

Role of nitric-oxide in cardiac effects of glibenclamide in rat

F. Mirershadi*

H. Ogagzadeh**

M. Faghihi***

L. Alizadeh****

*M.Sc. in Physiology, School of Medicine, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran

**PhD. in Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

***Professor of Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

****M.Sc. in Midwifery, School of Medicine, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran

*Abstract

Background: There are reports of cardiovascular complications in patients with diabetes that are caused by glibenclamide. On the other hand, nitric oxide has been mentioned as an important factor in the physiology and disorders of the heart in recent studies.

Objective: The aim of this study was to determine the role of nitric-oxide in cardiac effects of glibenclamide.

Methods: This experimental study was conducted in 42 male rats at Tehran University of Medical Sciences in 2011. Rat atria were isolated after anesthesia and were transferred to an organ bath containing oxygenated Krebs' solution. Atrial contractions were measured using a physiograph. The samples were divided into 7 groups (n=6): Control group in which the atrial contractions were recorded without medication, Tween-80 group, L-arginin group, L-NAME group, Glibenclamide (Glb) group, Glb+L-arginin group in which the atrial contractions were recorded in the presence of glibenclamide and L-Arginin, and Glb+L-NAME group in which the atrial contractions were recorded in the presence of glibenclamide and L-NAME. Data were analyzed using two-way ANOVA.

Findings: Glibenclamide increased the amplitude of atrial contractions. L-NAME and L-arginin did not change the effect of glibenclamide. L-arginine decreased the amplitude of atrial contractions and L-NAME increased the amplitude of atrial contractions.

Conclusion: The effect of glibenclamide is independent of nitric-oxide.

Keywords: Glibenclamide, Nitric-Oxide, Heart Atria, Rats

Citation: Mirershadi F, Ogagzadeh H, Faghihi M, Alizadeh L. Role of nitric-oxide in cardiac effects of glibenclamide in rat. J Qazvin Univ Med Sci. 2015; 19 (1): 17-23.

Corresponding Address: Fatemeh Mirershadi, Department of Microbiology, School of Medicine, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Basij Square, Ardabil, Iran

Email: fmirershadi@sina.tums.ac.ir

Tel: +98-912-2491854

Received: 20 Jul 2014

Accepted: 11 Nov 2014

نقش اکسید نیتریک بر روی اثرات قلبی گلی بن کلامید در موش صحرائی

فاطمه میراشادی*

دکتر حسن اجاقزاده**

دکتر مهدیه فقیهی***

لیلا علیزاده****

* کارشناس ارشد فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، اردبیل، ایران
 ** دکترای فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
 *** استاد فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
 **** کارشناس ارشد مامایی دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، اردبیل، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: اردبیل، میدان بسیج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، دانشکده پزشکی، تلفن ۰۹۱۲۲۴۹۱۸۵۴

Email: fmirershadi@sina.tums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۹

* چکیده

زمینه: گزارش‌هایی از عوارض قلبی و عروقی در افراد دیابتی وجود دارد که در اثر مصرف داروی گلی بن کلامید ایجاد می‌شود. از طرفی مطالعه‌های اخیر از اکسید نیتریک (NO) به عنوان عاملی مهم در فیزیولوژی قلب و دخیل در اختلال‌های آن نام برده‌اند.

هدف: مطالعه به منظور تعیین نقش احتمالی اکسید نیتریک بر روی اثرات قلبی گلی بن کلامید انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۰ در دانشگاه علوم پزشکی تهران بر روی ۴۲ رأس موش صحرائی نر انجام شد. دهلیز قلبی موش‌ها بعد از بی‌هوشی جدا و به حمام بافتی حاوی محلول کربس اکسیژنه منتقل شد. دامنه انقباض‌های دهلیزی توسط دستگاه فیزیوگراف ثبت شد. نمونه‌ها به ۷ گروه ۶ تایی تقسیم شدند: گروه شاهد که در آن انقباض‌های دهلیز بدون مصرف دارو ثبت شد، گروه تویین ۸۰، گروه ال - آرژینین، گروه ال - نیم، گروه گلی بن کلامید، گروه گلی بن کلامید + ال - آرژینین که انقباض‌های دهلیزی تحت تأثیر گلی بن کلامید و در مجاورت ال - آرژینین ثبت شد و گروه گلی بن کلامید + ال - نیم که انقباض‌های دهلیزی تحت تأثیر گلی بن کلامید و در مجاورت ال - نیم بررسی شد. داده‌ها با آزمون آماری واریانس دو طرفه تحلیل شدند.

یافته‌ها: گلی بن کلامید دامنه انقباض‌های دهلیزی را افزایش داد. ال - نیم و ال - آرژینین به ترتیب موجب افزایش و کاهش دامنه انقباض‌های دهلیز شدند. اثر گلی بن کلامید تحت تأثیر ال - آرژینین و ال - نیم قرار نگرفت.

نتیجه‌گیری: گلی بن کلامید مستقل از اکسید نیتریک عمل می‌نماید.

کلیدواژه‌ها: گلی بن کلامید، اکسید نیتریک، دهلیز قلبی، موش‌های صحرائی

* مقدمه

محققین به این نکته جلب شده است که شاید داروهای مورد مصرف در دیابت باعث ایجاد عوارض قلبی و عروقی می‌شوند.

گلی بن کلامید که جزو داروهای سولفونیل اوره است، به طور فراوان در درمان دیابت استفاده می‌شود. در مقاله‌ای بیان شده است که گلی بن کلامید موجب افزایش فشار خون شریانی می‌شود و این عارضه را به تأثیر نامطلوب گلی بن کلامید بر روی قلب و افزایش قدرت انقباضی آن نسبت داده‌اند.^(۷) در مقاله دیگری گزارش کرده‌اند که

در حال حاضر بیش از ۳۰۰ میلیون نفر در سراسر دنیا از دیابت شیرین رنج می‌برند و این رقم در سال ۲۰۳۰ به بیش از ۵۰۰ میلیون نفر خواهد رسید.^(۱) به نظر می‌رسد دیابت بزودی به یک بیماری همه‌گیر در جهان تبدیل شود.^(۲،۳) بیماری‌های قلب و عروق یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در مبتلایان به دیابت است.^(۴،۵) این بیماری در افراد دیابتی نسبت به افراد عادی شایع‌تر است.^(۶) با توجه به این که اختلال عملکرد قلب و عروق در بیماران دیابتی علی‌رغم کنترل قند خون اتفاق می‌افتد، توجه

(25 ± 3 درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند و تا زمان انجام آزمایش آزادانه به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. موش‌ها به طور تصادفی به ۷ گروه ۶ عددی تقسیم و در زمان اجرای آزمایش به کمک تزریق داخل صفاقی پنتوباریتال سدیم (۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند. پس از بی‌هوشی کامل، موش‌ها جراحی و قلب آن‌ها به سرعت از قفسه‌سینه خارج شد و بلافاصله در داخل محلول کربس هنسله ($\text{PH}=7/4$) محتوی گاز کاربوژن (۹۰ درصد اکسیژن و ۵ درصد دی‌اکسید کربن) و با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس بطن‌ها و نسوج اضافی با دقت از اطراف دهلیزها جدا و دهلیزها در داخل حمام بافتی به نحوی قرار گرفتند که یک طرف آن به وسیله پایه شیشه‌ای به قسمت پایین محفظه و طرف دیگر توسط سیم استیل نازک به دستگاه انتقال‌دهنده حرکت‌ها (ترانس دیوسر) متصل باشد. در این حالت حرکت‌های ناشی از انقباض‌های دهلیز به دستگاه فیزیوگراف منتقل و بر روی کاغذ ثبت شد. مدت ۴۵ دقیقه جهت سازگاری دهلیز با محیط جدید در نظر گرفته شد، به طوری که در پایان این مدت دامنه انقباض‌های دهلیز به یک حد ثابت و پایدار رسید. تغییرات دامنه انقباض‌های دهلیزها پس از مجاورت با داروهای مختلف بررسی شد. با توجه به داروهای مورد استفاده، ۷ گروه آزمایشی عبارت بودند از:

۱- گروه شاهد که برای حذف عوامل غیر دارویی طی روند اجرایی، در این گروه دامنه انقباض‌ها پس از رسیدن به حالت پایدار، بدون هیچ مداخله‌ای به مدت ۲ ساعت ثبت شد.

۲- گروه توپین ۸۰ که در این گروه پس از سازگاری بافت با محیط، توپین ۸۰ به حمام بافتی اضافه شد و اثرات ناشی از آن توسط فیزیوگراف به مدت ۲ ساعت ثبت گردید.

۳- گروه ال- آرژینین که پس از آماده شدن بافت‌ها و ثابت شدن دامنه انقباض‌ها، ال- آرژینین به صورت تجمعی به حمام بافتی اضافه و اثرات آن ثبت شد. غلظت‌های بعدی دارو (۴۵۰ تا ۵۰۰ میکرومول بر لیتر)

اختلال‌های قلبی و عروقی در افراد دیابتی فقط تا حدودی با کنترل قند خون قابل پیشگیری هستند.^(۸) از آنجا که باز شدن کانال‌های پتاسیمی حساس به آدنوزین تری فسفات به عنوان مکانیسم حفاظتی قلب در نظر گرفته می‌شود و گلی بن کلامید کانال‌های فوق را مهار می‌کند، مهار این کانال‌ها در سیستم قلبی و عروقی ممکن است اثرات زیان‌آوری برای این سیستم به دنبال داشته باشد.^(۹)

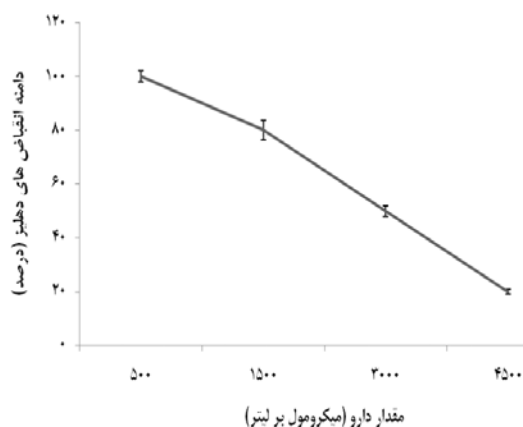
از طرفی محققین، سیستم عصبی غیرآدرنرژیک و غیرکولینرژیک با واسطه اکسید نیتریک را به عنوان یک عامل مهم در فیزیولوژی و آسیب‌شناسی قلب مطرح کرده‌اند.^(۱۰ و ۱۱) کشف اکسید نیتریک به عنوان ناقل عصبی شیمیایی در سیستم قلبی و عروقی جایزه نوبل را برای مونکادو و همکاران در سال ۱۹۹۸ به ارمغان آورد. از آن زمان تاکنون مطالعه‌های زیادی در ارتباط با نقش تنظیمی سیستم نیتریک در پدیده‌های فیزیولوژیک و آسیب‌شناسی در بخش‌های مختلف قلب و عروق انجام شده است. وجود اکسید نیتریک در سلول‌های میوسیت و افزایش غلظت آن در اختلال‌های قلبی همگی تأکیدی بر اهمیت موضوع است.^(۱۲ و ۱۳)

عوارض جانبی گلی بن کلامید متعدد است.^(۱۴) کاردیومیوپاتی، آریتمی قلبی و اختلال‌های عروقی از عوارض اصلی مصرف این دارو هستند.^(۱۵ و ۱۶) عارضه دیگر مصرف گلی بن کلامید افزایش فشارخون شریانی است که بعضی از مطالعه‌ها آن را به تأثیر نامطلوب این دارو بر روی قلب و افزایش قدرت انقباض آن نسبت داده‌اند.^(۱۷) بنابراین مطالعه حاضر با هدف تعیین نقش احتمالی اکسید نیتریک بر روی اثرات قلبی گلی بن کلامید انجام شد.

*مواد و روش‌ها:

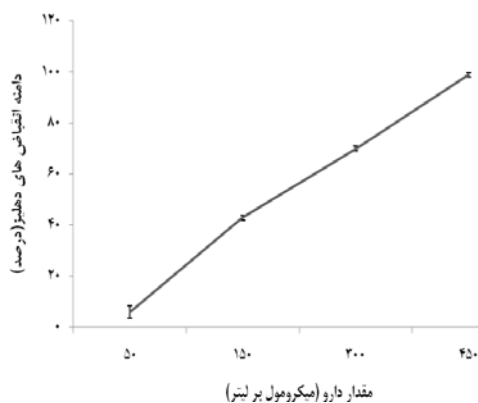
این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۰ بر روی ۴۲ رأس موش صحرائی نر نژاد اسپراگ داوولی با محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم موجود در گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران با رعایت تمام نکات اخلاقی انجام شد. موش‌ها در شرایط یکسان و در دمای معمولی آزمایشگاه

نمودار ۱- اثر ال- آرژینین بر روی دامنه انقباض‌های دهلیز موش صحرائی



پاسخ ایجاد شده نسبت به اضافه شدن غلظت‌های تجمعی ال- نیم به صورت افزایش دامنه انقباض‌ها بود که با افزایش مقدار دارو، میزان دامنه انقباض‌ها نیز بیش‌تر می‌شد تا در نهایت به حالت حداکثر پاسخ (وضعیت ثابت) رسید (نمودار شماره ۲).

نمودار ۲- اثر ال- نیم بر روی دامنه انقباض‌های دهلیز موش صحرائی



با اضافه نمودن گلی‌بن‌کلامید به حمام بافتی به صورت غلظت‌های تجمعی، دامنه انقباض‌های دهلیز افزایش یافت و در نهایت در یک حد حداکثر ثابت باقی ماند، داروهای ال- آرژینین و ال- نیم این اثر را تحت تأثیر قرار ندادند (نمودار شماره ۳).

زمانی به حمام بافتی اضافه می‌شد که تغییرات دامنه انقباض‌ها به یک حد ثابت رسیده باشد.^(۱۸)

۴- گروه ال- نیم که داروی ال- نیم به صورت تجمعی به حمام بافتی اضافه شد. غلظت به کار رفته ۵۰ تا ۴۵۰ میکرومول بر لیتر بود.^(۱۹)

۵- گروه گلی‌بن‌کلامید که اضافه کردن گلی‌بن‌کلامید به حمام بافتی با غلظت ابتدایی ۱۵ میکرومول بر لیتر شروع و غلظت‌های بعدی به صورت تجمعی اضافه شد و نمودار دوز- پاسخ رسم گردید.

۶- گروه گلی‌بن‌کلامید ال- آرژینین که پس از سازگار شدن بافت‌ها با محیط، ابتدا ال- آرژینین با غلظت ۵۰۰ میکرومول به حمام اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه، گلی‌بن‌کلامید با همان غلظت‌های تجمعی که برای نمودار دوز- پاسخ به تنهایی استفاده شده بود، اضافه و نمودار دوز- پاسخ رسم گردید.

۷- گروه گلی‌بن‌کلامید + ال- نیم که تأثیر داروی گلی‌بن‌کلامید در مجاورت ال- نیم با غلظت ۵۰ میکرومول، مشابه گروه ۶ بررسی شد.

اثرات ناشی از انقباض‌های دهلیز با جابه‌جایی قلم فیزیوگراف ثبت و میزان جابه‌جایی بر روی کاغذ برحسب میلی‌متر و به صورت درصد محاسبه شد. اختلاف دامنه انقباض‌ها در گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری واریانس دو طرفه مقایسه و $P < 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

* یافته‌ها:

ال- آرژینین دامنه انقباض‌های دهلیز قلبی را کاهش داد. با اضافه نمودن داروی مذکور به حمام بافتی به صورت غلظت‌های تجمعی، میزان مهار بیش‌تر شد و در نهایت به حالت حداکثر پاسخ (وضعیت ثابت) رسید (نمودار شماره ۱).

کاهش داد. در واقع افزایش تولید اکسید نیتریک موجب کاهش شدت انقباض‌های عضله دهلیزی شد. این نتیجه در سایر مطالعه‌ها نیز گزارش شده است. آن‌ها نشان دادند که اثرات اکسید نیتریک بر روی انقباض‌های دهلیز در حضور مهار کننده گوانیلات سیکلاز از بین می‌رود. در واقع مکانیسم اثر اکسید نیتریک را از طریق افزایش گوانوزین تری فسفات حلقوی داخل سلولی گزارش کرده‌اند. (۲۴ و ۲۳)

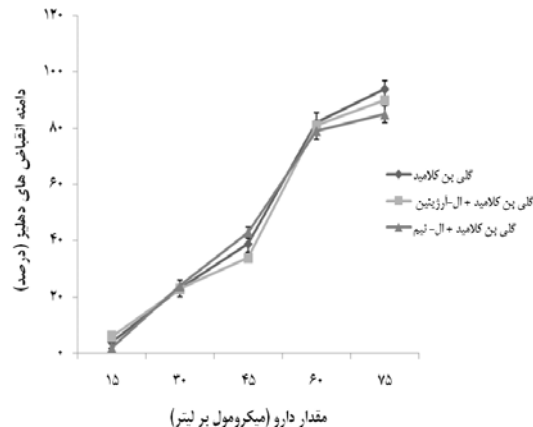
مطالعه حاضر به روشنی نشان داد که متوقف کردن فعالیت آنزیم سازنده اکسید نیتریک توسط ال-نیم باعث توقف اثرات متسع کننده اکسید نیتریک و در نتیجه موجب تداوم انقباض در عضله قلبی می‌شود که با سایر مطالعه‌ها هم‌خوانی داشت. (۲۵)

به طور کلی مطالعه حاضر نشان داد که گلی بن کلامید باعث افزایش قدرت انقباض دهلیز قلبی موش صحرایی می‌شود و این اثر مستقل از سیستم نیتریک و بدون دخالت اکسید نیتریک است.

*مراجع:

- Whiting D, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2011 Dec; 94 (3): 311-21
- Danaei G, Finucane MM, Lu Y, et al. National, regional and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* 2011 Jul 2; 378 (9785): 31-40
- Oputa R, Chinenye S. Diabetes mellitus: a global epidemic with potential solutions. *AJDM* 2012 Nov; 20 (2): 33-5
- Aryangat AV, Gerich JE. Type 2 diabetes: postprandial hyperglycemia and increased

نمودار ۳- مقایسه اثر گلی بن کلامید به تنهایی و همراه ال-آرژینین و ال-نیم بر روی دامنه انقباض‌های دهلیز موش صحرایی



دامنه انقباض‌های ثبت شده در مجاورت توپین ۸۰ تغییر معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان نداد.

* بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد که گلی بن کلامید موجب افزایش قدرت انقباضی قلب می‌شود و این اثر در مجاورت ال-آرژینین و ال-نیم تغییری نمی‌کند لذا ارتباط احتمالی بین اثرات قلبی داروی گلی بن کلامید و اکسید نیتریک تأیید نشد. اکسید نیتریک به عنوان یک ناقل عصبی و شیمیایی در سیستم قلبی و عروقی به شمار می‌رود و در عملکرد قلبی مؤثر است. این ماده توسط آنزیم سازنده اکسید نیتریک و با استفاده از ال-آرژینین ساخته می‌شود. (۲۰)

با توجه به این که تولید اکسید نیتریک در بیماران دیابتی کاهش می‌یابد، (۲۱) تجویز ال-آرژینین در حیوان‌های دیابتی سبب کاهش فشار سیستولی، فشار دیاستولی و فشار متوسط شریانی می‌شود. همچنین این ماده با افزایش قابلیت اتساع عروق و کاهش آترواسکلروز، از بروز حمله‌های قلبی جلوگیری می‌کند. (۲۲)

در این مطالعه اضافه کردن ال-آرژینین به صورت جمعی به حمام بافتی، قدرت انقباضی دهلیز را به تدریج

- cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag* 2010 Mar 24; 6: 145-55
5. Pistrosch F, Natali A, Hanefeld M. Is hyperglycemia a cardiovascular risk factor? *Diabetes Care* 2011 May; 34 Suppl 2: S128-31
6. White A, McKay GA, Fisher M. Part 9 prescribing for patients with cardiac disease. *Br J Cardiol* 2012 May; 19 (2): 85-9
7. Zeller M, Danchin N, Simon D, et al. Impact of type of preadmission sulfonylureas on mortality and cardiovascular outcomes in diabetic patients with acute myocardial infarction. *J Clin Endocrinol Metab* 2010 Nov; 95 (11): 4993-5002
8. Magaš S. Cardiovascular affects of oral medications in the treatment of type 2 diabetes. *Cardiol Croat* 2013 Oct; 8 (10): 345-51
9. Flagg TP, Nichols CG. Cardiac KATP: a family of ion channels. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011 Dec; 4 (6): 796-8
10. Dobutovic B, Smiljanic K, Soskic S, et al. Nitric oxide and its role in cardiovascular diseases. *The Open Nitric Oxide Journal* 2011 Sep; 3: 65-71
11. Chen CA, Wang TY, Varadharaj S, et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature* 2010 Dec 23; 468 (7327): 1115-8
12. Zaobornyj T, Ghafourifar P. Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *Am J Physiol Heart Cric Physiol* 2012 Dec; 303 (11): H1283-93
13. Dordevic VB, Stojanovic I, Kundalic S, et al. Pathophysiological importance of nitric oxide in coronary heart disease. *J Med Biochem* 2012 Oct; 31 (4): 287-94
14. Roumie CL, Hung AM, Greevy RA, et al. Comparative effectiveness of sulfonylurea and metformin monotherapy on cardiovascular events in type 2 diabetes mellitus: a cohort study. *Ann Intern Med* 2012 Nov 6; 157 (9): 601-10
15. Miki T, Yuda S, Kouzu H, Miura T. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart Fail Rev* 2013 Mar; 18 (2): 149-66
16. Negroni JA, Lascano EC, del Valle HF. Glibenclamide action on myocardial function and arrhythmia incidence in the healthy and diabetic heart. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2007 Jan; 5 (1): 43-53
17. Khatib SY, Boyett MR. Effects of glyburide on myocardial function in Langendorff perfused rabbit heart and on myocardial contractility and slow calcium current in guinea-pig single myocytes. *Mol Cell Biochem* 2003 Jan; 242 (1-2): 81-7
18. Samy E, Hussein F. Electrophysiological changes in response to L-arginine infusion in isolated mammalian heart. *J Pharm Pharmacol* 2013 Jun; 7 (24): 1645-51
19. Pisarenko OI, Pelogeykina YA, Shulzhenko VS. Nitric oxide synthase mediates the apelin-induced improvement of myocardial postischemic metabolic and functional recovery. *Open Journal of Molecular Integrative Physiology* 2012 Feb; 2 (1): 1-7
20. Förstermann U, Sessa W. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012 Apr; 33 (7): 829-37, 837a-837d
21. Tessari P, Cecchet D, Cosma A, et al. Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy. *Diabetes* 2010 Sep; 59 (9): 2152-9
22. Shemyakin A, Kövamees O, Rafnsson A, et al. Arginase inhibition improves endothelial function in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2012 Dec 18; 126 (25): 2943-50

23. Derici K, Samsar U, Demirel-Yilmaz E. Nitric oxide effects depend on different mechanisms in different regions of the rat heart. *Heart Vessels* 2012 Jan; 27 (1): 89-97
24. Maass DL, White J, Horton JW. Nitric oxide donors alter cardiomyocyte cytokine secretion and cardiac function. *Crit Care Med* 2005 Dec; 33 (12): 2794-803
25. Ferreira-Meli SE, Demacq C, Lacchini S, et al. Sildenafil preserves diastolic relaxation after reduction by L-NAME and increases phosphodiesterase-5 in the intercalated discs of cardiac myocytes and arterioles. *Clinics* 2011 Jan; 66 (7): 1253-8