].

با توجه به اینکه در مطالعه حاضر مصرف همزمان لوزارتان و ویتامین D<sub>3</sub> اثری بر پارامترهای همودینامیکی شامل فشارخون و ضربان قلب نداشت این احتمال تقویت می‌گردد که مصرف لوزارتان و ویتامین D با اثر مستقیم بر کاردیومیوسیت‌ها و فعال کردن مسیرهای survival، سلول‌های قلبی را در برابر آسیب ایسکمیک محافظت نماید. لذا در این مطالعه سطح بیان ژن‌های تیوردوکسین ۱، BCL2

## References

- [1] Bae S, Singh S S, Yu H, Lee J Y, Cho B R, Kang P M, Vitamin d signaling pathway plays an important role in the development of heart failure after myocardial infarction. *J Appl Physiol* 114 (2013) 979-87.
- [2] Chen Z, Chua C C, Ho Y S, Hamdy R C, Chua B H, Overexpression of bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial i/r injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 (2001) H2313-20.
- [3] Curtis M J, Hancox J C, Farkas A, Wainwright C L, Stables C L, Saint D A, Clements-Jewery H, Lambiase P D, Billman G E, Janse M J, Pugsley M K, Ng G A, Roden D M, Camm A J, Walker M J, The lambeth conventions (ii): Guidelines for the study of animal and human ventricular and supraventricular arrhythmias. *Pharmacol Ther* 139 (2013) 213-48.
- [4] Das DK, Thioredoxin regulation of ischemic preconditioning. *Antioxid Redox Signal* 6 (2004) 405-12.
- [5] de Cavanagh E M, Inserra F, Ferder L, Angiotensin ii blockade: A strategy to slow ageing by protecting mitochondria? *Cardiovasc Res* 89 (2011) 31-40.
- [6] DeLuca H F, Overview of general physiologic features and functions of vitamin d. *Am J Clin Nutr* 80 (2004) 1689S-96S.
- [7] Griendling K K, Ushio-Fukai M, Reactive oxygen species as mediators of angiotensin ii signaling. *Regul Pept* 91 (2000) 21-7.
- [8] Gustafsson A B, Gottlieb R A, Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 292 (2007) C45-51.
- [9] Kong J, Kim G H, Wei M, Sun T, Li G, Liu S Q, Li X, Bhan I, Zhao Q, Thadhani R, Li Y C, Therapeutic effects of vitamin d analogs on cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Am J Pathol* 177 (2010) 622-31.
- [10] Krause R, Buhning M, Hopfenmuller W, Holick M F, Sharma A M, Ultraviolet b and blood pressure. *Lancet* 352 (1998) 709-10.
- [11] Larkin J E, Frank B C, Gaspard R M, Duka I, Gavras H, Quackenbush J, Cardiac transcriptional response to acute and chronic angiotensin ii treatments. *Physiol Genomics* 18 (2004) 152-66.
- [12] Matsuhisa S, Otani H, Okazaki T, Yamashita K, Akita Y, Sato D, Moriguchi A, Imamura H, Iwasaka T, Angiotensin ii type 1 receptor blocker preserves tolerance to ischemia-reperfusion injury in dahl salt-sensitive rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294 (2008) H2473-9.
- [13] Nibbelink K A, Tishkoff D X, Hershey S D, Rahman A, Simpson R U, 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin d<sub>3</sub> actions on cell proliferation, size, gene expression, and receptor localization, in the h1-1 cardiac myocyte. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103 (2007) 533-7.
- [14] Norman P E, Powell J T, Vitamin d and cardiovascular disease. *Circ Res* 114 (2014) 379-93.
- [15] Omura T, Yoshiyama M, Ishikura F, Kobayashi H, Takeuchi K, Beppu S, Yoshikawa J, Myocardial ischemia activates the jak-stat pathway through angiotensin ii signaling in in vivo myocardium of rats. *J Mol Cell Cardiol* 33 (2001) 307-16.
- [16] Przybylski R, McCune S, Hollis B, Simpson R U, Vitamin d deficiency in the spontaneously hypertensive heart failure [shhf] prone rat. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20 (2010) 641-6.
- [17] Reddy Vanga S, Good M, Howard P A, Vacek J L, Role of vitamin d in cardiovascular health. *Am J Cardiol* 106 (2010) 798-805.
- [18] Safari F, Hajizadeh S, Shekarforoush S, Bayat G, Foadoddini M, Khoshbaten A, Influence of ramiprilat and losartan on ischemia reperfusion injury in rat hearts. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 13 (2012) 29-35.
- [19] Scragg R, Sowers M, Bell C, Serum 25-hydroxyvitamin d, ethnicity, and blood pressure in the third national health and nutrition examination survey. *Am J Hypertens* 20 (2007) 713-9.
- [20] Selles J, Massheimer V, Santillan G, Marinissen M J, Boland R, Effects of calcitriol and its analogues, calcipotriol (mc 903) and 20-epi-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin d<sub>3</sub> (mc 1288), on calcium influx and DNA synthesis in cultured muscle cells. *Biochem Pharmacol* 53 (1997) 1807-14.
- [21] Shan J, Resnick L M, Lewanczuk R Z, Karpinski E, Li B, Pang PK, 1,25-dihydroxyvitamin d as a cardiovascular hormone. Effects on calcium current and cytosolic free calcium in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 6 (1993) 983-8.
- [22] Simpson R U, Hershey S H, Nibbelink K A, Characterization of heart size and blood pressure in the

- vitamin d receptor knockout mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103 (2007) 521-4.
- [23] Sugden J A, Davies J I, Witham M D, Morris A D, Struthers A D, Vitamin d improves endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus and low vitamin d levels. *Diabet Med* 25 (2008) 320-5.
- [24] Wang Y, Zhu J, DeLuca H F, Where is the vitamin d receptor? *Arch Biochem Biophys* 523 (2012) 123-33.
- [25] Wong M S, Delansorne R, Man R Y, Svenningsen P, Vanhoutte P M, Chronic treatment with vitamin d lowers arterial blood pressure and reduces endothelium-dependent contractions in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299 (2010) H1226-34.
- [26] Xiang W, Kong J, Chen S, Cao L P, Qiao G, Zheng W, Liu W, Li X, Gardner DG, Li Y C, Cardiac hypertrophy in vitamin d receptor knockout mice: Role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288 (2005) E125-32.
- [27] Yuan W, Pan W, Kong J, Zheng W, Szeto F L, Wong K E, Cohen R, Klopot A, Zhang Z, Li Y C, 1,25-dihydroxyvitamin d3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic amp response element in the renin gene promoter. *J Biol Chem* 282 (2007) 29821-30.
- [28] Zhang Z, Zhang Y, Ning G, Deb D K, Kong J, Li Y C, Combination therapy with at1 blocker and vitamin d analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: Blockade of compensatory renin increase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 15896-901.
- [29] Zhou C, Lu F, Cao K, Xu D, Goltzman D, Miao D, Calcium-independent and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1α-hydroxylase knockout mice. *Kidney Int* 74 (2008) 170-9.
- [30] Zittermann A, Fischer J, Schleithoff S S, Tenderich G, Fuchs U, Koerfer R, Patients with congestive heart failure and healthy controls differ in vitamin d-associated lifestyle factors. *Int J Vitam Nutr Res* 77 (2007) 280-8.