Original Article

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۸۵، صفحات ۱۱۹ تا ۱۲۳

نقش متغیر زمان بر تغییرات آپوپتوزیس متعاقب ایسکمی- رپرفیوژن در قلب ایزوله موش صحرایی

یوسف دوستار[۱]، علیرضا گرجانی[۲]، مهرداد هاشمی[۳]، رامبد رضاپور شهیر[۴]

[۱] بخش پاتولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز
[۲] بخش فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
[۳] دانشکده پزشکی، واحد پزشکی تهران و بخش ژنتیک ملکولی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران
[۴] دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز

چکیده

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

روش بررسی: در این مطالعه تجربی رت های نر از نژاد SD با وزن ۳۳۰-۲۷۰ گرم به صورت تصادفی به چهار گروه ۱۰ تایی تقسیم و بعد از بیهوشی با پنتوباربیتال 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، ۳۰دقیقه 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 آپوپتوتیک با استفاده از کیت TUNEL POD انجام پذیرفت و سلول های میوکارد تانل مثبت اعضای هر گروه در ۵ میدان میکروسکوپی شمارش گردید و نتایج هر گروه به صورت میانگین±خطای استاندارد اندازه‌گیری بیان گردید.

یافته‌ها: در گروه کنترل تعداد سلول های آپوپتوتیک ۰/۴±۱ عدد در حالی که در گروه تیمار با عناوین T/60 min ، T/90 min وT/120 min به ترتیب ۰/۵±۲/۰ ، ۰/۳±۳/۰ و ۰/۳±۶/۰ بود. مقایسه بین گروه‌های تیمار و کنترل با استفاده از آنالیز واریانس صورت گرفت و نتایج نشان داد که اختلاف بین گروه‌های (T/120 min & T/90 min) و (T/60 min & Control) معنی دار نبود($p>0/05$) ولی بین گروه‌های(T/120 min & T/60 min) و (T/120 min & T/90 min) اختلاف معنی دار بود(به ترتیب$p<0/001$ و $p<0/01$).

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که زمان ایسکمی- رپرفیوژن می‌تواند در تغییرات آپوپتوتیک سلول های میوکارد قلب موثر باشد.

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

مقدمه

نکروز و آپوپتوز دو راه مجزای اصلی برای مرگ سلولی در سلول‌های عضلانی قلبی می باشند که با وقوع ایسکمی (I) و رپرفیوژن (R) همراهی دارند. کاردیوسیت‌های تحت نکروز و آپوپتوز اختصاصات مورفولوژیکی و بیولوژیکی خیلی نزدیکی به هم دارند. نکروز که اغلب مرگ سلولی تصادفی یا پاتولوژیک خوانده می‌شود با وسیله آماس و یا شکاف شدید سلول، دناتوره و منعقد شدن پروتئین‌های سیتوپلاسم، شکست و تخریب

آدرس نویسنده مسوول: 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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-07]

ارگانل‌های داخل سلولی و پاسخ آماسی شدید همراه است. آپوپتوز در مقابل نکروز، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و کنترل شدهٔ 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 می دهد که ایسکمی-رپرفوژن، آپوپتوز سلول های 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 رپرفوژن ردیابی شده، اما این حالت در میوکاردهایی که فقط دچار ایسکمی شده‌اند دیده نمی‌شود. سپس محققان با بررسی های انجام شده پیشنهاد نمودند که آپوپتوز فقط هنگام رپرفیوژن بوجود می‌آید(۶).

با مطالعهٔ مختصر در متون پاتولوژی نقش آپوپتوز خارج از تنظیم در بسیاری از اختلالات و بیماری‌ها آشکار شده است. امروزه کمتر بیماریی را می‌توان یافت که آپوپتوز در آن نقشی نداشته باشد. با اشارهٔ مختصر به نقش آپوپتوز در بیماری‌ها، بخش عمده‌ای ازپاتوژنز بیماری‌ها توجیه می‌گردد. مطالعات دیگر ی نیز نشان دادند که پریودهای 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 آپوپتوزمتعاقب 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 پریود ایسکمی پره‌کاندیشنیک مختصر تولید می شود (۸و۶). لسکی با مطالعه اثرات احتمالی ایسکمی- رپرفیوژن در موارد آنژیوپلاستی عروق کرونری بیان نمود که افزایش مدت زمان رپرفیوژن می تواند در عوارض بعد از عمل جراحی موثر واقع گردد(۷و۶). آسیب‌شناسی انفارکتوس قلبی شامل عوامل و وضعیت‌های متعددی است اما از دست رفتن تدریجی سلول‌های عضله قلبی یکی از مهمترین مباحث های پاتولوژیک به شمار می‌رود. با گذشت چندین سال، اطلاعات زیادی در خصوص اهمیت نقش آپوپتوزیس متعاقب انفارکتوس و ایسکمی-رپرفیوژن وجود داردکه هر کدام به طور جداگانه ای می تواند نشانگراهمیت 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 یافته های 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 ۳۰۰-۲۵۰ گرم بصورت تصادفی به چهار گروه ۱۰ تایی(یک گروه کنترل و سه گروه تیمار) تقسیم و بعد از بیهوشی با پنتوباربیتال سدیم (IP-kg/mg ۶۰- ۵۰) ، قلب آنها به سرعت ایزوله گردید و سپس به دستگاه لانگندروف محلول کربس محتوی گاز کاربوژن (۹۵٪اکسیژن و ۵٪دی اکسید کربن) با فشار ثابت و دمای ۳۷ درجه متصل شد. موش‌های گروه تیمار در زمان استابیلیزاسیون و نیز ۳۰ دقیقه ایسکمی ناحیه ای به ترتیب ۶۰ ، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه رپرفیوژن، محلول کربس معمولی دریافت داشتند . گروه های فوق براساس مدت زمان ایسکمی–رپرفیوژن به ترتیب بصورت T/60 min ، T/90 min و T/120 min نامگذاری شدند. در موش های 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

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-07]

تشخیص آپوپتوزیس(TUNEL assay) بر روی آنها انجام گرفت و با استفاده از میکروسکوپ نوری اقدام به شمارش سلول های آپوپتوتیک در ۵ میدان دید تصادفی میکروسکوپی برای هر یک از اعضای گروه تیمار و کنترل شد(۱). برای آنالیز آماری داده ها بین گروهها از آزمون آماری One-way ANOVA و Bartlett's test استفاده و نتایج هر گروه به صورت میانگین± 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 دردمای 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 بمدت۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ سانتی گراد مجددا انکوبه گردید.

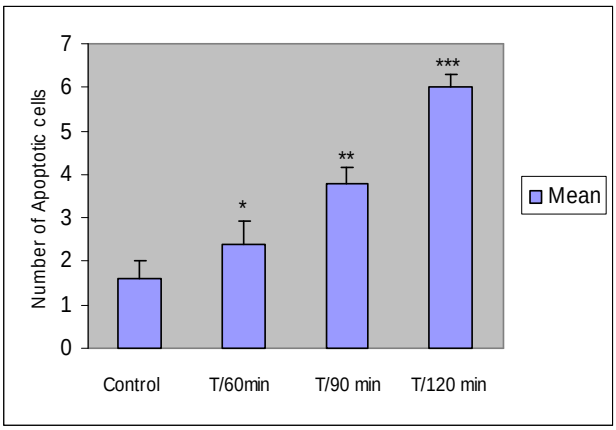
۴- شستشو با PBS و انجام رنگ آمیزی تولوئیدین بلو انجام گرفت (۱۰و۱).

یافته‌ها

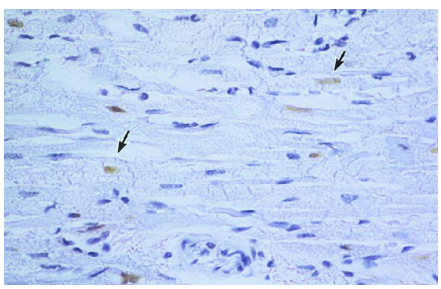
نتایج حاصله از مطالعات میکروسکوپی و تکنیک اختصاصی تانل در گروههای آزمایشی و کنترل به شرح زیر بود: مطالعات میکروسکوپی نشانگر افزایش تراکم کروماتین و فراگمانتاسیون هسته سلول‌ها و گاه تشکیل هلال کروماتینی بود. در رنگ آمیزی تانل سلول های آپوپتوتیک به علت فراگمانتاسیون DNA سلول که اغلب به صورت مضاربی از ۲۰۰-۱۸۰ جفت باز بودند به رنگ قهوهای روشن تا تیره در بافت میوکارد قلب مشاهده گردیدند، به طوری که تعدادسلول‌های آپوپتوتیک در گروه کنترل ۱/۶±۰/۴ عدد و در گروههای تیمار به ترتیب ۲/۴±۱/۱۴، ۳/۸±۰/۸۳۶ و۶±۰/۷۰۷ 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 ($p>۰/۰۵$) اما بین گروههای T/120min و T/60min ؛ و T/120minو T/90min معنی دار بود (به ترتیب $p<۰/۰۰۱$ و $p<۰/۰۱$). در جدول۱ ارقام به دست آمده از آنالیز آماری داده ها ارایه شده است.

جدول۱- میانگین، انحراف معیار وخطای تعداد سلول‌های آپوپتوتیک درگروه‌های تیمار و کنترل

گروه‌ها	میانگین	میانگین± انحراف معیار	میانگین± خطای استاندارد
T/60 min	۲/۴	۲/۴±۱/۱	۲/۴±۰/۵
T/90 min	۳/۸	۳/۸±۰/۸	۳/۸±۰/۳
T/120min	۶/۰	۶±۰/۷۰۷	۶±۰/۳۱۶
Control	۱/۶	۱/۶±۸۰	۱/۶±۰/۴

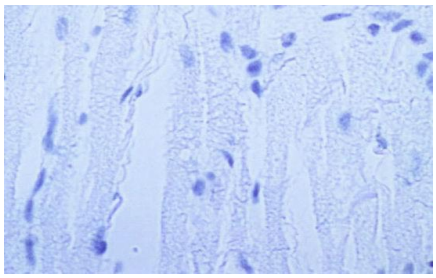


نمودار ۱- میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در ۵ میدان دید میکروسکوپی به‌دست آمده از بافت میوکارد گروه‌های تیمار و کنترل به روش تانل در موشهای صحرائی (n=۱۰). داده ها به صورت Mean±SEM نمایش داده شده‌اند. *p>0.05، **p<0.01 و*p<0.001 در مقایسه با گروه کنترل.**



تصویر۱- فتومیکروگراف مقطعی از بافت میوکارد موش رت از گروه تیمار که مدت زمان رپرفیوژن آن ۱۲۰ دقیقه بوده است. سلول های تانل مثبت روبروی پیکان ها قابل مشاهده هستند. (رنگ آمیزی تانل ، بزرگنمایی ۱۰۰ ×)

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-07]



تصویر۲- 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 Apaf-1[3]و dATP و Apaf-3 باعث راه‌اندازی آبشار 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 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 می توانند در مورد ارتباط زمان با تغییرات مرگ سلولی مطرح باشند، این فاکتورها عبارتند از :

۱- میزان کلسیم سیتوزول سلول که در زمان‌های بالای ۶۰ دقیقه رپرفیوژن تقریبا به حداکثر مقدار خود رسیده و باعث افزایش پتانسیل نفوذ پذیری غشای میتوکندری و تسهیل خروج بیشتر سیتوکروم C و AIF می گردد اما معمولا میزان AIF بیشتر از سیتوکروم C است و علت آن این است که سیتوکروم C در شرایط معمول در فضای بین غشایی با فسفولیپید های آنیونی نظیر کاردیولیپین باند شده است در حالی که AIF در فضای بین غشایی با هیچ ماده ای باند نمی‌شود و بنابراین AIF براحتی به خارج از غشا راه پیدا می کند(۱۳و۴).

۲- میزان بیان ژن های محرک و القاگر آپوپتوزیس نظیر BAX که در تشکیل کانال های غشایی میتوکندریایی و خروج سیتوکروم C نقش تعیین کننده ای دارند و در مدت زمان های طولانی رپرفیوژن حضور پروتئین فعال BAX بارزتر می‌باشد(۱۲).

۳- تحقیقات کیم و همکاران بیان می دارد که میزان فعالیت کاسپاز ۳ که عامل بسیار موثر در آپوپتوزیس می باشد بعد از ۲ ساعت از رپرفیوژن افزایش می یابد و بنابراین اگر تغییرات در زمان ۱۲۰ دقیقه تا حدودی بیشتر است شاید به علت حضور مقادیر کافی آنزیم های کاسپازی، مخصوصا کاسپاز ۳ می باشد (۱۳و۱۲و۱۱).

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 مخصوصا 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

[1]Apoptotic Protein activated Factor-1
[2] Apoptosis Inducing Gactor

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-07]

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

تشکر و قدردانی

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

REFERENCES

۱. دوستاری. مطالعه آزمایشی آپوپتوز 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 phyto-estrogen 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 myocardiocytes. 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 Cardial 2001; 96: 219-20.

11. Khoynezhad A, Jalili Z, Anthony J. Apoptosis: pathophisiology 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.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-07]