

## نقش متغیر زمان بر تغییرات آپوتوزیس متعاقب ایسکمی - رپرفیوژن در قلب ایزوله موش صحرایی یوسف دوستار<sup>۱</sup>، علیرضا گرجانی<sup>۲</sup>، مهرداد هاشمی<sup>۳</sup>، رامبد رضاپور شهیر<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> بخش پاتولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز

<sup>۲</sup> بخش فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

<sup>۳</sup> دانشکده پزشکی، واحد پزشکی تهران و بخش ژنتیک ملکولی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران

<sup>۴</sup> دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز

### چکیده

**سابقه و هدف:** مطالعه اثرات وابسته به زمان ایسکمی-رپرفیوژن بر روی سلول های میوکاردا.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی رت های نر از نژاد SD با وزن ۲۷۰-۳۳۰ گرم به صورت تصادفی به چهار گروه ۱۰ تایی تقسیم و بعد از بیهوشی با پنتوباریتال سدیم (50-60 IP-kg/mg)، قلب رت های گروه تیمار به سرعت ایزوله و به دستگاه لانگندروف محلول کربس با فشار ثابت و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد متصل شدند و در زمان استابیلیزاسیون، ۳۰ دقیقه ایسکمی و به ترتیب ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه رپرفیوژن در مورد آنها اعمال گردید. قلب گروه کنترل دست نخورده یا به عنوان Intact در نظر گرفته شد. تشخیص ایمنو هیستوشیمی سلول های آپوتوتیک با استفاده از کیت TUNEL POD انجام پذیرفت و سلول های میوکاردا تانل مثبت اعضای هر گروه در ۵ میدان میکروسکوپی شمارش گردید و نتایج هر گروه به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد اندازه گیری بیان گردید.

**یافته ها:** در گروه کنترل تعداد سلول های آپوتوتیک  $1 \pm 0/4$  عدد در حالی که در گروه تیمار با عناوین T/60 min، T/90 min و T/120 min به ترتیب  $2/0 \pm 0/5$ ،  $3/0 \pm 0/3$  و  $6/0 \pm 0/3$  بود. مقایسه بین گروه های تیمار و کنترل با استفاده از آنالیز واریانس صورت گرفت و نتایج نشان داد که اختلاف بین گروه های (T/120 min & T/90 min) و (T/60 min & Control) معنی دار نبود ( $p > 0/05$ ) ولی بین گروه های (T/120 min & T/60 min) و (T/120 min & T/90 min) اختلاف معنی دار بود (به ترتیب  $p < 0/01$  و  $p < 0/01$ ).

**نتیجه گیری:** این مطالعه نشان داد که زمان ایسکمی-رپرفیوژن می تواند در تغییرات آپوتوتیک سلول های میوکاردا قلب موثر باشد.

**واژگان کلیدی:** ایسکمی-رپرفیوژن، آپوتوزیس، انفارکتوس.

### مقدمه

(I) و رپرفیوژن (R) همراهی دارند. کاردیوسیت های تحت نکروز و آپوتوز اختصاصات مورفولوژیکی و بیولوژیکی خیلی نزدیکی به هم دارند. نکروز که اغلب مرگ سلولی تصادفی یا پاتولوژیک خوانده می شود با وسیله آماس و یا شکاف شدید سلول، دنا توره و منعقد شدن پروتئین های سیتوپلاسم، شکست و تخریب

نکروز و آپوتوز دو راه مجزای اصلی برای مرگ سلولی در سلول های عضلانی قلبی می باشند که با وقوع ایسکمی

آدرس نویسنده مسؤل: دانشکده پزشکی، واحد پزشکی تهران و بخش ژنتیک ملکولی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران مهرداد هاشمی (e-mail: hashemi\_mehrdad@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/۲/۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۵/۶/۵

پره‌کاندیشنیک مختصر تولید می‌شود (۶ و ۸). لسکی با مطالعه اثرات احتمالی ایسکمی-رپرفیوژن در موارد آنژیوپلاستی عروق کرونری بیان نمود که افزایش مدت زمان رپرفیوژن می‌تواند در عوارض بعد از عمل جراحی موثر واقع گردد (۶ و ۷). آسیب‌شناسی انفارکتوس قلبی شامل عوامل و وضعیت‌های متعددی است اما از دست رفتن تدریجی سلول‌های عضله قلبی یکی از مهمترین مباحث‌های پاتولوژیک به شمار می‌رود. با گذشت چندین سال، اطلاعات زیادی در خصوص اهمیت نقش آپوپتوزیس متعاقب انفارکتوس و ایسکمی-رپرفیوژن وجود دارد که هر کدام به طور جداگانه ای می‌تواند نشانگر اهمیت موضوع باشند. به همین خاطر امکان محدود کردن مرگ سلول‌های عضله قلبی به وسیله ممانعت از آپوپتوز به صورت بالقوه در درمان انفارکتوس قلبی و رعایت زمان ایسکمی-رپرفیوژن اهمیت دارد (۹-۸). در این مطالعه ما نیز بر اساس یافته‌های دیگر دانشمندان تصمیم گرفتیم نقش متغیر زمان را در ایسکمی-رپرفیوژن بافت میوکارد قلب موش صحرایی به عنوان یک کار پژوهشی جدید بررسی نماییم.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی موش‌های صحرایی نر از نژاد SD با وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم بصورت تصادفی به چهار گروه ۱۰ تایی (یک گروه کنترل و سه گروه تیمار) تقسیم و بعد از بیهوشی با پنتوباریتال سدیم (۵۰-۶۰ IP-kg/mg)، قلب آنها به سرعت ایزوله گردید و سپس به دستگاه لانگندروف محلول کربس محتوی گاز کاربوژن (۹۵٪ اکسیژن و ۵٪ دی‌اکسید کربن) با فشار ثابت و دمای ۳۷ درجه متصل شد. موش‌های گروه تیمار در زمان استابیلیزاسیون و نیز ۳۰ دقیقه رپرفیوژن، محلول ای به ترتیب ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه رپرفیوژن، محلول کربس معمولی دریافت داشتند. گروه‌های فوق براساس مدت زمان ایسکمی-رپرفیوژن به ترتیب بصورت T/60 min، T/90 min و T/120 min نامگذاری شدند. در موش‌های گروه کنترل، رپرفیوژن محلول کربس یا به طور دقیق‌تر ایسکمی-رپرفیوژن اعمال نگردید. در گروه‌های تیمار پس از اتمام رپرفیوژن، قلب در داخل فیکساتیو و به مدت ۲۴ ساعت در داخل دستگاه اتوتکنیکوم با فرمالین، اتانول، گزیلول و پارافین مجاور گردید. سپس با تهیه مقاطع بافتی، متد اختصاصی

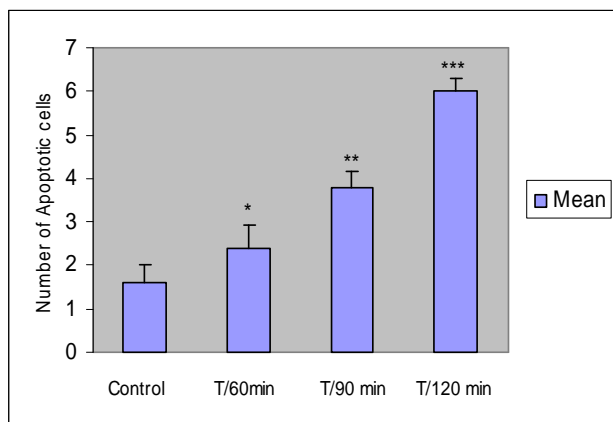
ارگانل‌های داخل سلولی و پاسخ آماسی شدید همراه است. آپوپتوز در مقابل نکروز، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و کنترل شده ژنتیکی است. وجه مورفولوژیک اصلی آن شامل نشت سلولی، تراکم کروماتینی، تشکیل حبابچه‌های سیتوپلاسمی و اجسام آپوپتوتیک می‌باشد که بدون از دست دادن تمامیت غشای سلولی و پاسخ التهابی رخ می‌دهد. اگرچه مکانیسم‌های نکروز و آپوپتوز متفاوت است ولی تحت شرایط پاتولوژیک صفات مشترکی بین این دو فرآیند وجود دارد (۵-۱). مطالعات گوناگون اخیر نشان می‌دهد که ایسکمی-رپرفیوژن، آپوپتوز سلول‌های میوکاردی را در شرایط محیط زنده القا می‌کند. با وجود این هنوز هم این مطلب که آیا آپوپتوز به هنگام I و یا به هنگام R شروع می‌شود، قابل بحث و مجادله است. گوتلیب و همکاران دریافتند که سنگ محک آپوپتوز یعنی قطعات نوکلئوزومی فراگمان‌های DNA، در میوکارد ایسکمیک خرگوش ۳۰ دقیقه بعد از انفارکتوس و ۴ ساعت بعد از رپرفیوژن ردیابی شده، اما این حالت در میوکاردهایی که فقط دچار ایسکمی شده‌اند دیده نمی‌شود. سپس محققان با بررسی‌های انجام شده پیشنهاد نمودند که آپوپتوز فقط هنگام رپرفیوژن بوجود می‌آید (۶).

با مطالعه مختصر در متون پاتولوژی نقش آپوپتوز خارج از تنظیم در بسیاری از اختلالات و بیماری‌ها آشکار شده است. امروزه کمتر بیماری را می‌توان یافت که آپوپتوز در آن نقشی نداشته باشد. با اشاره مختصر به نقش آپوپتوز در بیماری‌ها، بخش عمده‌ای از پاتوژنز بیماری‌ها توجیه می‌گردد. مطالعات دیگری نیز نشان دادند که پرئودهای مختصر و کوتاه ایسکمی-رپرفیوژن تجربی و آزمایشی در کلیه راست باعث آپوپتوز می‌شود در حالی که ایسکمی طولانی شده نکروز تولید می‌کند. گوتلیب و همکاران نشان دادند که ایسکمی-رپرفیوژن منجر به آپوپتوز در میوسیت‌های رت می‌شود و نقش pH و ATPase را در آپوپتوز متعاقب رپرفیوژن شرح دادند. پیوت و همکاران عنوان داشتند که ایسکمی-رپرفیوژن در قلب موش رت باید معرف بروز آپوپتوز باشد. آنها بعداً توانستند این مطلب را پس از رپرفیوژن طولانی جریان خون کرونری مشخص کنند. اگرچه آنها تغییرات آپوپتوزیس را به دنبال ایسکمی-رپرفیوژن تشریح کردند، ولی نتوانستند مشخص کنند که چه میزان آپوپتوز در طی هر پرئود ایسکمی

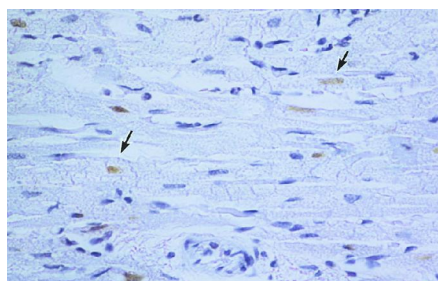
( $p > 0.05$ ) اما بین گروه‌های T/60min و T/120min و T/90min معنی دار بود (به ترتیب  $p < 0.001$  و  $p < 0.01$ ). در جدول ۱ ارقام به دست آمده از آنالیز آماری داده‌ها ارائه شده است.

جدول ۱- میانگین، انحراف معیار و خطای تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های تیمار و کنترل

| گروه‌ها  | میانگین | میانگین $\pm$ انحراف معیار | میانگین $\pm$ خطای استاندارد |
|----------|---------|----------------------------|------------------------------|
| T/60 min | ۲/۴     | ۲/۴ $\pm$ ۱/۱              | ۲/۴ $\pm$ ۰/۵                |
| T/90 min | ۳/۸     | ۳/۸ $\pm$ ۰/۸              | ۳/۸ $\pm$ ۰/۳                |
| T/120min | ۶/۰     | ۶ $\pm$ ۰/۷۰۷              | ۶ $\pm$ ۰/۳۱۶                |
| Control  | ۱/۶     | ۱/۶ $\pm$ ۰/۸              | ۱/۶ $\pm$ ۰/۴                |



نمودار ۱- میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در ۵ میدان دید میکروسکوپی به دست آمده از بافت میوکارد گروه‌های تیمار و کنترل به روش تانل در موش‌های صحرایی ( $n=10$ ). داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  نمایش داده شده‌اند.  $p > 0.05$ ,  $p < 0.01$ \*\*,  $p < 0.001$ \*\*\* در مقایسه با گروه کنترل.



تصویر ۱- فتومیکروگراف مقطعی از بافت میوکارد موش رت از گروه تیمار که مدت زمان رپرفیوژن آن ۱۲۰ دقیقه بوده است. سلول‌های تانل مثبت روبروی پیکان‌ها قابل مشاهده هستند. (رنگ آمیزی تانل، بزرگنمایی  $\times 100$ )

تشخیص آپوپتوزیس (TUNEL assay) بر روی آنها انجام گرفت و با استفاده از میکروسکوپ نوری اقدام به شمارش سلول‌های آپوپتوتیک در ۵ میدان دید تصادفی میکروسکوپی برای هر یک از اعضای گروه تیمار و کنترل شد (۱). برای آنالیز آماری داده‌ها بین گروه‌ها از آزمون آماری One-way ANOVA و Bartlett's test استفاده و نتایج هر گروه به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد بیان گردید.

### نحوه اجرای تکنیک تشخیصی TUNEL

۱- ابتدا مقاطع تهیه شده پس از پارافین زدایی و آب دهی با آنزیم پروتئیناز K مجاور و پس از انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با محلول PBS شستشو گردید.

۲- مقاطع بافتی با محلول TUNEL reaction mixture به میزان ۵۰ میکرولیتر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مجاور و با محلول PBS شستشو گردید.

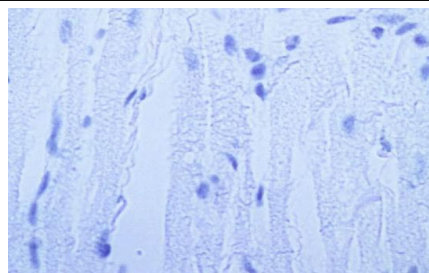
۳- مقاطع بافتی پس از انکوباسیون با محلول Converter-POD (۵۰ میکرو لیتر) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با محلول PBS شستشو و سپس با محلول DAB نیز مجاور گشته و بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ سانتی گراد مجدداً انکوبه گردید.

۴- شستشو با PBS و انجام رنگ آمیزی تولوئیدین بلو انجام گرفت (۱۰ و ۱).

### یافته‌ها

نتایج حاصله از مطالعات میکروسکوپی و تکنیک اختصاصی تانل در گروه‌های آزمایشی و کنترل به شرح زیر بود: مطالعات میکروسکوپی نشانگر افزایش تراکم کروماتین و فراگمانتاسیون هسته سلول‌ها و گاه تشکیل هلال کروماتینی بود. در رنگ آمیزی تانل سلول‌های آپوپتوتیک به علت فراگمانتاسیون DNA سلول که اغلب به صورت مضاربی از ۲۰۰-۱۸۰ جفت باز بودند به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره در بافت میوکارد قلب مشاهده گردیدند، به طوری که تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه کنترل  $1/6 \pm 0/4$  عدد و در گروه‌های تیمار به ترتیب  $2/4 \pm 1/14$ ،  $3/8 \pm 0/836$  و  $6 \pm 0/707$  عدد بود. مقایسه بین گروه‌های تیمار و کنترل با استفاده از آنالیز واریانس صورت گرفت و به ترتیب اختلاف بین گروه‌های (T/120 min & T/90 min) و (T/60 min & Control) معنی دار نبود.

مشاهده شد که با نتایج کارهای تحقیقاتی سایر دانشمندان همخوانی دارد. به طوری که Albrecht Elsässer نیز بیشترین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک را در زمان ۱۲۰ دقیقه رپرفیوژن مشاهده کرده بودند (۲،۵،۶). اما مطالعات ایشان نشان می‌دهد که در ۱۸ ساعت رپرفیوژن بافتی نیز هنوز تغییرات آپوپتوتیک قابل رویت می‌باشد. فاکتورهای متعددی می‌توانند در مورد ارتباط زمان با تغییرات مرگ سلولی مطرح باشند، این فاکتورها عبارتند از :



تصویر ۲- فتومیکروگراف مقطعی از بافت میوکارد موش رت از گروکنترل. (رنگ آمیزی تانل، بزرگنمایی ۱۰۰×)

## بحث

در مبحث پاتوفیزیولوژی آپوپتوزیس کاردیومیوسیت‌ها عوامل متعددی در القای آپوپتوزیس به عنوان فاکتور پروآپوپتوتیک نقش دارند، یکی از این عوامل ایسکمی-رپرفیوژن بافتی است که با چندین مسیر باعث آپوپتوز سلولی می‌گردد. اساساً پس از رپرفیوژن جریان خون، میزان کلسیم سیتوزول سلول افزایش یافته و باعث افزایش پتانسیل نفوذپذیری غشای میتوکندری سلول می‌شود. در این زمان مقادیر زیادی کلسیم وارد میتوکندری و به دنبال آن سیتوکروم C (Apaf-2) از طریق کانال‌های غشایی خارج و به همراه فاکتورهای آنزیم‌های کاسپازی می‌گردد که انتهای مسیر فوق مرگ آپوپتوتیک سلول می‌باشد. از طرف دیگر وجود  $Ca^{++}$  بالا در سیتوپلاسم سلول به دنبال رپرفیوژن بافتی باعث فعال شدن آنزیم آندونوکلئاز و فراگمانتاسیون رشته DNA با نوکلئوزوم‌های مضارب ۲۰۰-۱۸۰ جفت‌بازی گشته و مرگ آپوپتوتیک سلول را باعث می‌گردد (۱۱). مسیر دیگری در آپوپتوزیس کاردیومیوسیت‌ها به دنبال رپرفیوژن وجود دارد که مستقل از آنزیم‌های کاسپازی است و آن نقش  $AIF^4$  یا فاکتور القاگر آپوپتوزیس است که بالا رفتن میزان یون کلسیم سیتوزول و ورود آن به میتوکندری باعث آزادسازی این فاکتور و القای آپوپتوزیس توسط عامل فوق می‌باشد. در پژوهش حاضر نقش متغیر زمان در ایسکمی-رپرفیوژن قلب بررسی شد و نتایج بیانگر اختلاف معنی‌دار تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های تیمار و کنترل بود، به طوری که حداقل سلول‌های آپوپتوتیک در گروه کنترل و حداکثر تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه T/120 min

۱- میزان کلسیم سیتوزول سلول که در زمان‌های بالای ۶۰ دقیقه رپرفیوژن تقریباً به حداکثر مقدار خود رسیده و باعث افزایش پتانسیل نفوذپذیری غشای میتوکندری و تسهیل خروج بیشتر سیتوکروم C و AIF می‌گردد اما معمولاً میزان AIF بیشتر از سیتوکروم C است و علت آن این است که سیتوکروم C در شرایط معمول در فضای بین غشایی با فسفولیپیدهای آنیونی نظیر کاردیولیپین باند شده است در حالی که AIF در فضای بین غشایی با هیچ ماده‌ای باند نمی‌شود و بنابراین AIF براحتی به خارج از غشا راه پیدا می‌کند (۳ و ۴).

۲- میزان بیان ژن‌های محرک و القاگر آپوپتوزیس نظیر BAX که در تشکیل کانال‌های غشایی میتوکندریایی و خروج سیتوکروم C نقش تعیین‌کننده‌ای دارند و در مدت زمان‌های طولانی رپرفیوژن حضور پروتئین فعال BAX بارزتر می‌باشد (۱۲).

۳- تحقیقات کیم و همکاران بیان می‌دارد که میزان فعالیت کاسپاز ۳ که عامل بسیار موثر در آپوپتوزیس می‌باشد بعد از ۲ ساعت از رپرفیوژن افزایش می‌یابد و بنابراین اگر تغییرات در زمان ۱۲۰ دقیقه تا حدودی بیشتر است شاید به علت حضور مقادیر کافی آنزیم‌های کاسپازی، مخصوصاً کاسپاز ۳ می‌باشد (۱۳ و ۱۲ و ۱۱).

به هر حال نقش متغیر زمان و داشتن آگاهی‌های لازم در دخالت زمان رپرفیوژن بافتی می‌تواند در تلاش‌های جمعی جهت مطالعات لازم برای رسیدن به کاهش تغییرات آپوپتوتیک در مواد رپرفیوژن بافتی اثر مفیدی داشته باشد. استفاده از داروهای آنتی‌آپوپتوتیک در موارد رپرفیوژن بافتی مخصوصاً پیوند اعضا (کلیه و قلب) در زمان مناسب خود اثر ویژه‌ای در مهار آسیب بافتی خواهد داشت. با توجه به نتایج این کار پژوهشی توصیه می‌گردد

<sup>1</sup> Apoptotic Protein activated Factor-1

<sup>2</sup> Apoptosis Inducing Gactor

**تشکر و قدردانی**

با تشکر از همکاران حوزه معاونت پژوهشی و کارشناس محترم بخش آسیب شناسی جناب آقای غلامرضا دانش پژوهان.

قبل از رویداد رپرفیوژن بافتی با توجه به افزایش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در واحد زمان داروهای آنتی آپوپتوتیک قبل از رپرفیوژن بافتی یا در اوایل رویداد رپرفیوژن تجویز گردد (۸، ۴، ۳).

**REFERENCES**

۱. دوستاری. مطالعه آزمایشی آپوتوز القا شده توسط ویروس عامل بیماری بورس عفونی جوجه‌ها با استفاده از متد تشخیصی TUNEL و میکروسکوپ الکترونی. پایان‌نامه جهت دریافت دکترای تخصصی آسیب‌شناسی دامپزشکی، تهران: دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۳.
2. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J* 1999; 138: 569-75.
3. Deodato B, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Arlotta M, Minutoli L, *et al.* Cardioprotection by the phytoestrogen genistein in experimental myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1683-90.
4. Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, *et al.* Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 414-26.
5. Gao WD, Liu Y, Mellgren R, Marban E. Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium: a consequence of  $Ca^{2+}$ -dependent proteolysis? *Circ Res* 1996; 78: 455-65.
6. Gottlieb RA, Burieson KO, Kloner RA, Babior BM. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiocytes. *J Clin Invest* 1994; 94: 1625-9.
7. Harper IS, Bond JM, Chacon E, Reece JM, Herman B, Lemasters JJ. Inhibition of  $Na^+/H^+$  exchange preserves viability, restores mechanical function, and prevents the pH paradox in reperfusion injury to rat neonatal myocytes. *Basic Res Cardiol* 1993; 88: 430-42.
8. Kang P.M. and Seigo I., Apoptosis and heart failure. *Circ Res* 2000; 86:1107.
9. James TN. Apoptosis in cardiac disease. *Am J Med* 1999; 107(6): 606-20.
10. Elsässer A, Suzuki K, Lorenz-Meyer S, Bode C, Schaper J. The role of apoptosis in myocardial ischemia. *Basic Res Cardiol* 2001; 96: 219-20.
11. Khojenezhad A, Jalili Z, Anthony J. Apoptosis: pathophysiology and therapeutic implications for the cardiac surgeon. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 1109-18.
12. Kim GT, Chun YS, Park JW, Kim MS. Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 209: 619-24.
13. Zhao Z.Q. *et al.*, Reperfusion induces myocardial apoptosis cell death. *Cardiovascular Research* 2000; 45; 651-60.