

اثر آهن و ویتامین E بر ضخامت لایه اینتیمای شریان کاروتید خرگوش‌های نر تغذیه شده با رژیم پر کلسترول

غلامرضا دشتی^۱، محمد مردانی^۱، بهمن رشیدی^۲، سید محمد جعفر حائری^۳

^۱دانشیار آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۲استادیار آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۳دانشجوی کارشناس ارشد آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: مهم ترین عامل مرگ و میر در جوامع پیشرفته و در حال توسعه بیماری های قلبی - عروقی است. تکثیر و مهاجرت سلول های عضلانی صاف لایه مدیا به همراه چربی اکسیداسیون یافته توسط سلول های اندوتلیال در نهایت باعث افزایش ضخامت دیواره رگ می شود. از طرفی، نقش آهن در پیشبرد روند پاتوژنز آترواسکلروز به عنوان یک آتروژن به اثبات رسیده است، اما در مورد ویتامین E هنوز اختلاف نظرهایی پیرامون نقش بازدارنده آن در این روند وجود دارد. در این تحقیق اثر ویتامین E و آهن بر ضخامت مدیای شریان کاروتید خرگوش های تغذیه شده با رژیم پر کلسترول بررسی گردید.

روش بررسی: در این تحقیق تجربی، اثر آهن و ویتامین E به صورت جداگانه و ترکیبی بر ضخامت لایه اینتیمای شریان کاروتید ۳۰ خرگوش نر بررسی گردید. ابتدا خرگوش ها به مدت ۶ هفته با رژیم ۱٪ کلسترول نگهداری شدند، سپس شریان کاروتید آنها تشریح و در فرمالین ۱۰٪ فیکس شد. در ادامه، پس از انجام آمادش بافتی، برش ها تهیه و با روش E & H رنگ آمیزی شدند. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و توکی صورت گرفت ($p < 0.05$).

یافته ها: ضخامت لایه اینتیمای مدیا در گروهی که به همراه کلسترول، آهن دریافت کرده بودند نسبت به گروهی که فقط کلسترول دریافت کرده بودند، به طور معنی داری افزایش نشان داد ($p < 0.05$)، در حالی که در گروهی که ویتامین E و کلسترول دریافت کرده بودند، این ضخامت به طور معنی داری کاهش نشان داد ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: طبق نتایج به دست آمده، ویتامین E می تواند با جمع آوری رادیکال های آزاد، از افزایش ضخامت دیواره رگ در فرآیند آترواسکلروز جلوگیری کند.

کلید واژه ها: تصلب شرایین؛ مورفومتری؛ آهن، ویتامین E؛ شریان کاروتید.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: bahman_rashidi54@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۳۱

مقدمه

مهم ترین عامل مرگ و میر در جوامع پیشرفته و در حال توسعه بیماری های قلبی - عروقی است (۱، ۲). ناهنجاری های عروقی به واسطه دو مکانیسم عمده شامل تنگ یا مسدود شدن کامل مجرای رگ، چه به صورت پیشرونده مثل آترواسکلروز و چه

به طور ناگهانی مثل ترومبوز، آمبولی و اتساع یا پارگی رگ ناشی از ضعیف شدن دیواره رگ، بیماری بالینی ایجاد می کنند (۳). آترواسکلروز بیشتر از هر اختلال دیگر باعث مرگ و میر و از کارافتادگی می شود. آترواسکلروز با ضایعات انتیما به نام آتروم که پلاک های آتروما یا آترواسکلروتیک نیز نامیده

رژیم غذایی پرکلسترول، آهن و ویتامین E و ۵- رژیم غذایی معمولی (برای گروه شاهد) بود. رژیم غذایی پرکلسترول به صورت افزودن ۱gr پودر کلسترول در ۴cc روغن زیتون به هر ۱۰۰gr غذای خرگوش تهیه گردید. در پایان مدت ۶ هفته حیوانات با تزریق کتامین به میزان ۷۵mg/kg به صورت داخل وریدی بیهوش و کشته شدند، سپس بلافاصله شریان‌های کاروتید خرگوش خارج شده و در محلول سرم فیزیولوژی ۱۰٪ عمل شست و شو صورت گرفت. در ادامه، نمونه‌ها در ظروف فرمالین ۱۰٪ قرار داده شدند، سپس به ترتیب مراحل ثبوت، پروسسینگ، شفاف‌سازی، آغشتگی با پارافین و قالب‌گیری انجام گردید. از بلوک‌های پارافینی توسط میکروتوم مقاطع با ضخامت ۵μm به صورت سریال به ازای هر ۱۰۰μm از هر نمونه بافتی تهیه و با روش H & E رنگ‌آمیزی شدند. برای اندازه‌گیری ضخامت اینتیمای-مدیا از نرم‌افزار Motic Plus Image 2 استفاده گردید. ۱۵۰ داده اندازه‌گیری شده از لام‌های ۶ خرگوش در هر گروه با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه همراه آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند. $p < 0.05$ سطح معنی‌داری اختلاف‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین ضخامت لایه اینتیمای-مدیا اندازه‌گیری شده در گروه کلسترول؛ 19.38 ± 1.21 ، کلسترول همراه ویتامین E؛ 12.71 ± 0.89 ، کلسترول همراه آهن؛ 30.39 ± 1.48 ، کلسترول همراه آهن و ویتامین E؛ 12.11 ± 0.71 و در گروه کنترل؛ 15.01 ± 1.12 بود. اختلاف ضخامت لایه اینتیمای-مدیا در پنج گروه بررسی شده معنی‌دار گزارش شد. با آزمون تعقیبی توکی مشخص گردید ضخامت لایه اینتیمای-مدیا در گروه کلسترول نسبت به گروه کنترل (نرمال) به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($p < 0.05$). در مقایسه گروهی که به همراه کلسترول، ویتامین E نیز دریافت کرده بودند با گروه کلسترول، این ضخامت به طور معنی‌داری کاهش نشان داد ($p < 0.05$). همچنین در گروهی که به همراه کلسترول، آهن دریافت کرده بودند این اختلاف در مقایسه با گروه کلسترول و گروه کلسترول به اضافه آهن و ویتامین E، به طور معنی‌داری افزایش داشت ($p < 0.05$). در مقایسه گروه کلسترول به اضافه آهن و ویتامین E با

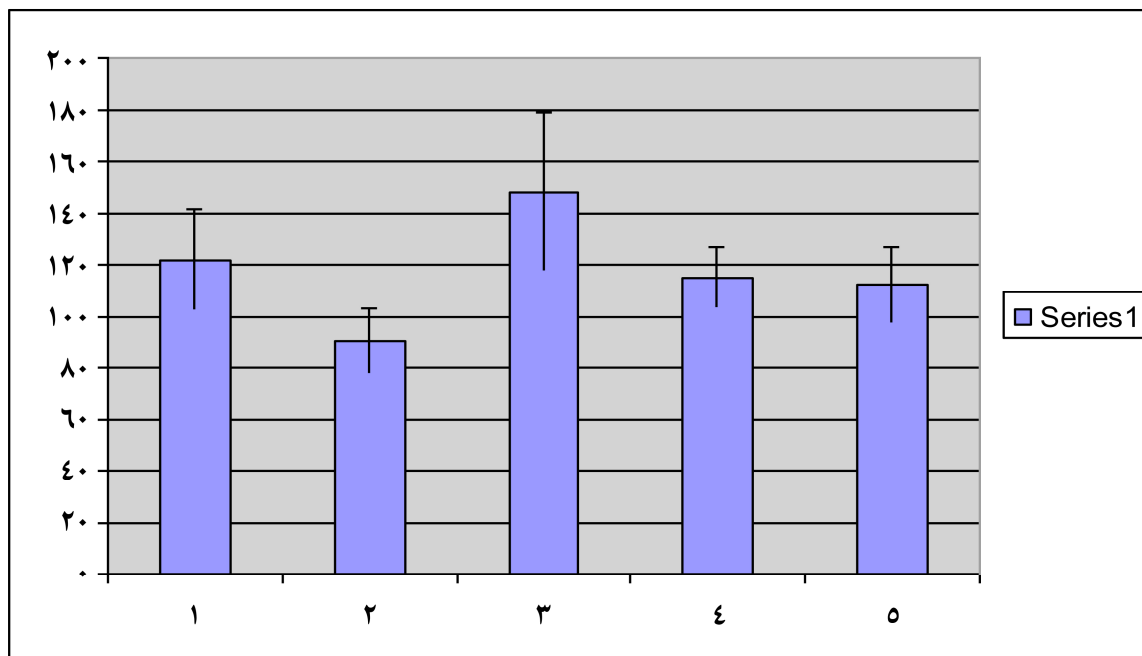
می‌شوند، مشخص می‌گردد (۴). این پلاک‌ها تجمعی از سلول‌های عضلانی صاف، سلول‌های التهابی به خصوص ماکروفاژها، لمفوسیت‌های T، ماست سل‌ها و چربی داخل و خارج سلولی است که به داخل مجرای رگ برجسته می‌شوند (۵-۷). از نظر بالینی در میان سرخرگ‌ها، شریان‌های کرونر و کاروتید که به ترتیب منجر به بیماری‌های ایسکمیک قلبی و سکته‌های مغزی می‌شوند از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۸،۹). تاکنون مطالعات بسیاری به منظور پی بردن به چگونگی بروز این فرآیند و نیز عامل مؤثر بر آن چه به صورت کاهنده و چه به صورت افزاینده در جهت پیشگیری، همچنین درمان مناسب برای کاهش مرگ و میرهای ناشی از آن و ارتقای سلامت فردی انجام شده است. در این میان، نقش آهن در پیشبرد روند آترواسکلروزیس به عنوان یک آتروژن به اثبات رسیده است (۱۳-۱۰). ویتامین E نیز به عنوان ویتامین محلول در چربی غشای سلولی و لیوپروتئین‌ها، فعالیت می‌کند و دارای ۸ فرم مختلف است که هر فرم فعالیت بیولوژیکی مخصوص به خود دارد (۱۴). ویتامین E در واقع نام ژنریک دسته‌ای از ترکیبات به نام توکوفرول‌ها و توکوتریول‌ها می‌باشد که فعال‌ترین آنها د-آلفا توکوفرول است (۱۵،۱۶). وظیفه اصلی ویتامین E به عنوان آنتی‌اکسیدان، محصور کردن رادیکال‌های آزاد و شکننده زنجیره اکسیداسیون چربی در غشای پلاسمایی و لیوپروتئین‌های پلازما می‌باشد، اما در مورد نقش بازدارنده ویتامین E در این روند با توجه به اثر آنتی‌اکسیدانی آن هنوز اختلاف نظرهایی وجود دارد (۱۷،۱۸). در این تحقیق اثر ویتامین E و آهن بر ضخامت دیواره شریان کاروتید خرگوش‌های تغذیه شده با رژیم پرکلسترول بررسی گردید.

روش بررسی

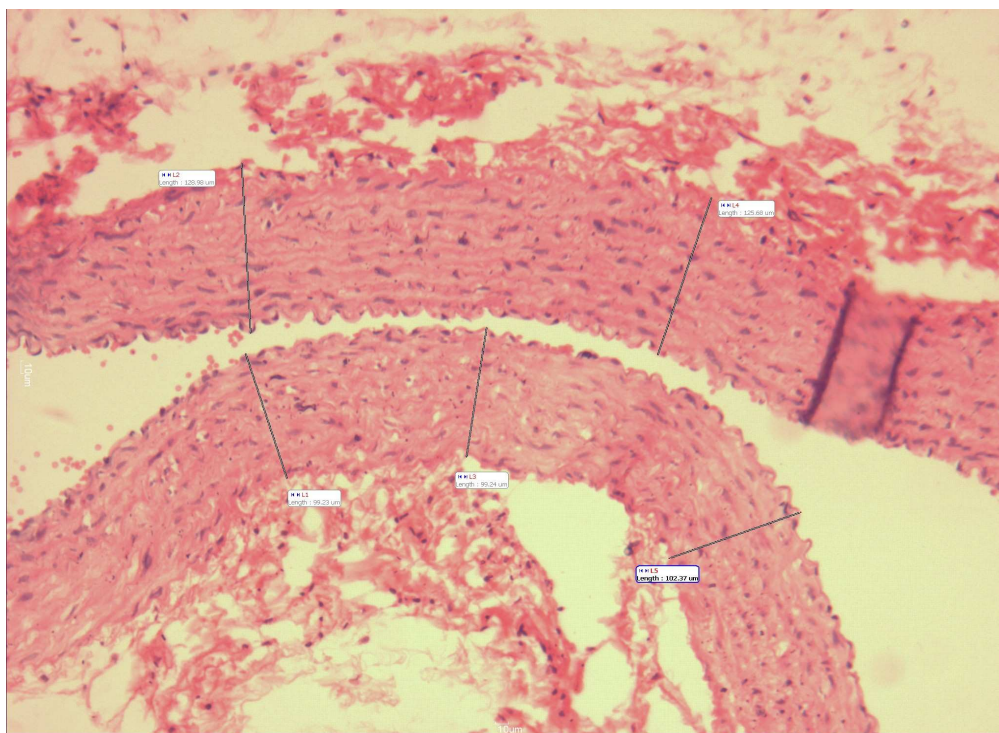
این تحقیق تجربی بر روی ۳۰ خرگوش نر خریداری شده از انستیتو پاستور ایران، انجام شد. ابتدا از خرگوش‌ها به مدت یک هفته در لانه حیوانات دانشکده پزشکی اصفهان به منظور تطابق با محیط، نگهداری شد. سپس خرگوش‌ها به صورت تصادفی به پنج گروه ۶ تایی تقسیم و به مدت ۶ هفته با رژیم غذایی مخصوص هر گروه تغذیه شدند. رژیم‌های استفاده شده برای این پنج گروه شامل: ۱- رژیم غذایی پرکلسترول (۱٪)، ۲- رژیم غذایی پرکلسترول و ویتامین E، ۳- رژیم غذایی پرکلسترول و آهن (۵۰mg/kg)، ۴-

داد ($p < 0/05$)، همچنین در مقایسه گروه ۴ با دیگر گروه‌ها، اندازه ضخامت دیواره نسبت به گروه ۲ افزایش و در مقایسه با گروه ۳ کاهش معنی‌داری یافته بود ($p < 0/05$)، اما در مقایسه گروه ۴ با گروه ۵ هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (نمودار، شکل شماره ۱ و ۲).

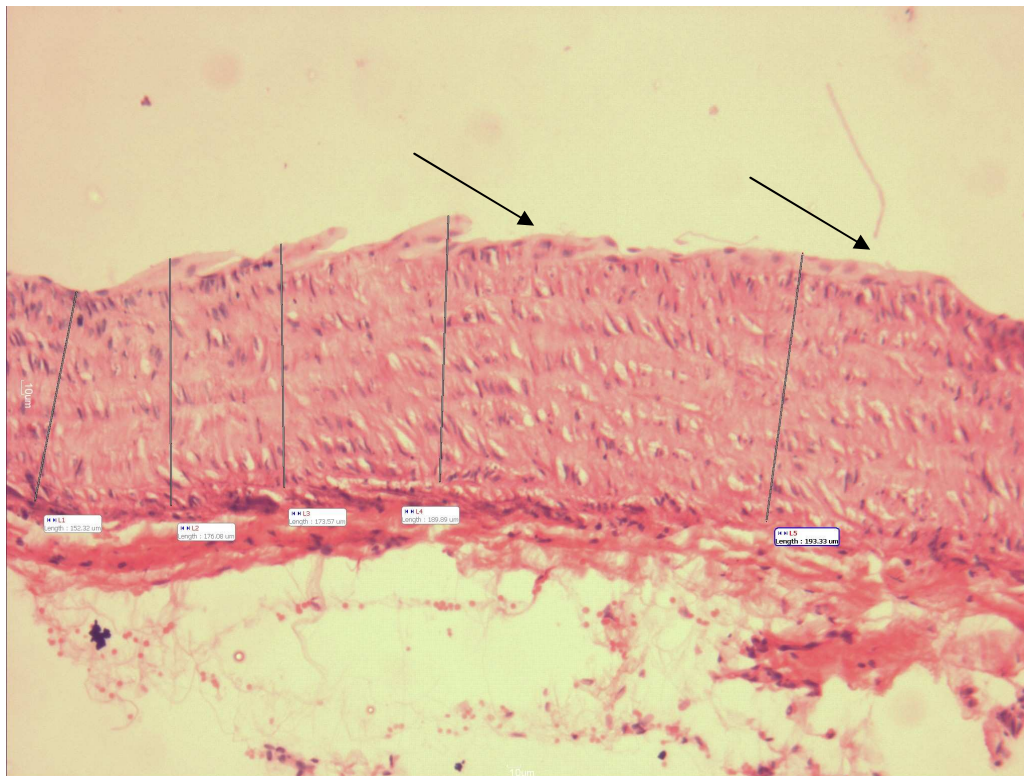
گروه کنترل (نرمال)، هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. به عبارت دیگر، ضخامت دیواره شریان در گروه ۱ به‌طور معنی‌داری از گروه‌های ۲ و ۵ بیشتر و از گروه ۳ کمتر بود ($p < 0/05$). این ضخامت در گروه ۲ نسبت به گروه‌های ۱، ۳، ۴ و ۵ به‌طور معنی‌داری کاهش و در گروه ۳ نسبت به تمام گروه‌ها افزایش نشان



نمودار: مقایسه میانگین ضخامت اینتیمای مدیا در گروه‌های ۱-۵ (اندازه‌ها به μm می‌باشد)



شکل شماره ۱: تصویر میکروسکوپ نوری از مقطع شریان کاروتید و اندازه‌گیری‌های انجام‌شده توسط نرم‌افزار 2 Motic Plus Image (گروه کنترل - نرمال) (با بزرگنمایی ۱۰۰)



شکل شماره ۲: تصویر میکروسکوپ نوری از مقطع شریان کاروتید (گروه ۳، پرکلسترول Fe^{+})
(نوک پیکان مراحل آغازین تشکیل پلاک را نشان می‌دهد) (با بزرگنمایی ۱۰۰)

بحث

نیست. همچنین مکانیسم اکسیداسیون LDL نیز به‌طور دقیق مشخص نشده است، اما ممکن است یون‌های فلزی مثل آهن و یا مس در آن دخالت داشته باشند؛ به‌طوری‌که توانایی کاتالیز کردن برای تولید رادیکال‌های هیدروکسیل بسیار سمی و واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون چربی را دارند (۲۵). در مطالعات *Invitro* مشخص شده است که آهن یا مس برای اکسیداسیون LDL به‌وسیله سلول آندوتلیال، ماکروفاژها و سلول‌های عضله صاف مورد نیاز می‌باشد (۱۱، ۱۰). آهن قادر است که پرولیفراسیون عضلات صاف را تسهیل کند که یک مرحله کلیدی در پیشرفت ضایعات آترواسکلروزی است (۱۲)، همچنین ممکن است به‌طور غیرمستقیم با کاهش دادن سطح آنتی‌اکسیدان‌های پلاسما بر پراکسیداسیون LDL تأثیرگذار باشد (۱۳). آهن، فریتین و هموسیدرین از Fatty Streaks و پلاک‌های آترواسکلروزی در انسان جدا شده‌اند، ولی در این تیمای نرمال وجود ندارند (۲۸-۲۶). از سوی دیگر، احیای آهن از Fe^{3+} به Fe^{2+} در اکسیداسیون LDL نقش اساسی داشته و نقش آن در القای فرآیند آتروژنز به اثبات رسیده است (۲۹). در این تحقیق نیز ضخامت اینتیمای دیواره شریانی در گروهی که به همراه کلسترول، آهن مصرف

گرچه در مطالعات مختلف اثر کلسترول بر ضخامت دیواره شریانی متفاوت گزارش شده است (۱۹)، اما در این تحقیق نتایج نشان داد ضخامت دیواره شریانی در گروهی که کلسترول دریافت کرده‌اند نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری داشته است (نمودار شماره ۱). در مطالعات اپیدمیولوژیک و تحقیقاتی آمده است که آنتی‌اکسیدان‌هایی مثل ویتامین E (Alfa Tocopherol) می‌توانند نقش مهمی در پیشگیری و بهبود بیماری‌های مزمن به‌ویژه بیماری‌های قلبی-عروقی و آترواسکلروز ایفا نمایند (۲۰). ویتامین E نیز با مهار پراکسیداسیون و با واسطه آهن در کلیه رت از آپوپتوز جلوگیری کرده (۲۱)، و اثر استرس اکسیداتیو آهن داخل وریدی را مهار می‌کند (۲۲). همچنین مشخص شده است ویتامین E می‌تواند از مسیر همواکسیژناز ۱ که بی‌ارتباط با رادیکال‌های آزاد است در پیشگیری از آترواسکلروز مؤثر باشد (۲۳). گرچه تلاش‌های انجام‌شده در مطالعات بالینی هنوز چنین چیزی را اثبات نکرده است (۲۴)، اما در تحقیق حاضر نتایج نشان داد ویتامین E می‌تواند از این افزایش ضخامت دیواره شریانی جلوگیری کند که با توجه به مطالعات قبلی امری دور از انتظار

کرده بودند به‌طور معنی‌داری از دیگر گروه‌ها بیشتر بود (نمودار شماره ۱) که مطابق با یافته‌های دیگر مطالعات می‌باشد.

ویتامین E، مصرف این ویتامین می‌تواند با جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد و مهار اثر آتروژنیک آهن، از افزایش ضخامت دیواره شریانی (ضخامت لایه اینتیمای مدیا) جلوگیری کند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد، با توجه به اثر آنتی‌اکسیدانی

References:

1. Gerrity RG, Antonov AS. The Pathogenesis of Atherosclerosis. *Diabetologia* 1997;40:108-110.
2. Fan J, Watanab T. Inflammatory Reactions in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2003;10(2):63-67.
3. Kumar V, Corton RS, Stanely L. Robbins Basic Pathology. 6th ed. Philadelphia US: Sunders; 1997. p. 282-307.
4. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. The Road Ahead. *Cell* 2001;104(4):503-516.
5. Libby P. Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2001;104:365-372.
6. Libby P, et al. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002;105(9):1135-43.
7. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary Plaque Disruption. *Circulation* 1995;92:657-671.
8. Luscher TF, Tanner Fc, Noli G. Lipids and Endothelial Function. *Curr Opin Lipidol* 1996;7(4):234-240.
9. Martin A, Frei B. Both Intracellular and Extracellular Vitamin C Inhibit Atherogenic Modification of LDL by Human Vascular Endothelial Cell. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(8):1583-1890.
10. Leak DS, Rankin SM. The Oxidative Modification of Low Density Lipoproteins by Macrophages. *Biochem J* 1990;270(3):741-748.
11. Porreca E, Uchino S, Di Febbo G, Di Bartolome N, Angelucci D, Napditano AM. Antiproliferative Effect of Desferrioxamine on Vascular Smooth Muscle Cells in Vitro and in Vivo. *Arterioscler Thromb* 1994;14(2):299-304.
12. Dabbagh AJ, Mannion T, Lynch SM, Frei B. The Effect of Iron Overload on Rat Plasma and Live Oxidant Status in Vivo. *Biochem J* 1994;300:799-803.
13. Modern Nutrition in Health and Disease. In: Shils ME, Olson JA, Shihe M, Ross AC, et al. editors. 10th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999. p. 347-362.
14. Traber MG, Packer L. Vitamin E: Beyond Antioxidant Function. *Am J Clin Nutr* 1995;62(6):15015-15059.
15. Farrell P, Roberts RM. Modern Nutrition in Health and Disease. In: Olson JA, Shihe M, Shils ME, editors. 8th ed. Philadelphia PA: Lea and Febiger; 1994. p. 326-341.
16. Verlangieri AJ, Bush MJ. Effects of D-alpha-Tocopherol Supplementation on Experimentally Induced Primate Atherosclerosis. *J Am Coll Nutr* 1992;11(2):131-138.
17. Wojcicki J, Rozewicka L, Barcew-Wiszuiewska B, Samochawiec L, Juzwiak S, Kadubowaska D, Tustanowski S, Juzszyn Z. Effect of Selenium and Vitamin E on the Development of Experimental Atherosclerosis in Rabbits. *Atherosclerosis* 1991;87(1):9-16.
18. Geissler C, Power H. Human Nutrition. 11th ed. London, UK: Elsevier Churchill Livingstone; 2006. p. 222-225.
19. Braz DJ, Gutierrez PS, da Luz PL. Coronary Fat Content Evaluated by Morphometry in Patient with Sever Atherosclerosis Has no Relation with Seru Lipid Levels. *Brazilian J of Med and Biol Res* 2007;40(4):467-473.
20. Dutta A, Dutta SK. Vitamin E and Its Role in the Prevention of Atherosclerosis and Carcinogenesis: A Review. *J Am Coll Nutr* 2003;22(4):258-268.
21. Zhang D, Okada S, Yu Y, Zheng P, Yamaguchi R, Kasai H. Vitamin E Inhibits Apoptosis, DNA Modification and Cancer Incidence Induced by Iron-Mediated Proxidation in Wistar Rat Kidney. *Cancer Res* 1997;57(12):2410-2414.

22. Roob JM, et al. Vitamin E Attenuates Oxidative Stress Induced by Intera Venous Iron in Patient on Hemodialysis. J Am Soc Nephrol 2000;11(3):539-549.
23. Wu BJ, et al. Antioxidants Protect from Atherosclerosis by a Heme Oxygenase 1 Pathway That is Independent of Free Radical Scavenging. J Exp Med 2006;203(4):1117-27.
24. Islam KN, Devaraj S, Jialal I. Alpha-Tocopherol Enrichment of Monocytes Decreases Agonist-Induced Adhesion to Human Endothelial Cells. Circulation 1998;98(21):2255-61.
25. Heinecke JW, Rosen H, Chait A. Iron and Copper Promote Modification of Low Density Lipoprotein by Human Arterial Smooth Muscle Cells. J Clin Invest 1984;74(5):1890-1894.
26. Pang JH, Jiang MJ, Chen YL, Wang FW. Increased Ferritin Gene Expression in Atherosclerotic Lesions. J Clin Invest 1996;97(10):2204-2212.
27. Jankus A, Ardlie NG, Edwards RG, Schwartz CJ. Marked Aortic Hemosiderin Deposits in a Patient with Hemochromatosis. Arch Pathol 1967;84(4):418-421.
28. Schwartz CJ, Ardlie NG, Crater RF, Paterson JC. Gross Aortic Sudanophilia and Hemosiderine Deposition: A Study on Infants, Children and Young Adults. Arch Pathol 1967;83(4):325-332.
29. Sean M, Lynch Balz F. Mechanisms of Copper- and Iron-Dependent Oxidation of Human Low Density Proteins. American Institute of Nutrition 1996;1063-1066.