

Cardioprotective effects of simvastatin-loaded nano-niosomes on cardiomyocytes in cardiac ischemia

Nahid Aboutaleb^{1,2}, Mahdih Mehrab Mohseni², Maryam Naseroleslami^{3*}¹Physiology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran²Department of Physiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran³Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 24 Dec 2022

Accepted: 30 Jan 2023

ePublished: 17 Jun 2023

Keywords:

- Reperfusion
- Simvastatin
- Niosomes
- Ischemia
- Apoptosis
- Autophagy

Abstract

Background. Cardiac ischemia is the major cause of morbidity and mortality which can be increased by Statins. This study aimed to increase the effectiveness of simvastatin in the form of niosomes.

Methods. In this study, 25 male Wistar rats were divided into 5 groups: control, ischemia (induced by closed LAD), ischemia receiving nano-niosomes, ischemia receiving simvastatin, and ischemia receiving simvastatin-loaded nano-niosomes. One month after the drug injection, RNA was extracted from the heart tissue of the studied groups, cDNA was synthesized, and a real-time PCR test was performed using specific primers. SPSS 21.0 software was used for statistical analysis. Analysis of variance was used to investigate the effect of the interventions, and Tukey's post hoc test was used to investigate a significant difference ($P<0.05$) between the control groups and other groups as well as between intervention groups.

Results. Apoptosis and autophagy increased significantly in the ischemia group compared to the control group ($P<0.05$). In the simvastatin-loaded nano-niosomes group, compared to the simvastatin group, apoptosis and autophagy showed a significant decrease ($P<0.05$), and also in both simvastatin-loaded nano-niosomes and simvastatin group, compared to the control group, apoptosis and autophagy showed a significant decrease. ($P<0.05$).

Conclusion. Simvastatin is an effective drug in the recovery of cardiac ischemia, but the main problem in using simvastatin is its instability and degradability, and the use of its niosomes form solves this problem properly.

Practical Implications. Simvastatin-loaded nano-niosomes is more effective in reducing heart ischemia damage compared to simvastatin.

How to cite this article: Aboutaleb N, Mehrab Mohseni M, Naseroleslami M. Cardioprotective Effects of Simvastatin-loaded Nano-niosomes on Cardiomyocytes in Cardiac Ischemia. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2023;45(3):211-223. doi: 10.34172/mj.2023.026. Persian.

Extended Abstract

Background

Cardiac ischemia is one of the major causes of morbidity and mortality all over the world and it

occurs when the coronary blood flow is reduced. In heart diseases, the death of myocytes mostly happens in the form of apoptosis, necrosis, necroptosis, and

*Corresponding author; Email: naseroleslami@gmail.com

autophagy. In this situation, the healthy myocytes have to compensate for the duty of the damaged muscles which leads to heart enlargement and myocyte weakness. Therefore, treatments are necessary to deal with these complications. One of the treatment methods is drug therapy. Various drugs are prescribed for ischemia including Statins which have anti-inflammatory, vasodilation, antioxidant, anti-apoptotic, and anti-fibrosis effects. But the rapid elimination of it decreases the related effects in the body. The use of pharmaceutical carriers like niosomes can increase its efficiency. Therefore, we synthesized simvastatin-loaded nano-niosomes and compared its effect with simvastatin on the death rate of cardiomyocytes by assessing apoptosis and autophagy in male rats suffering from cardiac ischemia.

Methods

In this study, 25 male Wistar rats were divided into 5 groups: control, ischemia (induced by closed LAD), ischemia receiving nano-niosomes, ischemia receiving simvastatin, and ischemia receiving simvastatin-loaded nano-niosomes. One month after the drug injection, RNA was extracted from the heart tissue of the studied groups, and cDNA was synthesized to perform the reverse transcription reaction using the forward and reverse primers of the genes. Then, real-time PCR was done. The β -actin gene was used as an internal control. SPSS 21.0 software was used for statistical analysis. The results were expressed as mean \pm standard deviation. Analysis of variance was used to examine the effect of the interventions, and Tukey's post hoc test was used to examine the significant differences between the control groups and other groups as well as between two intervention groups. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

The results showed that the samples of the control group had zero standard deviation and the highest mean was observed in this group whereas the lowest average belonged to the *BCL2* gene. Furthermore, the results of Tukey's post hoc test showed the effectiveness of interventions on the expression of different genes. In our investigations,

all *BCL2*, *BAX*, *P53*, *LC3*, *Beclin-1*, and *Atg3* variables were expressed significantly different in the control, ischemia, niosomes, simvastatin, and simvastatin-loaded nano-niosomes groups. Based on Tukey's post hoc test, a statistically significant difference was observed between the control group and other groups. To investigate apoptosis, the expression of genes; *P53*, *BAX*, and *BCL2* were measured and in the ischemia group, compared to the control group, the expression level of *P53* and *BAX* genes were increased, and the expression level of *P53* and *BAX* genes were decreased in the simvastatin-loaded nano-niosomes group compared to simvastatin. Also, the mentioned genes were under-expressed in the Simvastatin-loaded nano-niosomes and simvastatin groups compared to the control group. While in the ischemia group compared to the control group, the expression level of the *BCL2* gene was decreased and the expression level of the mentioned gene was increased in the simvastatin-loaded nano-niosomes group compared to the simvastatin group. Also, the expression of the *BCL2* gene was increased in simvastatin-loaded nano-niosomes and simvastatin groups compared to the control ($P < 0.05$). To investigate autophagy, the expression of *LC3*, *Atg3*, and *Beclin-1* genes was measured and it was observed that the expression of *LC3*, *Atg3*, and *Beclin-1* genes was increased in the ischemia group compared to the control group, and the expression level of all three mentioned genes was decreased in the simvastatin-loaded nano-niosomes group compared to simvastatin. Also, the expression of the mentioned genes was decreased in simvastatin-loaded nano-niosomes and simvastatin groups compared to the control ($P < 0.05$).

Conclusion

Based on our results, *P53* and *BAX* genes were over-expressed in the ischemia group compared to the control group, and in the simvastatin-loaded nano-niosomes group, these genes were decreased compared to simvastatin. However, in the ischemia group, compared to the control group, the *BCL2* gene was under-expressed, and in the simvastatin-loaded nano-niosomes group, this gene was over-expressed compared to simvastatin. Also, in the ischemia group compared to the control group, *LC3*,

Atg3, and *Beclin-1* genes were over-expressed, and in the simvastatin-loaded nano-niosomes group, these three genes were under-expressed compared to simvastatin group. In parallel with our findings, Durak et al. introduced niosome-encapsulated drugs for the treatment of eye disorders. Aboutaleb et al. also showed an increase in drug penetration in nefopam niosomes compared to nefopam oral solution. Brady et al. reported similar issues in I/R,

autophagy, and apoptosis overlap. Because *Bcl-2* inhibits Beclin1-dependent autophagy, activation of Beclin1-mediated autophagy during reperfusion is associated with *Bcl-2* change, which may lead to apoptosis. Another molecule that links autophagy and apoptosis is Bnip3, a proapoptotic member of the *Bcl-2* family. According to this study, Bnip3 regulates autophagy in cardiac I/R.

اثرات محافظ قلبی نانو-نیوزوم‌های بارگیری شده با سیمواستاتین بر کاردیومیوسیت‌ها در ایسکمی قلبی

ناهید ابوطالب^{۱،۲}، مهدیه مهرباب محسنی^۲، مریم نصرالاسلامی^{۳*}

^۱مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

^۲گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

^۳گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۳

پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۰

انتشار برخط: ۱۴۰۱/۰۳/۲۷

کلید واژه‌ها:

- رپرفیوژن
- سیمواستاتین
- نیوزوم
- ایسکمی
- آپوپتوز
- اتوفازی

چکیده

زمینه. ایسکمی قلبی علت اصلی مرگ‌ومیر بوده و استاتین‌ها آن را بهبود می‌بخشند. هدف از این مطالعه افزایش اثربخشی سیمواستاتین نیوزومه شده است.

روش کار. تعداد ۲۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به ۵ گروه کنترل، ایسکمی (القا شده با LAD بسته شده)، ایسکمی قلبی دریافت کننده نیوزوم، ایسکمی قلبی دریافت کننده سیمواستاتین و دریافت کننده سیمواستاتین نیوزومه شده تقسیم شدند. یک ماه پس از تزریق دارو، از بافت قلب گروه‌های مورد مطالعه، پس از استخراج RNA، cDNA تولید و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آزمون ریل تایم PCR انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد. برای بررسی تأثیر مداخلات از تحلیل واریانس و سپس از آزمون تعقیبی توکی برای بررسی وجود تفاوت معنادار $P < 0/05$ بین گروه‌های کنترل، گروه‌های مداخله و سایر گروه‌ها استفاده شد.

یافته‌ها. آپوپتوز و اتوفازی در گروه ایسکمی نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت $P < 0/05$. در گروه سیمواستاتین نیوزومه شده در مقایسه با گروه سیمواستاتین، آپوپتوز و اتوفازی کاهش معناداری یافتند $P < 0/05$. همچنین در گروه‌های سیمواستاتین نیوزومه شده و سیمواستاتین در مقایسه با گروه ایسکمی، آپوپتوز و اتوفازی کاهش معناداری یافت $P < 0/05$.

نتیجه‌گیری. سیمواستاتین داروی مؤثر در بهبود ایسکمی قلبی است اما مشکل اصلی در استفاده از سیمواستاتین ناپایداری و تجزیه‌پذیری آن است و استفاده از شکل نیوزومه آن این مشکل را حل می‌کند.

پیامدهای عملی. سیمواستاتین نیوزومه شده در مقایسه با سیمواستاتین در کاهش آسیب ایسکمی قلبی مؤثرتر است.

مقدمه

بیشتر به صورت آپوپتوز، نکروز، نکروپتوزیس و اتوفازی دیده شده و میوسیت‌های سالم قلب تحت فشار قرار گرفته و منبسط می‌شوند تا کار ماهیچه‌های آسیب دیده را انجام دهند. این انبساط سبب بزرگ شدن قلب و بازآرایی (ریمادلینگ) می‌شود. در اثر این کشش‌های سخت، ماهیچه‌های قلبی ضعیف می‌شوند. بنابراین ممکن است بازآرایی در کوتاه‌مدت سبب بهبود عملکرد قلب شود اما در طولانی‌مدت خطر ابتلا به نارسایی قلبی را افزایش می‌دهد^۱ و برای مقابله با این عوارض اقدامات درمانی ضروری است. یکی از این اقدامات، دارو درمانی است. داروهای مختلفی مانند استاتین‌ها برای ایسکمی تجویز می‌شوند. اثرات متنوع

ایسکمی قلبی یکی از عوامل اصلی مرگ‌ومیر در جهان بوده و زمانی که جریان خون کرونر به اندازه‌ای کاهش یابد که قادر به تأمین اکسیژن مورد نیاز بافت نباشد، به وجود می‌آید. پیامدهای مخرب ایسکمی شامل نقص در عملکرد انقباضی میوسیت‌ها، اتمام ذخایر آدنوزین تری فسفات (ATP)، اتمام گلوکز، اختلال در تعادل یونی و متورم شدن سلول‌ها است. با این حال ثابت شده با برقراری مجدد جریان خون، اثرات مخرب ایسکمی تعدیل شده و عملکرد انقباضی میوسیت‌ها احیا می‌شود. البته رپرفیوژن از طریق ایجاد پدیده ایسکمی رپرفیوژن باعث القای آسیب به میوسیت‌های قلبی می‌شود.^۱ در بیماری‌های قلبی مرگ میوسیت‌ها

* نویسنده مسؤول: ایمیل: naseroleslami@gmail.com

حق تألیف 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.

$$n = \frac{DF}{k} + 1$$

در معادله ارائه شده n ، حجم جامعه آماری در هر گروه نمونه، DF ، عددی بین ۱۰ الی ۲۰ برای آنالیز واریانس آزمایش‌های نمونه‌های حیوانی و k نیز تعداد گروه‌ها است. بر اساس این رابطه، تعداد نمونه‌ها در این پژوهش حداقل ۴ و حداکثر ۶ عدد خواهد بود.^۸ بنابراین در این پژوهش از ۵ نمونه برای هر گروه استفاده شد.

گروه‌بندی حیوانات

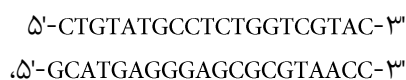
در این مطالعه از ۲۵ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. گروه‌های مطالعه شامل گروه کنترل، ایسکمی (القا شده با بستن LAD)، ایسکمی قلبی دریافت‌کننده نیوزوم، ایسکمی قلبی دریافت‌کننده سیمواستاتین و ایسکمی قلبی دریافت‌کننده سیمواستاتین نیوزومه شده بود. این حیوانات در شرایط استاندارد از نظر نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دما (۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شده و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. تمام موارد کمیته اخلاق رعایت شد.

تزریق دارو

در ۱۰ دقیقه پایانی دوره ایسکمی، در گروه ایسکمی دریافت‌کننده سیمواستاتین، سیمواستاتین با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در گروه ایسکمی دریافت‌کننده نیوزوم، نیوزوم با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق شد. در گروه ایسکمی دریافت‌کننده سیمواستاتین نیوزومه شده، سیمواستاتین نیوزومه شده با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل میوکاردی تزریق شد. سپس در هر دو گروه سیمواستاتین و سیمواستاتین نیوزومه با باز کردن شریان نزولی قدامی (LAD) اجازه خون‌رسانی مجدد داده شده و قفسه سینه بسته شد.^{۷،۶}

انجام ریل تایم PCR برای ژن های *BCL2*، *BAX*، *P53*، *Lc3*، *Beclin-1* و *Atg3*

چهار هفته بعد از تزریق، پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا طبق پروتکل شرکت سازنده کیت (کیاژن، آلمان) از بافت قلب تمام نمونه‌های مورد مطالعه، مراحل تولید cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده کیت (فرمنتاس، آمریکا) انجام شد. سپس cDNA تولید شده جهت واکنش رونویسی معکوس با استفاده از پرایمرهای پیش رو و معکوس ژن β -actin به ترتیب:



استاتین‌ها مانند اثرات ضدالتهابی، گشادکنندگی عروق، آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپوپتوزی و ضد فیبروزی در درمان ایسکمی ثابت شده است.^۳ اما به دلیل دفع سریع این دارو، کارایی آن در بدن کاهش می‌یابد. یکی از راه‌هایی که می‌تواند منجر به افزایش بازدهی داروها شود، استفاده از حامل‌های دارویی است. نیوزوم‌ها نوع خاصی از سیستم‌های دارورسانی وزیکولار بر پایه سورفاکتانت‌های غیریونی و کلاسترول هستند که با ایجاد ساختارهای لایه لایه میکروسکوپی، پس از هیدراسیون در محیط آبی، سونیکاسیون و یکنواخت‌سازی (هوموژنیزاسیون)، وزیکول‌های تک لایه کوچک ایجاد می‌شوند.^۴ همانند سایر سیستم‌های وزیکولار مزایای زیادی مانند افزایش ماندگاری داروی موجود در سیستم گردش خون و گوارش، دارو رسانی هدفمند به اعضا و بافت‌های مشخص، آزادسازی کنترل شده دارو، زیست تخریب‌پذیری و غیر ایمنی‌زا بودن دارند.^۵ بنابراین یافتن رویکردهای جدید درمانی برای محافظت قلب از اثرات مخرب آسیب ایسکمی-ریپرفیوژن قلبی جهت جلوگیری از مرگ سلول‌های قلبی و کاهش میزان سکنه قلبی، حفظ عملکرد بطن چپ و جلوگیری از شروع نارسایی قلبی نیاز است. هدف از مطالعه حاضر نیوزومه کردن داروی سیمواستاتین و بررسی اثر آن در مقایسه با داروی سیمواستاتین بر میزان مرگ کاردیومیوسیت‌ها از نوع آپوپتوز و اتوفازی در قلب موش‌های صحرایی نر دچار ایسکمی قلبی است.

روش کار

تمام آزمایش‌ها در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران پس از دریافت کد اخلاق IR.IUMS.REC.1398.625 انجام شد. تولید و آزمایش‌های تأییدی نانوذرات طبق مطالعه قبلی همین گروه تحقیقاتی انجام شد. برای تهیه نمونه‌ها به روش هیدراتاسیون فیلم نازک، ابتدا مقادیر معلوم از دارو، کلاسترول و اسپن مورد نظر در حلال کلروفرم حل شد. محلول حاصل تحت شرایط مشخص (دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه) در خلا قرار داده شد تا حلال کامل تبخیر شود. بعد از ۳۰ دقیقه، ۱۰ میلی‌لیتر محلول فسفات بافر سالین (pH=۷/۴) در بالن ریخته شده و مرحله آخر مجدد تکرار شد تا لایه نازکی بر جدار بالن تشکیل شود. سپس محتویات بالن به فالتون منتقل و برای کاهش اندازه و بقیه مراحل انجام آزمایش در یخچال نگهداری شد.^{۷،۶}

تعیین حجم نمونه‌های آماری

حجم نمونه با استفاده از روش ارائه شده توسط علی‌محمدی و سپندی (۲۰۲۲) به صورت زیر محاسبه شده است.

گروه‌های کنترل با گروه‌های دیگر از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. اختلاف بین گروه‌ها در صورت $P < 0/05$ معنادار بود.

یافته‌ها

ابتدا میانگین و انحراف معیار هر یک از گروه‌ها به صورت مجزا بررسی شد. در تمام گروه‌ها، نمونه‌های موجود در گروه کنترل انحراف معیار صفر داشته و بالاترین میانگین نیز در این گروه مشاهده شد. کمترین میانگین‌ها مربوط به ژن *BCL2* بود. سپس برای بررسی تأثیر مداخلات از آزمون آنالیز واریانس با سطح معناداری $P < 0/05$ استفاده شد. برای بررسی وجود اختلاف معنادار میان گروه‌های کنترل با گروه‌های دیگر از آزمون تعقیبی توکی با سطح معناداری $P < 0/05$ استفاده شد. تمام متغیرهای *BCL2*، *BAX*، *P53*، *LC3*، *Beclin-1* و *Atg3* در گروه‌های کنترل، ایسکمی، نیوزوم، سیمواستاتین و نیز سیمواستاتین نیوزومه شده اختلاف معنادار داشتند که نشان‌دهنده اثرگذاری مداخلات بر متغیرها است $P < 0/05$. برای بررسی میزان ارتباط دو به دو میان متغیرهای اندازه‌گیری شده از آزمون تعقیبی توکی استفاده $P < 0/05$ و میان گروه کنترل با سایر گروه‌ها اختلاف آماری معناداری مشاهده شد. در شکل ۱، میانگین گروه‌ها از نظر میزان بیان ژن‌های مختلف مقایسه شده‌اند. برای بررسی آپوپتوز، بیان ژن‌های *BAX*، *P53* و *BCL2* سنجیده و مشاهده شد که در گروه ایسکمی نسبت به گروه کنترل میزان بیان ژن‌های *BAX* و *P53* افزایش و در گروه سیمواستاتین نیوزومه نسبت به سیمواستاتین، میزان بیان ژن‌های *BAX* و *P53* کاهش داشت $P < 0/05$. همچنین بیان ژن‌های بالا در گروه‌های سیمواستاتین نیوزومه و سیمواستاتین نسبت به گروه ایسکمی نیز کاهش یافت، در حالی که در گروه ایسکمی نسبت به گروه کنترل میزان بیان ژن *BCL2* کاهش و در گروه سیمواستاتین نیوزومه نسبت به سیمواستاتین، میزان بیان این ژن افزایش یافت $P < 0/05$. همچنین بیان این ژن در گروه‌های سیمواستاتین نیوزومه و سیمواستاتین نسبت به گروه ایسکمی افزایش یافت $P < 0/05$. جهت بررسی اتوفاژی، بیان ژن‌های *LC3*، *Atg3* و *Beclin-1* سنجیده و مشاهده شد که در گروه ایسکمی نسبت به گروه کنترل میزان بیان ژن‌های *LC3*، *Atg3* و *Beclin-1* افزایش و در گروه سیمواستاتین نیوزومه نسبت به سیمواستاتین، میزان بیان این ژن‌ها کاهش داشت $P < 0/05$. همچنین بیان این ژن‌ها در گروه‌های سیمواستاتین نیوزومه و سیمواستاتین نسبت به گروه ایسکمی کاهش یافت $P < 0/05$.

پرایمرهای پیش‌رو و معکوس ژن *BCL2* به ترتیب:

۳'-GCCCTGTGGATGACTGAGTA-۵'
۳'-GGGCCATATAGTTCCACAAA-۵'

پرایمرهای پیش‌رو و معکوس ژن *BAX* به ترتیب:

۳'-GCTGGACACTGGACTTCCT-۵'
۳'-GTCCCGAAGTAGGAGAGGAG-۵'

پرایمرهای پیش‌رو و معکوس ژن *P53* به ترتیب:

۳'-TTCCGTCTGGGCTTCTTG-۵'
۳'-TGCTGTGACTGCTGTAGAT-۵'

پرایمرهای پیش‌رو و معکوس ژن *Lc3* به ترتیب:

۳'-GTGGTGGATGGTGGGATGGG-۵'
۳'-GTCTTTCAGGGTGGGCAGGT-۵'

پرایمرهای پیش‌رو و معکوس ژن *Beclin-1* به ترتیب:

۳'-GGGATGAGGGATGGAAGGGT-۵'
۳'-GGGGTGTGGTAAGTAATGGAG-۵'

و پرایمرهای پیش‌رو و معکوس ژن *Atg3* به ترتیب:

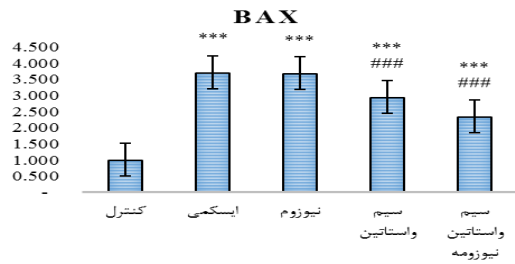
۳'-TAAGGCTGACGCTGGAGGTGAA-۵'
۳'-GTGCTCAACTGTTAAAGGCTGCC-۵'

انجام شد. cDNA تک رشته‌ای با پرایمر الیگو دی‌تی (ام دابلو جی-بیوتک، آلمان) و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (فرمنتاس) و بر اساس پروتکل مربوطه تهیه شد. هر واکنش PCR با استفاده از PCR مسترمیکس (اپلاید بیوسیستمز) و سایر گرین در دستگاه ABI استپ وان (اپلاید بیوسیستمز، فاستر سیتی، کانادا) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. ۴۰ سیکل برای هر چرخه ریل تایم PCR در نظر گرفته شد. از ژن β -actin برای کنترل داخلی استفاده شد.

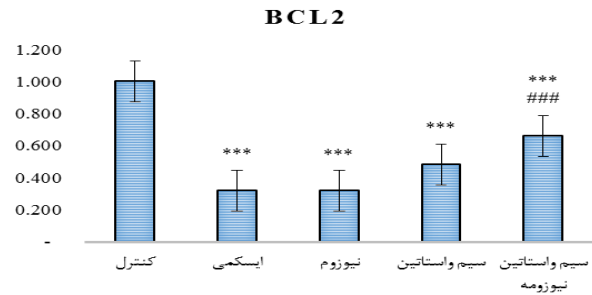
آنالیز آماری

از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ جهت آنالیز آماری نتایج استفاده شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SD) بیان شده است. ابتدا برای بررسی تأثیر مداخلات از آزمون آنالیز واریانس و سپس برای بررسی وجود اختلاف معنادار میان

نسبت بیان ژن
به
 β -actin

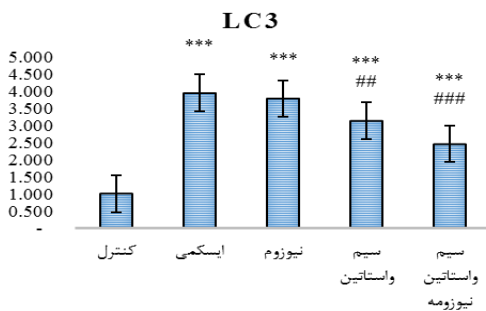


نسبت بیان ژن به
 β -actin

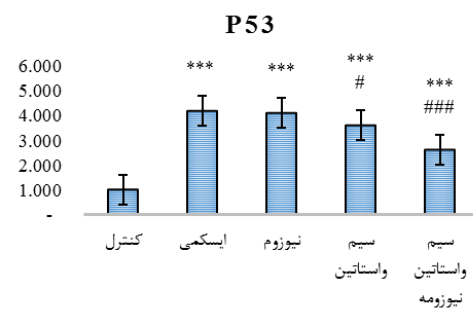


الف

نسبت بیان ژن
به
 β -actin

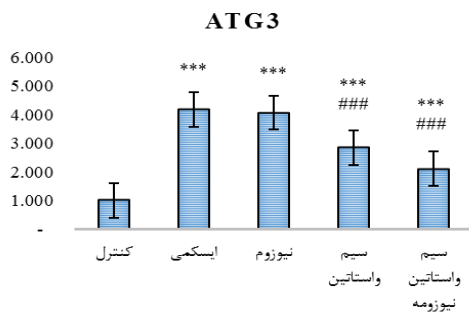


نسبت بیان ژن به
 β -actin

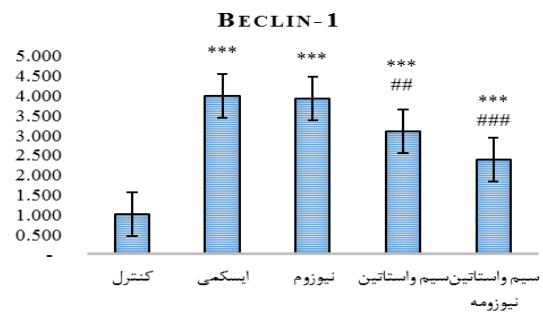


ج

نسبت بیان ژن
به
 β -actin



نسبت بیان ژن به
 β -actin



ه

شکل ۱. مقایسه میانگین میان گروه‌ها از نظر میزان بیان ژن‌های مختلف (الف) BCL2، (ب) BAX، (ج) P53، (د) LC3، (ه) Beclin-1 و (و) Atg3: اختلاف آماری گروه کنترل با گروه‌های ایسکمی، نیوزوم، سیمو استاتین و سیمو استاتین نیوزومه ($P < 0.001$), ###: اختلاف آماری میان گروه ایسکمی با گروه‌های سیمو استاتین و سیمو استاتین نیوزومه ($P < 0.001$)

جدول ۱. نتایج بررسی شاخص‌های مرکزی میزان بیان ژن‌های مختلف در گروه‌ها

گروه	BCL2	BAX	P53	LC3	Beclin-1	Atg3
کنترل	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰
میانگین	۰/۳۲	۳/۷۰	۴/۲۰	۳/۹۴	۳/۹۸	۴/۱۸
انحراف معیار	۰/۰۸	۰/۲۹	۰/۲۶	۰/۳۴	۰/۱۹	۰/۲۹
نیوزوم	۰/۳۲	۳/۶۷	۴/۱۲	۳/۷۸	۳/۹۰	۴/۰۶
انحراف معیار	۰/۱۳	۰/۱۵	۰/۳۶	۰/۳۴	۰/۲۷	۰/۲۱

۲/۸۴	۳/۰۸	۳/۱۴	۳/۶۰	۲/۹۴	-/۴۸	میانگین	سیمواستاتین
-/۲۷	-/۴۷	-/۳۴	-/۴۴	-/۱۱	-/۰۸	انحراف معیار	
۲/۱۰	۲/۳۸	۲/۴۶	۲/۶۰	۲/۳۴	-/۶۶	میانگین	سیمواستاتین نیوزومه
-/۳۴	-/۵۸	-/۴۲	-/۲۰	-/۲۴	-/۱۱	انحراف معیار	

جدول ۲. نتایج آنالیز واریانس برای میزان بیان ژن‌های مختلف

مقدار احتمال	مقدار آزمون F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	
./001>	۴۶/۱۸	-/۴۱	۱/۶۳	BCL2
./001>	۸۷۸/۲۳	۷/۷۳	۷/۷۳	برآورد مدل
./001>	۴۶/۱۸	-/۴۱	۱/۶۳	اینترسپت
			-/۱۸	بین گروهی
			۹/۵۳	خطا
				کل
				BAX
./001>	۱۷۶/۷۰	۶/۲۹	۲۵/۱۶	برآورد مدل
./001>	۵۲۴۱	۱۸۶/۶۰	۱۸۶/۶۰	اینترسپت
./001>	۱۷۶/۷۰	۶/۲۹۱	۲۶/۱۶	بین گروهی
			-/۷۱	خطا
			۲۱۲/۴۷	کل
				P53
./001>	۱۰۶/۰۰	۸/۹۵	۳۲/۸۰	برآورد مدل
./001>	۲۸۵۴	۲۴۰/۸۷	۲۴۰/۸۷	اینترسپت
./001>	۱۰۶/۰۰	۸/۹۵	۳۵/۸۰	بین گروهی
			۱/۶۹	خطا
			۲۷۸/۳۶	کل
				LC3
./001>	۶۹/۸۵	۷/۱۴	۲۸/۵۵	برآورد مدل
./001>	۲۰۰۶	۲۰۵/۰۶	۲۰۵/۰۶	اینترسپت
./001>	۶۹/۸۵	۷/۱۴	۲۸/۵۵	بین گروهی
			۲/۰۴	خطا
			۲۳۵/۶۶	کل
				Beclin-1
./001>	۵۶/۵۷۷	۷/۵۹۳	۳۰/۳۷۰	برآورد مدل
./001>	۱۵۳۲	۲۰۵/۶۳۶	۲۰۵/۶۳۶	اینترسپت
./001>	۵۶/۵۷۷	۷/۵۹۳	۳۰/۳۷	بین گروهی
			۶۸۴.	خطا
			۲۳۸/۶۹	کل
				Atg3
./001>	۱۴۴/۱۱	۹/۰۲	۳۶/۰۹	برآورد مدل
./001>	۳۲۱۲	۲۰۱/۰۷	۲۰۱/۰۷	اینترسپت
./001>	۱۴۴/۱۱	۹/۰۲	۳۶/۰۹	بین گروهی
		۲۰	۱/۲۵۲	خطا
		۲۵	۲۳۸/۴۱	کل

جدول ۳. نتایج آزمون تعقیبی برای اثربخشی مداخلات روی متغیرهای میزان بیان ژن‌های مختلف در گروه‌ها

ژن	گروه اول	گروه دوم	اختلاف میانگین	مقدار احتمال
		ایسکمی	./۶۸	./001>
BCL2	کنترل	نیوزوم	./۶۸	./001>
		سیمواستاتین	./۵۲	./001>

۰/۰۰۱>	۰/۳۴	سیمواستاتین نیوزومه		
۱	۰	نیوزوم		
۰/۰۰۹	-۰/۱۶	سیمواستاتین	ایسکمی	
۰/۰۰۱>	-۰/۳۴	سیمواستاتین نیوزومه		
۰/۰۰۹	-۰/۱۶	سیمواستاتین	نیوزوم	
۰/۰۰۱>	-۰/۳۴	سیمواستاتین نیوزومه		
۰/۰۰۴۶	-۰/۱۸	سیمواستاتین نیوزومه	سیمواستاتین	
۰/۰۰۱>	-۲/۷	ایسکمی		
۰/۰۰۱>	-۲/۶۸	نیوزوم	کنترل	
۰/۰۰۱>	-۱/۹۴	سیمواستاتین		
۰/۰۰۱>	-۱/۳۴	سیمواستاتین نیوزوم		
۰/۰۰۱>	۰/۰۲	نیوزوم	ایسکمی	BAX
۰/۰۰۱>	۰/۷۶	سیمواستاتین		
۰/۰۰۱>	۱/۳۶	سیمواستاتین نیوزوم		
۰/۰۰۱>	۰/۷۴	سیمواستاتین	نیوزوم	
۰/۰۰۱>	۱/۳۴	سیمواستاتین نیوزومه		
۰/۰۰۱>	۰/۶	سیمواستاتین نیوزومه	سیمواستاتین	
۰/۰۰۱>	-۳/۲	ایسکمی		
۰/۰۰۱>	-۳/۱۲	نیوزوم	کنترل	
۰/۰۰۱>	-۲/۶	سیمواستاتین		
۰/۰۰۱>	-۱/۶	سیمواستاتین نیوزومه		
۰/۰۰۱>	۰/۰۸	نیوزوم		
۰/۰۰۱>	۰/۶	سیمواستاتین	ایسکمی	P53
۰/۰۰۱>	۱/۶	سیمواستاتین نیوزومه		
۰/۰۰۱>	۰/۵۲	سیمواستاتین	نیوزوم	
۰/۰۰۱>	۱/۵۲	سیمواستاتین نیوزومه		
۰/۰۰۱>	۱	سیمواستاتین نیوزومه	سیمواستاتین	
۰/۰۰۱>	-۲/۹۴	ایسکمی		
۰/۰۰۱>	-۲/۷۸	نیوزوم	کنترل	
۰/۰۰۱>	-۲/۱۴	سیمواستاتین		
۰/۰۰۱>	-۱/۴۶	سیمواستاتین نیوزومه		
۰/۹۳	۰/۱۶	نیوزوم		
۰/۰۰۶۲	۰/۸	سیمواستاتین	ایسکمی	LC3
۰/۰۰۱>	۱/۴۸	سیمواستاتین نیوزومه		
۰/۰۰۳۵	۰/۶۴	سیمواستاتین	نیوزوم	
۰/۰۰۱>	۱/۳۲	سیمواستاتین نیوزومه		
۰/۰۰۲۳	۰/۶۸	سیمواستاتین نیوزومه	سیمواستاتین	
۰/۰۰۱>	-۲/۹۸	ایسکمی		
۰/۰۰۱>	-۲/۹	نیوزوم	کنترل	
۰/۰۰۱>	-۲/۰۸	سیمواستاتین		
۰/۰۰۱>	-۱/۳۸	سیمواستاتین نیوزومه		
۰/۹۹۷	۰/۰۸	نیوزوم		
۰/۰۰۷	۰/۹	سیمواستاتین	ایسکمی	Beclin-1
۰/۰۰۱>	۱/۶	سیمواستاتین نیوزومه		
۰/۰۰۱۶	۰/۸۲	سیمواستاتین	نیوزوم	
۰/۰۰۱>	۱/۵۲	سیمواستاتین نیوزومه		
۰/۰۰۴۷	۰/۷	سیمواستاتین نیوزومه	سیمواستاتین	
۰/۰۰۱>	-۳/۱۸	ایسکمی		
۰/۰۰۱>	-۳/۰۶	نیوزوم	کنترل	Atg3
۰/۰۰۱>	-۱/۸۴	سیمواستاتین		
۰/۰۰۱>	-۱/۱	سیمواستاتین نیوزومه		

۰/۹۴	۰/۱۲	نیوزوم	
۰/۰۰۱>	۱/۳۴	سیمواستاتین	ایسکمی
۰/۰۰۱>	۲/۰۸	سیمواستاتین نیوزوم	
۰/۰۰۱>	۱/۲۲	سیمواستاتین	نیوزوم
۰/۰۰۱>	۱/۹۶	سیمواستاتین نیوزومه	
۰/۰۰۱	۰/۷۴	سیمواستاتین نیوزومه	سیمواستاتین

بحث

کننده بسیار محدودی دارند و برای حفظ آنها باید فرآیندهای اتوفازی و آپوپتوز را بررسی کرد. اتوفازی یک مسیر تخریبی لیزوزومی است که توسط چندین پروتئین مانند Atg (ژن اتوفازی) و LC3 (پروتئین زنجیره سبک مرتبط با میکروتوبول ۳) نیوزوم به صورت مناسب بارگیری شده و هیچ تداخل و تشکیل پیوند شیمیایی بین مواد شرکت کننده در ترکیب با پودر دارویی مشاهده نشد که از مزایای این روش درمانی است. همچنین نتایج بررسی فاکتورهای قلبی، نشان دهنده بهبود عملکرد قلب در اثر تیمار موش‌های صحرایی با سیمواستاتین نیوزومه نسبت به سیمواستاتین به صورت آزاد بود.^{۷،۶} نتایج اتوفازی نیز نشان داد که در گروه ایسکمی نسبت به گروه کنترل میزان بیان ژن‌های LC3، Atg3 و Beclin-1 افزایش و در گروه سیمواستاتین نیوزومه نسبت به سیمواستاتین، کاهش داشت. همچنین بیان این ژن‌ها در گروه‌های سیمواستاتین نیوزومه و سیمواستاتین، نسبت به گروه ایسکمی کاهش یافت $P < 0/05$. هم‌سو با این نتایج، دوراک و همکاران با مطالعه کاربردهای داروهای نیوزومه شده در درمان اختلالات چشمی، نیوزوم‌ها را نانو حامل‌های امیدوارکننده در درمان بیماری‌های چشمی معرفی کردند.^{۱۹} مطالعه ابوطالب و همکاران هم افزایش نفوذ دارو از طریق مخاط بینی و بهبود فراهمی زیستی نسبی نفویم نیوزومه را در مقایسه با محلول خوراکی نفویم نشان داد.^{۲۰} نتایج مطالعه کنعانی و همکاران نیز نشان داد داروی نیوزومه در مقایسه با داروی استاندارد، اثرات سیتوتوکسیک سیس پلاتین را ۱/۵ برابر افزایش داده و نانوذرات نیوزوم حامل خوبی برای انتقال سیس پلاتین به سلول‌های سرطانی پستان هستند که نتایج مطالعه ما در قابلیت نانو حامل‌های نیوزومی در افزایش کارایی و پایداری دارو را تأیید می‌کند.^{۲۱} بر اساس مطالعه لیانگ و همکاران پروتئین کوآنزیم کیو۱۰ (CoQ10) در آسیب ایسکمی/ریپرفیوژن سبب تغییر قابل توجه پروتئین‌های اتوفازی مانند Atg5، beclin-1، و LC-3II شد.^{۲۲} در مطالعه دیگر نقش دو پروتئین CoQ10 و CoQ1 در آسیب ایسکمی/ریپرفیوژن بررسی و نتایج نشان داد که اگرچه CoQ10 اثرات محافظتی در برابر آسیب ایسکمی/ریپرفیوژن دارد، CoQ1 - که مشتق CoQ10 است - در بازگرداندن عملکرد انقباضی قلب

با وجود پیشرفت‌ها در درمان ایسکمی قلبی، این بیماری هنوز مهم‌ترین علت مرگ‌ومیر در سراسر جهان بوده^۹ و در بسیاری از بیماران - حتی پس از مصرف مؤثرترین داروها - ناحیه انفارکت گسترش می‌یابد.^{۱۰،۸} همچنین میوسیت‌های قلب ظرفیت بازسازی تنظیم می‌شود.^{۱۱،۱۳} Beclin-1 نیز در مرحله شروع اتوفازی نقش دارد.^{۱۳} فرآیند دیگر، آپوپتوز یا همان مرگ برنامه ریزی شده سلول است. پروتئین BAX یکی از پروتئین‌های کلیدی محرک آپوپتوز بوده اما Bcl-2 اثر ضد آپوپتوزی دارد.^{۱۴} پروتئین p53 نیز از طریق فعال سازی BAX سبب آپوپتوز می‌شود. آپوپتوز با واسطه پروتئین p53 را می‌توان توسط پروتئین‌های خانواده Bcl-2 - که عملکرد میتوکندری را تنظیم می‌کنند - مهار کرد.^{۱۵} با توجه به نقش این پروتئین‌ها در فرآیندهای آپوپتوز و اتوفازی، بررسی تغییر بیان آنها در ایسکمی قلبی مهم است. برای کنترل این فرآیندهای مرگ سلولی، داروهایی مانند استاتین‌ها برای بیماران تجویز می‌شود. استاتین‌ها سبب کاهش مرگ سلولی در بیماران قلبی می‌شوند.^{۱۶،۸} مطابق پژوهش هوانگ و همکاران، استاتین‌ها توانایی تسریع ترمیم بافت‌های آسیب دیده را دارند.^{۱۷} به دلیل این که مصرف خوراکی این داروها همراه معایبی مانند ناپایداری دارو است،^{۱۸} کارافا و همکاران با استفاده از نانو حامل‌های لیپیدی نیوزوم، دارو را به صورت مؤثرتری در اختیار بافت مورد نظر قرار دادند.^۵ بنابراین در مطالعه حاضر داروی استاتین به صورت نیوزومه تولید شد تا اثر آن بر ایسکمی قلبی بررسی شود. یافته‌های ما در بررسی مرگ سلولی از نوع آپوپتوز نشان داد که در گروه ایسکمی نسبت به گروه کنترل میزان بیان ژن‌های P53 و BAX افزایش و در گروه سیمواستاتین نیوزومه نسبت به سیمواستاتین، میزان بیان آنها کاهش داشت. همچنین بیان این ژن‌ها در گروه‌های سیمواستاتین نیوزومه و سیمواستاتین نسبت به گروه ایسکمی هم کاهش یافت $P < 0/05$. در حالی که در بررسی آپوپتوز در گروه ایسکمی نسبت به گروه کنترل میزان بیان ژن BCL2 کاهش و در گروه سیمواستاتین نیوزومه نسبت به سیمواستاتین، افزایش یافت. همچنین بیان این ژن در گروه‌های سیمواستاتین نیوزومه و سیمواستاتین نسبت به گروه ایسکمی نیز افزایش داشت $P < 0/05$. طبق نتایج مطالعات قبلی گروه تحقیقاتی ما، دارو توسط حامل

نتیجه‌گیری

با توجه به بهبود معنادار در گروه دریافت‌کننده دارو به صورت نیوزومه نسبت به دارو معمولی، می‌توان با نیوزومه کردن سیمواستاتین، کارایی، پایداری و مدت اثر دارو را در بافت قلب افزایش داده و بازدهی آن را در درمان بهبود بخشید.

قدردانی

این پژوهش با حمایت مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران اجرا شده است.

مشارکت پدیدآوران

ناهید ابوطالب ایده‌پردازی، مهدیه مهربان محسنی تهیه پیش‌نویس، نقد و بررسی از جهت محتوای فکری و تحلیل یا تفسیر داده‌ها و مریم نصرالاسلامی طراحی اثر و جمع‌آوری داده‌ها را عهده داشتند.

منابع مالی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است.

دسترس‌پذیری داده‌ها

در صورت نیاز تمام داده‌ها ارائه می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

تمام آزمایش‌ها براساس استانداردهای کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد اخلاق IR.IUMS.REC.1398.625 انجام شد.

تعارض منافع

هیچ تعارض منافع در رابطه با مطالعه وجود ندارد.

پس از خون‌رسانی مجدد، مؤثرتر است، هر چند به اندازه انفارکتوس نیست و ممکن است به دلیل پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالای CoQ1 باشد.^{۲۳} در حالی که نانوذرات بارگیری شده با ویسناگین توانست عملکرد قلبی و فشار سیستولیک و دیاستولیک را بهبود بخشد و فیروز را مهار کند. همچنین نانوذرات بارگیری شده با ویسناگین از طریق افزایش اتوفازی و مهار آپوپتوز، عملکرد قلبی را بهبود بخشید و آسیب ایسکمی/ریپرفیوژن را کاهش می‌دهد. ویسناگین ممکن است از تعامل بین مجموعه تنظیمی اتوفازی Beclin-1 و Bcl-2 جلوگیری کند.^{۲۴} ناصرالاسلامی و همکاران نشان دادند که سیمواستاتین نیوزومه، فعال‌سازی سیگنال‌دهی نکروپتوزیس را از طریق کاهش فعالیت مسیر Rho/ROCK کاهش می‌دهد.^۶ همچنین سیمواستاتین نیوزومه توانایی بیشتری در کاهش نشانگرهای آسیب قلبی مانند cTnI و CK-MB نسبت به سیمواستاتین دارند. هم‌راستا با نتایج ما، زانگ و همکاران گزارش دادند که سیمواستاتین می‌تواند عملکرد قلب را بهبود بخشد و منجر به کاهش آسیب ایسکمی/ریپرفیوژن با جلوگیری از بیان بیش از حد سیتوکین‌های پیش‌التهابی شود.^{۲۵} نقش محافظتی یا مضر اتوفازی در آسیب ایسکمی/ریپرفیوژن مورد بحث است. از یک طرف سطوح متوسط اتوفازی - که با هیپوکسی/ایسکمی خفیف تا متوسط شروع می‌شود - نقش محافظتی داشته و فعال‌سازی آپوپتوز را مهار می‌کند و از طرفی دیگر در برخی شرایط منجر به آپوپتوز می‌شود.^{۲۶} همچنین مطالعه برادی و همکاران در بررسی اختلال آپوپتوز در ایسکمی/ریپرفیوژن، تداخل فرآیندهای آپوپتوز و اتوفازی را نشان داد. به دلیل این که Bcl-2 اتوفازی وابسته به Beclin-1 را مهار می‌کند، فعال‌سازی اتوفازی با واسطه Beclin-1 در طول خون‌رسانی مجدد با کاهش بیان Bcl-2 همراه بوده که خود ممکن است منجر به آپوپتوز شود. پروتئین Bnip3 مولکول بالقوه دیگری است که اتوفازی و آپوپتوز را به هم متصل کرده و عضو پروآپوپتوزی از خانواده ژنی Bcl-2 است. طبق نتایج این مطالعه، Bnip3 در تنظیم اختلال اتوفازی در ایسکمی/ریپرفیوژن قلب نقش دارد.^{۲۷}

References

- Boulet J, Mehra MR. Left Ventricular Reverse Remodeling in Heart Failure: Remission to Recovery. *Structural Heart*. 2021;5(5):466-81. doi: 10.1080/24748706.2021.1954275
- Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassel BW, Salloum FN, et al. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(49):19725-30. doi: 10.1073/pnas.1108586108
- Coward WR, Marei A, Yang A, Vasa-Nicotera MM, Chow SC. Statin-induced proinflammatory response in mitogen-activated peripheral blood mononuclear cells through the activation of caspase-1 and IL-18 secretion in monocytes. *The Journal of Immunology*. 2006;176(9):5284-92. doi: 10.4049/jimmunol.176.9.5284

4. Bayindir ZS, Yuksel N. Characterization of niosomes prepared with various nonionic surfactants for paclitaxel oral delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2010;99(4):2049-60. doi: 10.1002/jps.21944
5. Carafa M, Santucci E, Lucania G. Lidocaine-loaded non-ionic surfactant vesicles: characterization and in vitro permeation studies. *International journal of pharmaceutics*. 2002;231(1):21-32. doi: 10.1016/s0378-5173(01)00828-6
6. Naseroleslami M, Niri NM, Akbarzade I, Sharifi M, Aboutaleb N. Simvastatin-loaded nano-niosomes confer cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Drug Delivery and Translational Research*. 2022;12(6):1423-32. doi: 10.1007/s13346-021-01019-z
7. Naseroleslami M, Sharifi M, Mousavi Niri N, Aboutaleb N. Simvastatin-loaded nano-niosomes efficiently downregulates the MAPK-NF- κ B pathway during the acute phase of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Molecular Biology Reports*. 2022;49(11):10377-85. doi: 10.1007/s11033-022-07891-3
8. Alimohamadi Y, Sepandi M. Sample Size in Animal Studies (The number of laboratory animals in a Research study). *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2022;16(2):173-6. doi: 10.30699/ijmm.16.2.173
9. Neri M, Riezzo I, Pascale N, Pomara C, Turillazzi E. Ischemia/reperfusion injury following acute myocardial infarction: a critical issue for clinicians and forensic pathologists. *Mediators of inflammation*. 2017;2017:7018393. doi: 10.1155/2017/7018393
10. Yang Y, Zhao L, Ma J. Penhexyclidine hydrochloride preconditioning provides cardiac protection in a rat model of myocardial ischemia/reperfusion injury via the mechanism of mitochondrial dynamics mechanism. *European journal of pharmacology*. 2017;813:130-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.07.031
11. Cheong H, Klionsky DJ. Biochemical methods to monitor autophagy-related processes in yeast. *Methods in enzymology*. 2008;451:1-26. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03201-1
12. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of cell science*. 2004;117(13):2805-12. doi: 10.1242/jcs.01131
13. Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, et al. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of virology*. 1998;72(11):8586-96. doi: 10.1128/JVI.72.11.8586-8596.1998
14. Ma J, Wang X-B, Li R, Xuan S-H, Wang F, Li X-H, et al. RNAi-mediated TCF-3 gene silencing inhibits proliferation of Eca-109 esophageal cancer cells by inducing apoptosis. *Bioscience reports*. 2017;37(6):BSR20170799. doi: 10.1042/BSR20170799
15. Shen Y, White E. p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res*. 2001;82:55-84. doi: 10.1016/s0065-230x(01)82002-9
16. Adameová A, Kuželová M, Faberová V, Švec P. Protective effect of simvastatin and VULM 1457 in ischaemic-reperfused myocardium of the diabetic-hypercholesterolemic rats. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;61(9):807-8.
17. Huang J, Lin C, Fang J, Li X, Wang J, Deng S, et al. pH-sensitive nanocarrier-mediated codelivery of simvastatin and noggin siRNA for synergistic enhancement of osteogenesis. *ACS applied materials & interfaces*. 2018;10(34):28471-82. doi: 10.1021/acsami.8b10521
18. Korani S, Bahrami S, Korani M, Banach M, Johnston TP, Sahebkar A. Parenteral systems for statin delivery: a review. *Lipids in Health and Disease*. 2019;18(1):1-9. doi: 10.1186/s12944-019-1139-8
19. Durak S, Esmaili Rad M, Alp Yetisgin A, Eda Sutova H, Kutlu O, Cetinel S, et al. Niosomal drug delivery systems for ocular disease—recent advances and future prospects. *Nanomaterials*. 2020;10(6):1191. doi: 10.3390/nano10061191
20. Abou-Taleb HA, Khallaf RA, Abdel-Aleem JA. Intranasal niosomes of nefopam with improved bioavailability: Preparation, optimization, and in-vivo evaluation. *Drug Design, Development and Therapy*. 2018;12:3501. doi: 10.2147/DDDT.S177746
21. Kanaani L, Ebrahimifard M, Kheyavi AA, Mehrdiba T. Effects of cisplatin-loaded niosomal nanoparticles on BT-20 human breast carcinoma cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2017;18(2):365. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.2.365
22. Liang S, Ping Z, Ge J. Coenzyme Q10 regulates antioxidative stress and autophagy in acute myocardial

- ischemia-reperfusion injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:9863181. doi: 10.1155/2017/9863181
23. Aahitey M, Sutton J, Venditto J, Kucharski K, Robbie J, Kuo D, et al. The Effectiveness of Coenzyme Q1 and Q10 in Mitigating Myocardial Reperfusion/Ischemia (MI/R) Injury. *The FASEB Journal*. 2016;30:1178. doi: 10.1096/fasebj.30.1_supplement.1178.9
24. Fu H, Li X, Tan J. NIPAAm-MMA nanoparticle-encapsulated visnagin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury through the promotion of autophagy and the inhibition of apoptosis. *Oncology Letters*. 2018; 15(4): 4827-36. doi: 10.3892/ol.2018.7922
25. Zhang J, Cheng X, Liao Y-H, Lu B, Yang Y, Li B, et al. Simvastatin regulates myocardial cytokine expression and improves ventricular remodeling in rats after acute myocardial infarction. *Cardiovascular drugs and therapy*. 2005;19(1):13-21. doi: 10.1007/s10557-005-6893-3
26. Lin XL, Xiao WJ, Xiao LL, Liu MH. Molecular mechanisms of autophagy in cardiac ischemia/reperfusion injury (Review). *Mol Med Rep*. 2018;18(1):675-83. doi: 10.3892/mmr.2018.9028
27. Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA, Gustafsson ÅB. Autophagy as a protective response to Bnip3-mediated apoptotic signaling in the heart. *Autophagy*. 2006;2(4):307-9. doi: 10.4161/auto.2947.