

The effect of ovariectomy on hemodynamic functions and the level of nitric oxide metabolites in the heart of rats

Nasibeh Yousefzadeh¹, Sajad Jeddi¹, Asghar Ghasemi*¹

Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2 July 2022

Accepted: 19 July 2022

ePublished: 6 Aug 2022

Keywords:

- Ovariectomy
- Nitric oxide
- Cardiac hemodynamic function
- Female rats

Abstract

Background. A higher prevalence of cardiovascular disorders has been observed in women after menopause. This study aimed to determine the long-term effects of ovariectomy on hemodynamic functions and the level of nitric oxide metabolites (NOx) in the heart tissue of ovariectomized rats.

Methods. Fourteen female Wistar rats were divided into two groups (n=7 in each group) of control and ovariectomized (OVX). OVX rat model was induced using the two dorsolateral skin incision method. Cardiac hemodynamic function indices, including the left ventricular developed pressure (LVDP), peak rate of positive changes in the left ventricular pressure (+dp/dt), and peak rate of negative changes in the left ventricular pressure (-dp/dt) were measured at the time of systole in hearts after 11 months of the ovariectomy. Serum and left ventricular levels of NOx were measured at the end of the study.

Results. At the end of the study, OVX rats had lower LVDP (19%, $P=0.001$), +dp/dt (30%, $P<0.001$) and -dp/dt (23%, $P=0.004$) than control group. In addition, the OVX group had lower serum NOx levels (30%, $P=0.021$) compared to the control group; heart tissue NOx was also lower by 31% in the OVX rats, but it was not statistically significant ($P=0.056$).

Conclusion. Long-term ovariectomy disrupts cardiac hemodynamic function in ovariectomized rats, which is associated with decreased NOx levels in serum.

Practical Implications. Our findings indicated impaired cardiac function following long-term estrogen deficiency in OVX rats. These results can be used to prevent and treat the cardiovascular disease in post-menopausal women. However, these results need to be confirmed in humans.

How to cite this article: Yousefzadeh N, Jeddi S, Ghasemi A. The effect of ovariectomy on hemodynamic functions and the level of nitric oxide metabolites in the heart of rats. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2022;44(3):178-188. doi: 10.34172/mj.2022.026. Persian.

Extended abstract

Background

There were about one billion menopausal women in 2020, and it has been estimated that menopause will affect 1.6 billion women worldwide by 2050. Menopause is associated with a higher risk of

cardiovascular diseases, which is the leading cause of death worldwide. Cardiovascular diseases develop seven to ten years later in women than in men and increase after menopause or ovariectomy. Short-term (less than 17 weeks) effects of ovariectomy on

*Corresponding author; Email: Ghasemi@endocrine.ac.ir

normal cardiac function have been reported, but its long-term effects have not been documented. Different responses to short- and long-term effects of ovariectomy in animal studies have been reported. For example, only long-term ovariectomy affects the nervous system and behavior. This study aims to determine the long-term (11 months) effects of ovariectomy on normal cardiac function and the level of serum and heart tissue nitric oxide (NO) metabolites (nitrite+nitrate; NOx) in rats.

Methods

A total of 14 Female Wistar rats were assigned into the control and ovariectomized (OVX) groups (n=7 in each). Ovariectomy was induced in 6-month-old rats (body weight: 180-200 g) using the dorsolateral skin incision method. In brief, fasted (12 hours) female rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg); the skin area was then shaved, washed, and disinfected using electric clippers, chlorhexidine scrub, and ethanol 70% as well as povidone-iodine. Dorsolateral skin incision (length=1-1.5 cm) was made on a warmed pad (30-35 °C) to prevent hypothermia; duration of surgery was <10 min. Vitamin A ointment was used for eye protection. This method does not need suturing the muscle and wound healing time is 9-10 days. After induction of OVX model, rats were housed individually for one week to avoid contamination and wound reopening. To verify the OVX model, two months after the ovariectomy, blood samples were collected from tails of isoflurane-anesthetized rats, centrifuged, and serum concentrations of estradiol and progesterone were measured by ELISA kits. In addition, body weight and uterine weight were measured at months 2 and 11, respectively. At month 11, rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg), and hearts from control and OVX rats were isolated. Hemodynamic parameters, including the left ventricular developed pressure (LVDP), the peak rate of positive changes in the left ventricular pressure (+dp/dt), and peak rate of negative changes in the left ventricular pressure (-dp/dt) in isolated hearts were recorded using the Langendorff apparatus. To measure hemodynamic parameters, a latex balloon was inserted into the left ventricle, and left ventricular end-diastolic pressure

(LVEDP) was adjusted at 5-10 mm Hg by filling water in the latex balloon. LVEDP, LVDP, and $\pm dp/dt$ were digitalized by a data acquisition system (Power Lab, AD instrument, Australia). Heart and serum NOx levels were measured at the end of the study using the Griess method. In this method, nitrate is reduced to nitrite by vanadium (III) chloride; nitrite produces pink color in acidic environment, which is read at 540 nm.

Results

Serum concentrations of estradiol and progesterone decreased by 90% ($P=0.002$) and 74% ($P=0.001$) two months after ovariectomy. In addition, compared to the control group, OVX rats had significantly lower uterine weight by 78% (0.30 ± 0.02 vs. 1.25 ± 0.09 g; $P<0.001$) at month 11 and higher body weight by 21% (246.6 ± 5.6 vs. 205.7 ± 2.2 g; $P<0.001$) at month 2. These findings indicate successful induction of the OVX rat model. At the end of the study, OVX rats had lower LVDP by 19% (74.7 ± 3.4 vs. 92.6 ± 2.5 mm Hg, $P=0.001$), +dp/dt by 30% (2076 ± 152 vs. 2971 ± 73 mm Hg/s, $P<0.001$), and -dp/dt by 23% (1708 ± 84 vs. 2220 ± 113 mm Hg/s, $P=0.004$) than controls. At the end of the study, compared to the control group, the OVX rats had lower NOx levels in serum by 30% (20.6 ± 5.6 vs. 29.2 ± 3.5 $\mu\text{mol/L}$, $P=0.021$); heart NOx tissue was also decreased in OVX rats (17.1 ± 1.7 vs. 24.8 ± 3.2 $\mu\text{mol/L}$), but it was not statistically significant ($P=0.056$).

Conclusion

Long-term (11 months) ovariectomy impaired normal cardiac function in female rats as indicated by lower LVDP (19%), +dp/dt (30%), and -dp/dt (23%) after ovariectomy. This effect was associated with decreased serum NOx levels. These findings are in line with previous reports indicating that estradiol deficiency after menopause causes left ventricular hypertrophy and apoptosis, exacerbates cardiac function, decreases antioxidant and anti-inflammatory effects, and increases the level of free fatty acids. They all make postmenopausal women susceptible to metabolic syndrome and insulin resistance, the main risk factors for cardiovascular diseases. In addition, it has been previously reported

that estradiol deficiency following menopause decreases NO bioavailability in serum and heart tissues by decreasing endothelial NO synthase (eNOS) mRNA and protein expression in the cardiovascular system; also, it has detrimental effects on cardiac function in OVX rats. As a take-home

message, impaired cardiac function following long-term estrogen deficiency in OVX rats can prevent and treat cardiovascular disease in the post-menopausal women. However, these results need to be confirmed in humans.

اثر اوارکتومی بر عملکرد همودینامیکی و سطح متابولیت‌های اکسید نیتریک در قلب موش‌های صحرائی

نصیبه یوسف‌زاده^۱، سجاد جدی^۱، اصغر قاسمی^{۱*}

مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۱/۴/۱۱
پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۲۸
انتشار برخط: ۱۴۰۱/۵/۱۵

کلیدواژه‌ها:

- اوارکتومی
- اکسید نیتریک
- فعالیت همودینامیک قلب
- موش‌های صحرائی ماده

چکیده

زمینه. شیوع بالای بیماری‌های قلبی-عروقی در زنان بعد از یائسگی مشاهده می‌گردد. هدف این مطالعه بررسی اثر اوارکتومی طولانی‌مدت بر عملکرد همودینامیکی و متابولیت‌های اکسید نیتریک (NOx) در قلب در موش‌های صحرائی اوارکتومی شده است.

روش کار. موش صحرائی ماده نژاد ویستار (تعداد ۱۴ سر) به ۲ گروه کنترل و اوارکتومی شده تقسیم شدند. مدل اوارکتومی در موش‌های صحرائی ۶ ماهه با استفاده از روش برداشت دوطرفه تخمدان با ایجاد دو برش پوستی در ناحیه پشتی-جانبی ایجاد شد. شاخص‌های عملکرد همودینامیکی قلب شامل اختلاف فشار سیستولی با دیاستولی بطن چپ (Left ventricular developed pressure, LVDP)، حداکثر سرعت افزایش فشار در واحد زمان در بطن چپ (+dp/dt) و حداکثر سرعت کاهش فشار در واحد زمان در بطن چپ (-dp/dt) در زمان سیستول، یازده ماه بعد از اوارکتومی، اندازه‌گیری شدند. در انتهای مطالعه، سطح NOx در بطن چپ قلب و سرم اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها. در انتهای مطالعه، گروه اوارکتومی شده دارای LVDP (۱۹ درصد، $P=0/001$)، +dp/dt (۳۰ درصد، $P<0/001$) و -dp/dt (۲۳ درصد، $P=0/004$) پائین‌تر نسبت به گروه کنترل بودند. همچنین گروه اوارکتومی شده نسبت به گروه کنترل دارای سطح پایین‌تر NOx سرمی (۳۰ درصد، $P=0/021$) بود؛ سطح قلبی NOx نیز در موش‌های اوارکتومی شده پایین‌تر بود (۳۱ درصد)، اما از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P=0/056$).

نتیجه‌گیری. اوارکتومی طولانی‌مدت باعث اختلال در عملکرد همودینامیکی قلب در موش‌های صحرائی اوارکتومی شده می‌گردد که با کاهش سطح سرمی NOx همراه است. **پیامدهای عملی.** این یافته‌ها نشان دهنده اختلال عملکرد طبیعی قلب به دنبال کمبود طولانی‌مدت استروژن در موش‌های صحرائی اوارکتومی شده است، و از نظر پیشگیری و درمان مشکلات قلبی در زنان یائسه حائز اهمیت است، اما باید در انسان نیز تأیید شود.

مقدمه

عامل حفاظت‌کننده عملکرد قلبی-عروقی در زنان است. کاهش استروژن با ایجاد هیپرتروفی بطن چپ^{۱،۵}، افزایش التهاب و استرس اکسیداتیو در قلب^۶، افزایش مقاومت به انسولین^۷ و کاهش جریان خون در عروق محیطی^۸ باعث اختلال در عملکرد سیستم قلبی-عروقی در موش‌های صحرائی اوارکتومی شده^{۵،۶} و زنان یائسه^۹ می‌شود. علاوه بر کاهش استروژن، زنان در دوران یائسگی در معرض خطر بیشتری برای فشار خون بالا، دیابت و چاقی قرار دارند که این امر باعث افزایش بیشتر عوامل خطر قلبی

تعداد زنان یائسه در جهان در سال ۲۰۲۰ حدود ۱ میلیارد نفر بود، و تخمین زده می‌شود که تا سال ۲۰۵۰ به ۱/۶ میلیارد نفر برسد.^۱ زنان قبل از یائسگی ۱۰ تا ۱۵ سال دیرتر از مردان به بیماری قلبی-عروقی مبتلا می‌شوند^۲ ولی خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی بعد از یائسگی حدود ۲ تا ۴ برابر افزایش می‌یابد.^۳ همچنین زنانی که دچار یائسگی زود هنگام ناشی از جراحی شده‌اند دارای خطر بالای ابتلا به بیماری قلبی-عروقی نسبت به زنان هم‌سن خود هستند^۴ که نشان دهنده نقش استروژن به عنوان

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: Ghasemi@endocrine.ac.ir

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

گروه‌بندی موش‌های صحرایی و تأیید مدل اوارکتومی

این مطالعه از نوع مداخله‌ای تجربی است. تعداد ۱۴ سر موش صحرایی ماده از نژاد ویستار (۶ ماهه با وزن ۲۰۰-۲۲۰ گرم) با استفاده از نرم افزار اکسل به صورت تصادفی به دو گروه (۷ سر در هر گروه) تقسیم شدند: گروه کنترل و گروه اوارکتومی شده. نحوه ایجاد مدل اوارکتومی و تأیید آن بیشتر گزارش شده است.^{۲۰} به طور خلاصه موش‌های صحرایی ماده ۶ ماهه با سدیم پنتوباریتال (۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند، و مدل اوارکتومی با استفاده از روش برداشت دو طرفه تخمدان با ایجاد دو برش پوستی در ناحیه پشتی-جانبی ایجاد شد. به طور خلاصه، موش‌های صحرایی ماده بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی با سدیم پنتوباریتال (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس، مو از ناحیه جراحی با استفاده از موترش برقی کامل تراشیده شده و جهت شستن و ضدعفونی کردن محل جراحی به ترتیب از کلرهگزیدین و اتانول ۷۰ درصد و همچنین پوویدون ید استفاده شد. دو برش پوستی در ناحیه پشتی-جانبی (طول برش حدود ۱ الی ۱/۵ سانتی‌متر) بر روی پد گرم شده (۳۰-۳۵ درجه سانتیگراد) برای جلوگیری از هیپوترمی انجام شد، و مدت زمان جراحی کمتر از ۱۰ دقیقه بود. پماد ویتامین A برای محافظت از چشم استفاده شد. لازم به توضیح است که این روش نیازی به بخیه زدن عضله ندارد و زمان بهبود زخم حدود ۹-۱۰ روز بود. پس از القای مدل OVX، موش‌های صحرایی به مدت یک هفته به صورت جداگانه نگهداری شدند تا از آلودگی و بازگشایی زخم جلوگیری شود. دو ماه بعد از ایجاد مدل اوارکتومی، شاخص‌های تأییدکننده اوارکتومی شامل افزایش وزن بدن، کاهش وزن رحم (اندازه‌گیری در انتهای مطالعه) و تغییرات هورمون‌های جنسی شامل استرادیول و پروژسترون سرمی در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده اندازه‌گیری شد.

خونگیری از موش‌های صحرایی

در ابتدای مطالعه و همچنین دو ماه بعد از اوارکتومی، نمونه‌های خون پس از ۱۲ ساعت ناشتایی از دم موش‌های صحرایی جمع آوری شد، و به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ و سرم جهت اندازه‌گیری هورمون‌های جنسی جدا گردید. از سرم‌های انتهای مطالعه برای اندازه‌گیری NO_x سرمی نیز استفاده گردید. سرم‌ها تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

اندازه‌گیری هورمون‌های جنسی

برای اندازه‌گیری سطح سرمی استرادیول و پروژسترون از کیت الیزای DBC (ساخت کشور کانادا با حساسیت ۱۰ پیکوگرم بر

عروقی در آنان می‌شود.^۹ گزارش شده است که بخشی از اثرات حفاظتی استروژن بر عملکرد قلب می‌تواند از مسیر تولید اکسید نیتریک (NO) در قلب باشد.^{۱۰} NO یک مولکول کوچک با عملکردهای فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک متعدد در قلب می‌باشد.^{۱۱} کاهش سطح سرمی متابولیت‌های اکسید نیتریک (NO_x) در موش‌های صحرایی^{۱۲} و همچنین در زنان بئسه گزارش شده است.^{۱۳} در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده، ۵، ۶، ۸ و ۱۰ هفته بعد از اوارکتومی، تغییر معنی‌داری در عملکرد همودینامیکی قلب نسبت به قبل از اوارکتومی مشاهده نشده است.^{۱۴-۱۷} مطالعات انجام شده درباره اثر اوارکتومی بر عملکرد همودینامیکی، همگی کوتاه مدت (کمتر از ۱۰ هفته) بوده و اثر طولانی مدت آن هنوز بررسی نشده است. اثرات اوارکتومی در کوتاه‌مدت و بلند-مدت می‌تواند متفاوت از هم باشد، به طور مثال اثر اوارکتومی بر عملکرد سیستم عصبی و همچنین پارامترهای رفتاری و استرس فقط در موش‌های صحرایی اوارکتومی‌شده در بلندمدت (بیشتر از ۳ ماه) گزارش شده است.^{۱۸} بنابراین هدف مطالعه حاضر تعیین اثر طولانی مدت (۱۱ ماه) اوارکتومی بر عملکرد همودینامیکی و سطح متابولیت‌های اکسید نیتریک در قلب موش‌های صحرایی ماده است.

روش کار حیوانات

این مطالعه با کد اخلاق کار با حیوانات به شماره IR.SBMU.ENDOCRINE.REC.1400.105 و مطابق با قوانین نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی ایران^{۱۹} انجام گرفته است. موش‌های صحرایی ماده در حیوانخانه پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با شرایط استاندارد شامل دمای ۲۳±۲ درجه سلسیوس و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. بر اساس مطالعه پایلوت انجام شده در ۳ نمونه، در مورد اثر اوارکتومی بر عملکرد همودینامیکی قلب، انحراف معیار LVDP در گروه کنترل و اوارکتومی‌شده به ترتیب ۵/۳ و ۱۰/۵ بود. بنابراین با در نظر گرفتن سطح α دو طرفه ۰/۰۵، توان ۸۰ درصد و همچنین اختلاف میانگین ۱۲ میلی‌متر جیوه برای LVDP، حجم نمونه در هر گروه بر اساس فرمول زیر ۷ سر موش تعیین شد.

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})^2 \times (S_1^2 + S_2^2)}{d^2} = \frac{(1.96 + 0.84)^2 \times (5.3^2 + 10.5^2)}{12^2} = 7$$

اتیلین‌دی آمیددی هیدروکلرید (۱٪ درصد) اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. رنگ به دست آمده در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد (۰ تا ۱۰۰ میکرومولار نیترات سدیم) غلظت نمونه‌ها محاسبه شد.

آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ انجام شد. تمامی نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (Mean \pm SEM) گزارش شده‌اند. برای آنالیز نتایج مربوط به وزن بدن، وزن رحم، متغیرهای همودینامیکی قلب و همچنین NO_x سرمی و قلبی در بین دو گروه از آزمون تی‌استیودنت استفاده شده است. همچنین، برای مقایسه هورمون‌های جنسی قبل و بعد از اوارکتومی از روش آزمون t وابسته استفاده گردید. سطح معنی‌داری در کلیه موارد $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

تأیید اوارکتومی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دو ماه بعد از اوارکتومی، موش‌های صحرایی ماده دارای سطح سرمی پایین‌تر استرادیول (۹۰ درصد، $P = 0.002$) و پروژسترون (۷۴ درصد، $P = 0.001$) نسبت به ابتدای مطالعه بودند. همچنین اوارکتومی منجر به افزایش وزن بدن دو ماه بعد از اوارکتومی (۲۱ درصد، $P < 0.001$) و کاهش وزن رحم ۱۱ ماه بعد از اوارکتومی (۷۸ درصد، $P < 0.001$) گردید (شکل ۱).

اثر اوارکتومی بر عملکرد همودینامیکی قلب

نتایج اندازه‌گیری پارامترهای همودینامیکی قلب در گروه‌های مورد آزمایش نشان داد که LVDP (۱۹ درصد، $P = 0.001$)، $+dp/dt$ و $-dp/dt$ (به ترتیب ۳۰ درصد، $P < 0.001$ و ۲۳ درصد، $P = 0.004$) در گروه اوارکتومی‌شده نسبت به گروه کنترل پائین‌تر بود که مشخص‌کننده اختلال عملکرد همودینامیکی قلب در موش‌های صحرایی اوارکتومی‌شده است (شکل ۲).

اثر اوارکتومی بر سطح NO_x سرمی و قلبی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سطح NO_x در سرم موش‌های صحرایی اوارکتومی‌شده نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌دار (۳۰ درصد، $P = 0.021$) کمتر بود و در بافت قلب با وجود اختلاف ۳۱ درصدی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود ($P = 0.056$)، شکل ۳).

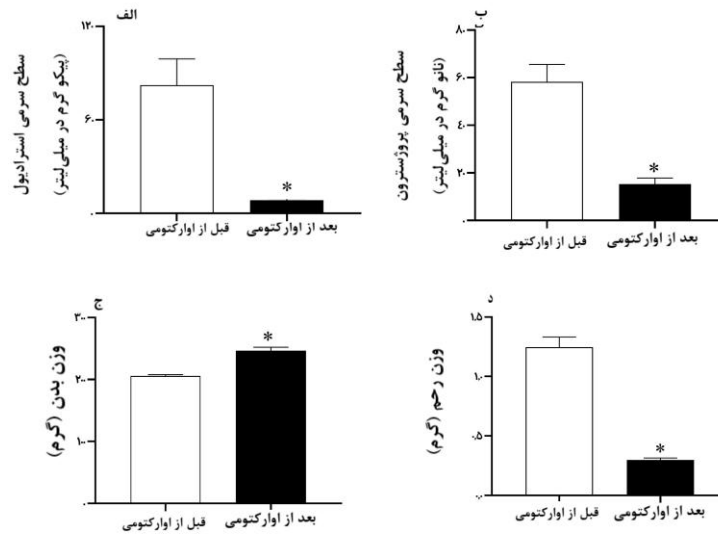
میلی‌لیتر برای استرادیول و ۱٪ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای پروژسترون) استفاده شد. ضریب تغییرات درون آزمونی برای سطح سرمی استرادیول و پروژسترون به ترتیب کمتر از ۵ و ۶ درصد بود.

روش جراحی و ثبت متغیرهای همودینامیکی در موش‌های صحرایی ماده

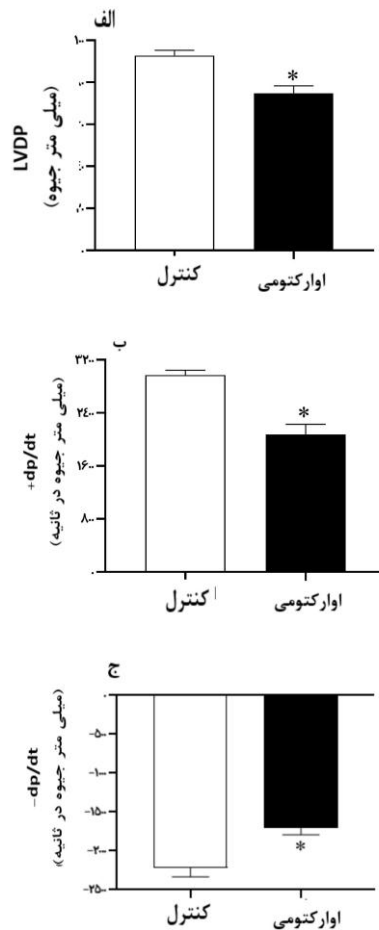
پس از ایجاد بیهوشی با سدیم پنتوباریتال (۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، موش‌های صحرایی در گروه کنترل و اوارکتومی‌شده بر روی صفحه جراحی ثابت شده و به منظور دسترسی به آئورت، قفسه سینه باز شد. جهت این کار، در ناحیه شکم موش صحرایی شکافی عرضی ایجاد شد، و شکاف تا مجاورت دیافراگم با قیچی امتداد داده شده و دیافراگم با احتیاط برداشته شد. پس از بریدن دیافراگم، دنده‌ها از دو طرف راست و چپ بریده شده و تا دنده اول ادامه داده شد. سپس، قلب از بدن موش‌های صحرایی به سرعت خارج و آئورت قلب به کاتول نصب شده روی دستگاه لانگندورف وصل و شیر مربوط به محلول کربس (حاوی کربوژن) باز و جریان برقرار گردید. برای ثبت متغیرهای همودینامیکی قلب، بالون مخصوص داخل بطنی متصل به کاتتر که از سمت دیگر به ترانس‌دوسر فشار متصل بود به آرامی از طریق دریچه میتال وارد بطن چپ گردید. شاخص‌های عملکرد همودینامیکی قلب به سیستم پاورلب جهت ثبت، ذخیره و پردازش اطلاعات فرستاده شد. این شاخص‌ها شامل اختلاف فشار سیستمی با دیاستولی بطن چپ (LVDP)، حداکثر سرعت افزایش فشار در واحد زمان در بطن چپ ($+dp/dt$) و حداکثر سرعت کاهش فشار در واحد زمان در بطن چپ ($-dp/dt$) در زمان سیستمی می‌باشند. قلب تمامی گروه‌ها بعد از ثبت همودینامیکی برای اندازه‌گیری NO_x، در نیتروژن مایع وارد شده و سپس در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس ذخیره شدند.

اندازه‌گیری NO_x سرمی و قلبی

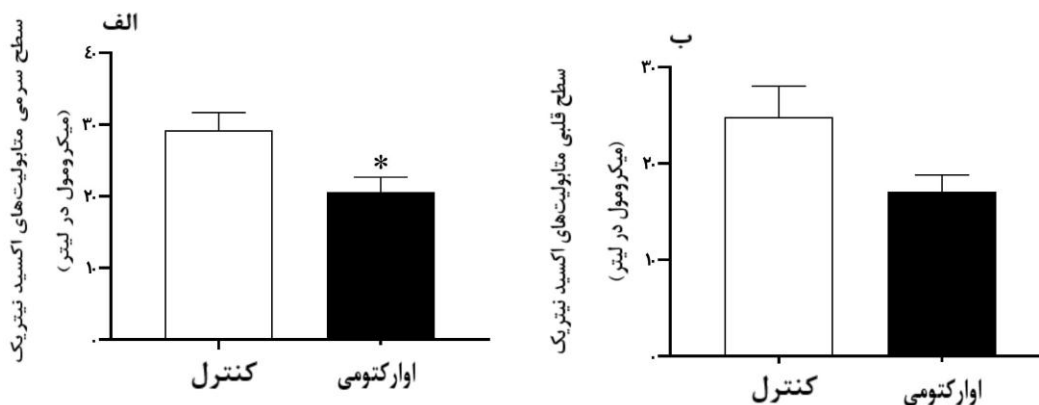
نمونه‌های قلبی جدا شده از موش‌های صحرایی با استفاده از بافر فسفات با نسبت ۱ به ۵ (وزنی-حجمی) هوموژن گردید. برای اندازه‌گیری NO_x سرمی و قلبی از روش گریس استفاده شد. به این صورت که نمونه‌ها (سرم یا هوموژن قلب) با استفاده از سولفات روی (۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) پروتئین‌زدایی شدند. سپس به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بالایی، ۱۰۰ میکرولیتر وانادیوم کلرید III (۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه شد تا نیترات را به نیتريت احیا کند. سپس ۵۰ میکرولیتر سولفانیل آمید (۲ درصد) و ۵۰ میکرولیتر



شکل ۱. اثر اوارکتومی بر سطح سرمی استرادیول (الف)، پروژسترون (ب)، وزن بدن (ج) و وزن رحم (د) در موش‌های صحرایی. یافته‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین بیان شده‌اند. * تفاوت معنی‌دار نسبت به ابتدای مطالعه و قبل از ایجاد مدل اوارکتومی را نشان می‌دهند. تعداد موش‌های صحرایی ۷ سر است.



شکل ۲. اثر اوارکتومی بر LVDP (الف)، +dp/dt (ب) و -dp/dt (ج) در موش‌های صحرایی. یافته‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین بیان شده‌اند. * تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهند. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۷ سر است.



شکل ۳. اثر اوارکتومی بر سطح سرمی (الف) و قلبی (ب) متابولیت‌های اکسید نیتریک در موش‌های صحرایی. یافته‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین بیان شده‌اند. * تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهند. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۷ سر است.

بحث

دارد. این اثرات در مجموع منجر به افزایش وزن بدن و چاقی در موش‌های اوارکتومی شده می‌گردد.^{۲۱} نتایج مطالعه نشان داد که عملکرد همودینامیکی قلب در گروه اوارکتومی شده، ۱۱ ماه بعد از اوارکتومی پایین‌تر از گروه کنترل بود که نشان دهنده تضعیف عملکرد طبیعی قلب در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده می‌باشد. اگرچه اثر اوارکتومی طولانی مدت (۱۱ ماه) بر عملکرد همودینامیکی گزارش نشده است، ولی اوارکتومی کوتاه‌مدت اثری بر عملکرد همودینامیکی پایه قلب ندارد به طوری که ۶ هفته بعد از اوارکتومی، تغییر معنی‌داری در عملکرد همودینامیکی قلب در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده مشاهده نشده است.^{۱۶} نتایج مشابهی ۵^{۱۴} و ۱۰^{۱۷} هفته بعد از اوارکتومی نیز گزارش شده است. به نظر می‌رسد مدت زمان بعد از اوارکتومی (مدت زمان مواجهه با کمبود هورمون‌های جنسی به ویژه استرادیول) در تفاوت اثرات کوتاه‌مدت و بلندمدت اوارکتومی بر قلب نقش داشته باشد. تضعیف عملکرد همودینامیکی قلب مشاهده شده در مطالعه حاضر می‌تواند به علت کمبود استرادیول طولانی‌مدت در این موش‌ها باشد. کمبود استرادیول پس از یائسگی باعث هیپرتروفی بطن چپ و اختلال عملکرد سیستمولیک می‌شود که با افزایش آپوپتوز قلبی همراه بوده و به طور بالقوه در ایجاد نارسایی قلبی نقش دارد.^۵ علاوه بر این، کاهش استروژن، التهاب قلبی و استرس اکسیداتیو را افزایش می‌دهد که منجر به تشدید فیبروز میوکارد و اختلال عملکرد دیاستولیک در موش‌های صحرایی ماده با پرفشاری خون می‌شود.^۶ از بین رفتن اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی استروژن نیز ممکن است نقش مهمی در ایجاد این اثرات تخریبی در قلب موش‌های اوارکتومی شده داشته باشد.^{۲۲} علاوه بر این، کاهش قابل

یافته‌های این مطالعه نشان داد که اوارکتومی در طولانی مدت سبب کاهش قدرت انقباضی قلب در موش‌های صحرایی می‌شود که با کاهش شاخص‌های همودینامیکی در قلب نشان داده شد؛ این کاهش قدرت انقباضی با کاهش سطح NOx سرمی همراه بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که موش‌های صحرایی اوارکتومی شده (دو ماه بعد از اوارکتومی در سن ۸ ماهگی)، دارای سطح پایین‌تر استرادیول (۹۰ درصد) و پروژسترون (۷۴ درصد) در سرم نسبت به ابتدای مطالعه بودند. همچنین، کاهش ۷۸ درصدی وزن رحم (پانزده ماه بعد از اوارکتومی در سن ۱۷ ماهگی) و افزایش ۲۱ درصدی وزن بدن (دو ماه بعد از اوارکتومی در سن ۸ ماهگی) در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده مشاهده شد. مجموع این نتایج نشان‌دهنده موفقیت ایجاد مدل اوارکتومی در موش‌های صحرایی ماده است. این داده‌ها با گزارش قبلی ما^{۲۱} و همچنین نتایج ارائه شده در یک مقاله مروری^۴ در مورد ایجاد مدل اوارکتومی در موش‌های صحرایی هم‌خوانی دارد. در این راستا، کاهش ۵۰ تا ۹۰ درصدی سطح سرمی استرادیول و پروژسترون، افزایش ۵ الی ۲۰ درصدی وزن بدن و کاهش ۷۰ الی ۹۰ درصدی وزن رحم در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده گزارش شده است.^{۲۱، ۲۰} کمبود استروژن به دنبال اوارکتومی منجر به افزایش چربی احشایی، توزیع چربی‌های بدن از نواحی محیطی به شکم، کاهش فعالیت بدنی و مصرف انرژی بدون تغییر در مصرف غذا و همچنین افزایش شاخص توده بدن و شاخص لی در موش‌های اوارکتومی شده می‌گردد.^{۲۱} همچنین گزارش شده است که افزایش اندازه سلول‌های چربی به دلیل افزایش لیپوژنز و کاهش لیپولیز در سلول‌های چربی به دنبال کمبود استروژن وجود

پیشنهادها

پیشنهاد می‌گردد برای شناخت بیشتر اثر اوارکتومی بر عملکرد سیستم قلبی-عروقی، اثر اوارکتومی طولانی‌مدت بر سایر پارامترهای عملکرد سیستم قلبی-عروقی (به طور مثال فشار خون) و همچنین مسیرهای مولکولی درگیر در عملکرد سیستم قلبی-عروقی (به طور مثال آنزیم‌های تولیدکننده اکسید نیتریک در قلب) بررسی گردد.

قدردانی‌ها

نویسندگان از پژوهشکده غدد و همچنین از مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی جهت تهیه موش‌های صحرایی این مطالعه تشکر و قدردانی میکنند.

منابع مالی

این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران با گرنت شماره [۴-۲۸۷۵۹] حمایت شده است.

دسترس پذیری داده‌ها

داده‌های ایجاد شده در مطالعه فعلی در صورت درخواست معقول از پدیدآور رابط ارائه می‌گردد.

مشارکت پدیدآوران

اصغر قاسمی و سجاد جدی طراحی مطالعه، نصیبه یوسف زاده و سجاد جدی اجرا مطالعه، اصغر قاسمی و نصیبه یوسف زاده تحلیل نتایج، همه نویسندگان تهیه دست نوشته، تنظیم مطالعه و همچنین تألیف مقاله و تأیید نسخه نهایی را برعهده داشتند.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کد اخلاق کار با حیوانات به شماره IR.SBMU.ENDOCRINE.REC.1400.105 و مطابق با قوانین نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی ایران انجام گرفته است.

تعارض منافع

مؤلفان اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تألیف یا انتشار این مقاله وجود ندارد.

توجه استرادیول به دنبال یائسگی سطح اسیدهای چرب آزاد را افزایش می‌دهد، که زنان یائسه را بیشتر در معرض ابتلا به سندرم متابولیک و مقاومت به انسولین قرار می‌دهد، که از عوامل خطر بیماری قلبی-عروقی در نظر گرفته می‌شود.^{۲۳}

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اوارکتومی موجب کاهش سطح سرمی و قلبی NOx در انتهای مطالعه (۱۱ ماه بعد از اوارکتومی) گردید، هر چند کاهش NOx قلبی از نظر آماری معنی‌دار نگردید. هم‌جهت با مطالعه حاضر کاهش سطح NOx سرمی در موش‌های صحرایی اوارکتومی‌شده ۸^{۲۴} و ۱۲^{۲۵} هفته بعد از اوارکتومی گزارش شده است. همچنین، کاهش نیتریت و نه NOx در قلب موش‌های صحرایی به دنبال ۹ هفته اوارکتومی گزارش شده است.^{۲۶} کاهش سطح سرمی NOx نیز در زنان به دنبال برداشت تخمدان^{۲۷} یا یائسگی^{۲۸} مشاهده می‌گردد. استرادیول با افزایش بیان mRNA و پروتئین eNOS، فراهمی زیستی NO را حفظ می‌کند، بنابراین تولید NO را در سلول‌های قلبی-عروقی افزایش می‌دهد.^{۲۸} واسمن و همکاران نشان دادند که رالوکسیفن، فعال‌کننده انتخابی گیرنده استرادیول، فراهمی زیستی NO را با افزایش بیان mRNA ژن eNOS و فعالیت eNOS در آئورت موش‌های با فشار خون افزایش می‌دهد.^{۲۹} پس از یائسگی، علاوه بر کاهش NO، به دلیل کاهش عملکرد آنتی‌اکسیدانی استرادیول، زنان یائسه نسبت به زنان در سنین باروری بیشتر در معرض بروز بیماری قلبی-عروقی قرار می‌گیرند.^{۳۰} بنابراین، در مطالعه حاضر کاهش طولانی‌مدت استرادیول سرمی می‌تواند با کاهش سطح NOx سرمی منجر به اختلال در عملکرد همودینامیکی قلب در حالت پایه گردد. از نقاط قوت این مطالعه می‌توان به مدل اوارکتومی استفاده شده اشاره کرد. مدل اوارکتومی در مطالعه حاضر، بیشتر ویژگی‌های مشاهده شده در زنان یائسه را نشان می‌دهد و مدل مناسبی برای ارزیابی اثرات مداخلات دارویی است.^{۳۰} محدودیت اصلی مطالعه حاضر عدم بررسی بیان ژن‌های درگیر در بیان آنزیم‌های تولیدکننده NO به دنبال کاهش طولانی‌مدت استرادیول و اثر آن بر عملکرد پایه قلب در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده است.

نتیجه‌گیری

اوارکتومی طولانی‌مدت باعث اختلال در عملکرد همودینامیکی قلب در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده گردید که با کاهش سطح سرمی NOx همراه بود.

References

- 1 Zhang GQ, Chen JL, Luo Y, Mathur MB, Anagnostis P, Nurmatov U, et al. Menopausal hormone therapy and women's health: An umbrella review. *PLoS Med.* 2021 Aug 2;18(8):e1003731. doi: 10.1371/journal.pmed.1003731.
- 2 Maas AH, Appelman YE. Gender differences in coronary heart disease. *Neth Heart J.* 2010 Dec;18(12):598-602. doi: 10.1007/s12471-010-0841-y.
- 3 Costello BT, Sprung K, Coulter SA. The Rise and Fall of Estrogen Therapy: Is Testosterone for "Menopause" Next? *Tex Heart Inst J.* 2017 Oct 1;44(5):338-40. doi: 10.14503/THIJ-17-6360.
- 4 Yoshida Y, Chen Z, Baudier RL, Krousel-Wood M, Anderson AH, Fonseca VA, et al. Early Menopause and Cardiovascular Disease Risk in Women With or Without Type 2 Diabetes: A Pooled Analysis of 9,374 Postmenopausal Women. *Diabetes Care.* 2021 Nov;44(11):2564-72. doi: 10.2337/dc21-1107.
- 5 Brower GL, Gardner JD, Janicki JS. Gender mediated cardiac protection from adverse ventricular remodeling is abolished by ovariectomy. *Mol Cell Biochem.* 2003 Sep;251(1-2):89-95.
- 6 Mori T, Kai H, Kajimoto H, Koga M, Kudo H, Takayama N, et al. Enhanced cardiac inflammation and fibrosis in ovariectomized hypertensive rats: a possible mechanism of diastolic dysfunction in postmenopausal women. *Hypertension Research.* 2011 Apr;34(4):496-502. doi: 10.1038/hr.2010.261.
- 7 Yan H, Yang W, Zhou F, Li X, Pan Q, Shen Z, et al. Estrogen improves insulin sensitivity and suppresses gluconeogenesis via the transcription factor Foxo1. *Diabetes.* 2019 Feb 1;68(2):291-304. doi: 10.2337/db18-0638.
- 8 Volterrani M, Rosano G, Coats A, Beale C, Collins P. Estrogen acutely increases peripheral blood flow in postmenopausal women. *The American journal of medicine.* 1995 Aug 1;99(2):119-22. doi: 10.1016/s0002-9343(99)80130-2.
- 9 El Khoudary SR, Aggarwal B, Beckie TM, Hodis HN, Johnson AE, Langer RD, et al. Menopause Transition and Cardiovascular Disease Risk: Implications for Timing of Early Prevention: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2020 Dec 22;142(25):e506-32.
- 10 Mendelsohn ME. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The American journal of cardiology.* 2002 Jun 20;89(12):12-7. doi: 10.1016/s0002-9149(02)02405-0.
- 11 Koul K, LaPenna K, Li Z, Doiron J, Wang J, Sharp III TE, et al. Nitric Oxide Therapy Attenuates Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *The FASEB Journal* 2022;36:10-18.
- 12 Hernández I, Delgado JL, Díaz J, Quesada T, Teruel MJ, Llanos MC, et al. 17 β -Estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 2000 Nov 1;279(5):R1599-605.
- 13 Rosselli M, Imthurn B, Keller PJ, Jackson EK, Dubey RK. Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 β -estradiol and norethisterone acetate: a two-year follow-up study. *Hypertension.* 1995 Apr;25(4):848-53.
- 14 Tang Y, Li S, Zhang P, Zhu J, Meng G, Xie L, et al. Soy isoflavone protects myocardial ischemia/reperfusion injury through increasing endothelial nitric oxide synthase and decreasing oxidative stress in ovariectomized rats. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2016 Feb 1;2016:2.
- 15 Bhuiyan MS, Shioda N, Fukunaga K. Ovariectomy augments pressure overload-induced hypertrophy associated with changes in Akt and nitric oxide synthase signaling pathways in female rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.* 2007 Dec;293(6):E1606-14.
- 16 Shinmura K, Nagai M, Tamaki K, Bolli R. Loss of ischaemic preconditioning in ovariectomized rat hearts: possible involvement of impaired protein kinase C ϵ phosphorylation. *Cardiovascular research.* 2008 Aug 1;79(3):387-94. doi: 10.1093/cvr/cvn086.
- 17 Hügel S, Reincke M, Strömer H, Winning J, Horn M, Dienesch C, et al. Evidence against a role of physiological concentrations of estrogen in post-myocardial infarction remodeling. *Journal of the American College of Cardiology.* 1999 Nov 1;34(5):1427-34. doi: 10.1016/S0735-1097(99)00368-X.
- 18 De Chaves G, Moretti M, Castro AA, Dagostin W, Da Silva GG, Boeck CR, et al. Effects of long-term ovariectomy on anxiety and behavioral despair in rats. *Physiology & behavior.* 2009 Jun 22;97(3-4):420-5. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.03.016.
- 19 Ahmadi-Noorbakhsh S, Mirabzadeh Ardakani E, Sadighi J, Aldavood SJ, Farajli Abbasi M, Farzad-Mohajeri S, et al. Guideline for the care and use of

- laboratory animals in Iran. *Lab Animal*. 2021 Nov;50(11):303-5. doi: 10.1038/s41684-021-00871-3.
- 20 Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, Ghasemi A. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. *EXCLI journal*. 2020;19:89.
- 21 Yousefzadeh N, Jeddi S, Shokri M, Afzali H, Norouzirad R, Kashfi K, et al. Long Term Sodium Nitrate Administration Positively Impacts Metabolic and Obesity Indices in Ovariectomized Rats. *Archives of medical research*. 2022 Feb 1;53(2):147-56. doi: 10.1016/j.arcmed.2021.09.007.
- 22 Balci H, Altunyurt S, Acar B, Fadiloglu M, Kirkali G, Onvural B. Effects of transdermal estrogen replacement therapy on plasma levels of nitric oxide and plasma lipids in postmenopausal women. *Maturitas*. 2005 Apr 11;50(4):289-93.
- 23 Keck C, Taylor M. Emerging research on the implications of hormone replacement therapy on coronary heart disease. *Current Atherosclerosis Reports*. 2018 Dec;20(12):1-4. doi: 10.1007/s11883-018-0758-2.
- 24 Ma J, Granton PV, Holdsworth DW, Turley EA. Oral administration of hyaluronan reduces bone turnover in ovariectomized rats. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013 Jan 16;61(2):339-45. doi: 10.1021/jf300651d.
- 25 Guo JD, Li L, Shi YM, Wang HD, Hou SX. Hydrogen water consumption prevents osteopenia in ovariectomized rats. *British journal of pharmacology*. 2013 Mar;168(6):1412-20. doi: 10.1111/bph.12036.
- 26 Jessup JA, Zhang L, Presley TD, Kim-Shapiro DB, Wang H, Chen AF, et al. Tetrahydrobiopterin restores diastolic function and attenuates superoxide production in ovariectomized mRen2. Lewis rats. *Endocrinology*. 2011 Jun 1;152(6):2428-36.
- 27 Selahattin K, Suleyman A, Azer A, MF G, Funda G. Effects of surgical menopause and ERT on Serum Paraoxonase activity and Plasma Malondialdehyde concentration. *Gynecol Obstet Investig*. 2005;59:108-12. doi: 10.1159/000082647.
- 28 Stirone C, Chu Y, Sunday L, Duckles SP, Krause DN. 17 Beta-estradiol increases endothelial nitric oxide synthase mRNA copy number in cerebral blood vessels: quantification by real-time polymerase chain reaction. *Eur J Pharmacol*. 2003;478:35-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2003.08.037.
- 29 Wassmann S, Laufs U, Stamenkovic D, Linz W, Stasch JP, Ahlbory K, et al. Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension by reduced oxidative stress and enhanced nitric oxide production. *Circulation*. 2002 Apr 30;105(17):2083-91. doi: 10.1161/01.cir.0000014618.91633.67
- 30 Díaz A, López-Grueso R, Gambini J, Monleón D, Mas-Bargues C, Abdelaziz KM, et al. Sex Differences in Age-Associated Type 2 Diabetes in Rats-Role of Estrogens and Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Apr 7;2019:6734836.