

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 شهری^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 نراز نژاد SD با وزن ۲۷۰-۳۳۰ گرم به صورت تصادفی به چهار گروه ۱۰ تایی تقسیم و بعد از بیهوشی با پنتوباریتال سدیم (IP-kg/mg, 50-60)، قلب رت های گروه تیمار به سرعت ایزوله و به دستگاه لانگدروف محلول کربس با فشار ثابت و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد متصل شدند و در زمان استabilizاسیون، 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 اینمو هیستوشیمی سلول های آپوپتویک 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 اندازه گیری بیان گردید.

یافته ها: در گروه کنترل تعداد سلول های آپوپتویک $1 \pm 0/4$ عدد در حالی که در گروه تیمار با عنوان $T/60$ min، $T/120$ min و $T/90$ 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 & $T/120$ min) معنی دار نبود($p > 0/05$) ولی بین گروه های ($T/60$ min & Control) و ($T/120$ min & $T/90$ min) اختلاف معنی دار بود(به ترتیب $p < 0/01$ و $p < 0/001$).

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

واژگان کلیدی: ایسکمی-رپرفیوژن، آپوپتوزیس، انفارکتوس.

مقدمه

(I) و رپرفیوژن (R) همراهی دارند. کاردیوسیت های تحت نکروز و آپوپتوز 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، دناتوره و منعقد شدن پروتئین های سیتوپلاسم، شکست و تخریب

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

آدرس نویسنده مسؤول: 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

پره کاندیشنیک مختصر تولید می شود (۶۰-۸۰٪). لسکی با مطالعه اثرات احتمالی ایسکمی-رپرفیوژن در موارد آنتیوپلاستی عروق کرونری بیان نمود که افزایش مدت زمان رپرفیوژن می تواند در عوارض بعد از عمل جراحی موثر واقع گردد (۷۰-۶۰٪). آسیب شناسی انفارکتوس قلبی شامل عوامل و وضعیت های متعددی است اما از دست رفتن تدریجی سلول های عضله قلبی یکی از مهمترین مباحث های پاتولوژیک به شمار می رود. 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 می تواند نشانگر اهمیت موضوع باشند. به همین خاطر امکان محدود کردن مرگ سلول های عضله قلبی به وسیله ممانعت از آپوپتوز به صورت بالقوه در درمان انفارکتوس قلبی و رعایت زمان ایسکمی-رپرفیوژن اهمیت دارد (۹-۶۰٪). در این مطالعه مانیز 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 روش ها

در این مطالعه تجربی موش های 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 بهبودی بآپنوباریتال سدیدم (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٪ نیتروژن) با فشار ثابت و دمای ۳۷ درجه متصل شد. موش های گروه تیمار در زمان استabilیزاسیون 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 یه طور دقیق تر ایسکمی-رپرفیوژن اعمال نگردید. در گروه های تیمار پس از اتمام رپرفیوژن، قلب در داخل فیکساتیو و به مدت ۲۴ ساعت در داخل دستگاه اوتونکنیکوم با فرمالین، اتانول، گزیلول و پارافین مجاور گردید. سپس با تهیه مقاطع بافتی، متدهای اختصاصی

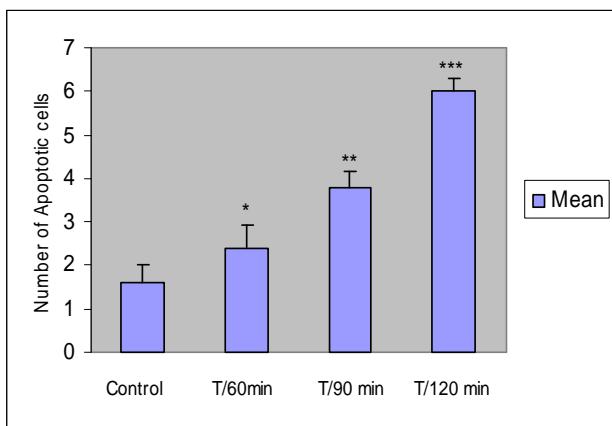
ارگانل های داخل سلولی و پاسخ آماسی شدید همراه است. آپوپتوز در مقابل نکروز، مرگ سلولی برنامه ریزی شده و کنترل شده ژنتیکی است. وجهه مورفو لوژیک اصلی آن شامل نشت سلولی، تراکم کروماتینی، تشکیل حبابچه های سیتوپلاسمی و اجسام آپوپتوزیک می باشد که بدون از دست دادن تمامیت غشای سلولی و پاسخ التهابی رخ می دهد. اگرچه مکانیسم های نکروز و آپوپتوز متفاوت است ولی تحت شرایط پاتولوژیک صفات مشترکی بین این دو فرآیند وجود دارد (۱-۵). مطالعات گوناگون اخیر نشان می دهد که ایسکمی-رپرفیوژن، آپوپتوز سلول های میوکاردی را در شرایط محیط زنده القا می کند. با وجود این هنوز هم این مطلب که آیا آپوپتوز به هنگام I و یا به هنگام R شروع می شود، قابل بحث و مجادله است. گوتلیب و همکاران دریافتند که سنگ محک آپوپتوز یعنی قطعات نوکلئوزومی فراغمان های DNA، در میوکارد ایسکمیک خرگوش ۳۰ دقیقه بعد از انفارکتوس و ۴ ساعت بعد از رپرفیوژن ردیابی شده، اما این حالت در میوکارد هایی که فقط دچار ایسکمی شده اند دیده نمی شود. سپس محققان با بررسی های انجام شده پیشنهاد نمودند که آپوپتوز فقط هنگام رپرفیوژن بوجود می آید (۶).

با مطالعه مختصر در متون پاتولوژی نقش آپوپتوز خارج از تنظیم در بسیاری از اختلالات و بیماری ها آشکار شده است. امروزه کمتر بیماری را می توان یافت که آپوپتوز در آن نقشی نداشته باشد. با اشاره مختصر به نقش آپوپتوز در بیماری ها، بخش عمده ای از پاتولوژی بیماری ها توجیه می گردد. مطالعات دیگری نیز نشان دادند که پریودهای مختصر و کوتاه ایسکمی-رپرفیوژن تجربی و آزمایشی در کلیه راست باعث آپوپتوز می شود در حالی که ایسکمی طولانی شده نکروز تولید می کند. گوتلیب و همکاران نشان دادند که ایسکمی-رپرفیوژن منجر به آپوپتوز در میوسیت های رت می شود و نقش pH و ATPase را در آپوپتوز متعاقب رپرفیوژن شرح دادند. پیوست 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 تشريح کردند، ولی نتوانستند مشخص کنند که چه میزان آپوپتوز در طی هر پریود ایسکمی

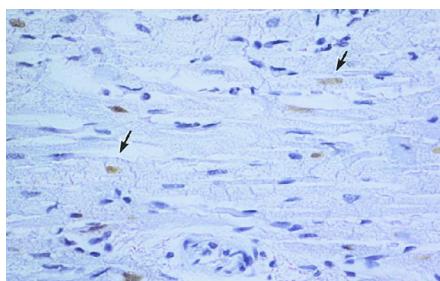
$T/60\text{min}$ و $T/120\text{min}$) اما بین گروههای $T/120\text{min}$ و $T/90\text{min}$ معنی دار بود (به ترتیب $p<0.001$ و $p<0.05$). در جدول ۱ ارقام به دست آمده از آنالیز آماری داده ها ارایه شده است.

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

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



نمودار ۱- میانگین تعداد سلول های آپوپتوتیک در ۵ میدان دید میکروسکوپی به دست آمده از بافت میوکارد گروههای تیمار و کنترل به روش تانل در موشهای صحرائی ($n=10$). داده ها به صورت Mean \pm SEM نمایش داده شده اند. نتایج میکروسکوپی به دست آمده از بافت میوکارد موس رت از گروه تیمار که مدت زمان ریپروفیوژن آن ۱۲۰ دقیقه بوده است. سلول های تانل مثبت روپروری پیکان ها قابل مشاهده هستند. (رنگ آمیزی تانل، بزرگنمایی $100\times$)



تصویر ۱- فتو میکرو گراف مقطعی از بافت میوکارد موس رت از گروه تیمار که مدت زمان ریپروفیوژن آن ۱۲۰ دقیقه بوده است. سلول های تانل مثبت روپروری پیکان ها قابل مشاهده هستند. (رنگ آمیزی تانل، بزرگنمایی $100\times$)

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 گروه ها از آزمون آماری Bartlett's test و One-way ANOVA 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 DAB سانتی گراد با محلول PBS شستشو و سپس با محلول نیز مجاور گشته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ سانتی گراد مجدد انکوبه گردید.

۴- شستشو با PBS و انجام رنگ آمیزی تولوئیدین بلو انجام گرفت (۱۰ و ۱۰۱).

یافته ها

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 فرآگماتاسیون هسته سلول ها و گاه تشکیل هلال کروماتینی بود. در رنگ آمیزی تانل سلول های آپوپتوتیک به علت فرآگماتاسیون DNA سلول که اغلب به صورت مضاربی از ۱۸۰-۲۰۰ جفت باز بودند به رنگ قوه های روشن تا تیره در بافت میوکارد قلب مشاهده گردیدند، به طوری که تعداد سلول های آپوپتوتیک در گروه کنترل $1/6\pm0/4$ عدد و در گروههای تیمار به ترتیب $1/6\pm0/4$ ، $2/4\pm1/14$ ، $3/8\pm0/836$ و $6\pm0/707$ عدد بود. مقایسه بین گروههای تیمار و کنترل با استفاده از آنالیز واریانس صورت گرفت و به ترتیب اختلاف بین گروه های $(T/120\text{ min})$ & $(T/90\text{ min})$ و $(T/60\text{ min})$ & (Control) معنی دار نبود.

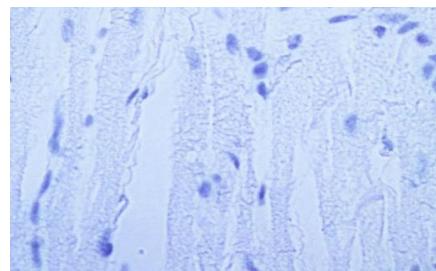
مشاهده شد که با نتایج کارهای تحقیقاتی سایر دانشمندان همخوانی دارد. به طوری که Albrecht Elsässer آپوپتویک را در زمان ۱۲۰ دقیقه رپرفیوژن مشاهده کرده بودند (۲،۵،۶). اما مطالعات ایشان نشان می‌دهد که در ۱۸ ساعت رپرفیوژن بافتی نیز هنوز تغییرات آپوپتویک قابل رویت می‌باشد. فاکتورهای متعددی می‌توانند در مورد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

۱- میزان کلسیم سیتوزول سلول که در زمان‌های بالای ۶۰ دقیقه رپرفیوژن تقریباً به حداقل مقدار خود رسیده و باعث افزایش پتانسیل نفوذ پذیری غشای میتوکندری و تسهیل خروج بیشتر سیتوکروم C و AIF C 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 (۴) .

۲- میزان بیان ژن‌های محرک و القاگر آپوپتوزیس نظیر BAX که در تشکیل کانال‌های غشایی میتوکندریایی و خروج سیتوکروم C نقش تعیین کننده‌ای 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 یشتر است شاید به علت حضور مقادیر کافی آنزیم‌های کاسپازی، مخصوصاً کاسپاز^۳ می‌باشد (۱۱ و ۱۲) .

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 آپوپتویک در مواد رپرفیوژن بافتی اثر مفیدی داشته باشد. استفاده از داروهای آنتی‌آپوپتویک در موارد رپرفیوژن بافتی مخصوصاً پیوند اعضاء (کلیه و قلب) در زمان مناسب خود اثر ویژه‌ای در مهار آسیب بافتی خواهد داشت. با توجه به نتایج این کار پژوهشی توصیه می‌گردد



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

بحث

در مبحث پاتوفیزیولوژی آپوپتوزیس کاردیومیوسیت‌ها عوامل متعددی در القای آپوپتوزیس به عنوان فاکتور پروآپوپتویک 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-1^۳ و dATP باعث راهاندازی آبشار آنزیم‌های کاسپازی می‌گردد که انتهای مسیر فوق مرگ آپوپتویک سلول می‌باشد. از طرف دیگر وجود Ca⁺⁺ بالا در سیتوپلاسم سلول به دنبال رپرفیوژن بافتی باعث فعل شدن آنزیم آندونوکلئاز و فرآگماناتاسیون رشته DNA با نوکلئوزوم‌های مضارب ۱۸۰-۲۰۰ جفت‌بازی گشته و مرگ آپوپتویک 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^۴ یا فاکتور القاگر آپوپتوزیس است که بالارفتن 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 آپوپتویک در گروه‌های تیمار و کنترل بود، به طوری که حداقل سلول‌های آپوپتویک در گروه کنترل و حداقل تعداد سلول‌های آپوپتویک در گروه T/120 min

¹Apoptotic Protein activated Factor-1

²Apoptosis 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 ریپر فیوژن بافتی با توجه به افزایش تعداد سلول‌های آپوپتویک در واحد زمان داروهای آنتی آپوپتویک قبل از ریپر فیوژن بافتی یا در اوایل رویداد ریپر فیوژن تجویز گردد (۳، ۴، ۸).

REFERENCES

- دوستاری. مطالعه آزمایشی آپوپتوز القا شده توسط ویروس عامل بیماری بورس عفونی جوجه‌ها با استفاده از متod تشخیصی TUNEL و میکروسکوپ الکترونی. پایان‌نامه جهت دریافت دکترای تخصصی آسیب‌شناسی دامپزشکی، تهران: دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۳.
- Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. Am Heart J 1999; 138: 569-75.
- 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.
- 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.
- 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.
- Gottlieb RA, Burieson KO, Kloner RA, Babior BM. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit myocardiocytes. J Clin Invest 1994; 94: 1625-9.
- 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.
- Kang P.M. and Seigo I., Apoptosis and heart failure. Circ Res 2000; 86:1107.
- James TN. Apoptosis in cardiac disease. Am J Med 1999; 107(6): 606-20.
- 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.
- Khoynezhad A, Jalili Z, Anthony J. Apoptosis: pathophysiology and therapeutic implications for the cardiac surgeon. Ann Thorac Surg 2004; 78: 1109-18.
- 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.
- Zhao Z.Q. et al, Reperfusion induces myocardial apoptosis cell death. Cardiovascular Research 2000; 45; 651-60.