فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۵ (٤)، ۵۷۲ – ۵۸۲
زمستان ۱۳۹۰

فیزیولوژی و فارماکولوژی

اثر پیش درمانی با اکسی توسین بر آنزیمهای قلبی در ایسکمی–پرفیوژن مجدد موضعی در قلب موش صحرایی

علی محمد علیزاده[۱]، مهدیه فقیهی[۲*]، وحید خوری[۳]، مریم محسنی کیا[۴]
۱. مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۳. مرکز تحقیقات قلب وعروق گلستان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان
۴. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران، تهران

دریافت: ۱۷ فروردین ۹۰ پذیرش: ۲۷ شهریور ۹۰

چکیده

مقدمه: پیش شرطی سازی قلب یک روش مهم شناخته شده برای کاهش آسیب های ناشی از ایسکمی طولانی مدت می باشد. هدف مطالعه حاضر شناسایی اثرات پیش شرطی سازی اکسی توسین و مکانیسم های احتمالی آن بر آنزیمهای قلبی شامل کراتین کیناز (CK-MB) و لاکتات دهیدرژناز (LDH) در موش صحرایی بیهوش می باشد.

روش ها: ۸۴ سر موش صحرایی به ۱۴ گروه ۶ تایی تقسیم گردیدند. قلب کلیه حیوانات تحت ۲۵ دقیقه ایسکمی و ۱۲۰ دقیقه پرفیوژن مجدد قرار گرفت. در گروه اکسی توسین، ۲۵ دقیقه قبل از ایسکمی، اکسی توسین (۰/۰۳ µg/kg) و در گروههای دیگر ۱۰ دقیقه قبل از اکسی توسین، داروهای atosiban (۱/۵ µg/kg)، آنتاگونیست گیرنده اکسی توسین)، 5-hydroxydecanoic (۱۰ mg/kg)، مهارکننده کانالهای پتاسیمی میتوکندریایی حساس به ATP)، atractyloside (۵ mg/kg)، بازکننده منافذ نفوذپذیرگذرای میتوکندریایی)، chelytraine (۵ mg/kg)، مهار کننده آنزیم پروتئین کیناز C) و N-acetylcysteine (۲۰۰ mg/kg)، جمع کننده گونه های فعال اکسیژن) تزریق شدند. سپس سطح آنزیمهای قلبی شامل CK-MB وLDH اندازه گیری گردیدند.

یافته ها: تجویز اکسی توسین قبل از ایسکمی طولانی مدت موجب کاهش معنی دار در سطح آنزیمهای قلبی CK-MB و LDH در مقایسه با گروه ایسکمی–پرفیوژن مجدد گردید. تجویز atosiban، 5-hydroxydecanoic، atractyloside، chelytraine و N-acetylcysteine موجب حذف اثرات حفاظت قلبی اکسی توسین شد.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان می دهد که مکانسیم های حفاظتی اکسی توسین در قلب موش صحرایی کمپلکس بوده و مسیرهای سیگنالینگ می تواند از طریق کانالهای پتاسیمی میتوکندریایی حساس به ATP، منافذ نفوذپذیر گذرای میتوکندریایی، فعالیت آنزیم پروتئین کیناز C و گونه های فعال اکسیژن باشد.

واژه‌های کلیدی: ایسکمی–پرفیوژن مجدد، اکسی توسین، atosiban، 5-hydroxydecanoic، atractyloside، chelytraine، N-acetylcysteine

مقدمه

هنگامی که ایسکمی منجر به نکروز شدن سلول می گردد، برقراری مجدد جریان خون، منجر به ایجاد پاسخ التهابی و تشدید آسیب موضعی می شود، این پدیده تحت عنوان ایسکمی–پرفیوژن مجدد (I/R) خود سبب آپوپتوزیس و مرگ سلولی می شود. پیش شرطی سازی (PC)، مواجهه کردن بافت با یک عامل آسیب رسان کم قدرت، قبل از مواجهه با عامل آسیب رسان قویتر و کشنده، می تواند تا با تحریک مکانیسم–

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: faghihim@sina.tums.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

Archive of SID
www.SID.ir

های دفاعی درونی، مقاومت بافت را افزایش داده و شدت ضایعات ناشی از I/R را کاهش دهد. شکل گیری پدیده PC نشانه آن است افکتورهای متفاوتی شامل پیکهای داخل سلولی، کانالهای یونی، آنزیمها و سایر فاکتورها در آن دخیل اند [۳۱].

آنزیم پروتئین کیناز C (PKC) با فسفریلاسیون پروتئینهای غشایی سبب تغییر هدایت یونی شده و در رشد، تمایز سلولی و تنظیم فوری عملکرد برخی افکتورها نقش دارد [۱۰]. در مطالعات مختلف مشخص شده که فعال کننده های این آنزیم توانسته‌اند سبب القای PC شوند [۳۱]. همچنین گفته می شود که فعال شدن PKC و جابجایی آن در سیتوزول نهایتاً می‌تواند منجر به فسفریلاسیون و بازشدن کانالهای پتاسیمی حساس به ATP (K_{ATP}) موجود در سارکولما و غشای داخلی میتوکندری شود [۲۹]. باز شدن کانال K_{ATP} میتوکندریایی (mK_{ATP}) و ورود یون پتاسیم به داخل میتوکندری، از کوچک شدن اندازه و حجم ماتریکس جلوگیری نموده و با این عمل سبب حفظ و نگهداری ساختمان و عملکرد میتوکندری می شود. گزارش شده باز شدن کانالهای mK_{ATP}، سبب مهار منافذ نفوذپذیر گذرای میتوکندری (mPTP) می شود که خود در ایجاد حفاظت قلبی نقش دارد. با باز شدن mPTP، سد نفوذناپذیر غشای داخلی شکسته شده و سیتوکروم C بداخل سیتوزول و برخی پروتئینهای آپوپتیک به داخل فضای بین دو غشاء آزاد شده و آپوپتوز به وجود می آید. همچنین نشان داده شد گونه های فعال اکسیژن (ROS) ملکولهای مهم در مسیر انتقال پیام در داخل سلول هستند که همزمان با القای PC، مقدار آنها نیز افزایش می‌یابد. این ملکولها نقش بسیار مهمی در شروع فاز زودرس و فاز دیررس PC دارند و احتمالاً منبع اصلی تولید کننده آنها میتوکندریها می‌باشند [۱۱،۳۹]. از طرف دیگر نشان داده شده است که اندازه گیری فعالیت کراتین کیناز (CK-MB) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) برای تشخیص آسیبهای میوکاردی و ارزیابی وسعت ضایعات ایجاد شده به کار می رود. نشان داده شده است که می توان با جلوگیری از آسیبهای میوکاردی باعث کاهش آنزیمهای مذکور در قلب موش صحرایی [۲۱] و انسان [۱۹] شد. مطالعات گذشته نشان داده است که عوامل شیمیایی و فارماکولوژیک متعدد نظیر اکسی توسین موجب ایجاد پدیده PC در قلب می شود.

در مطالعه ای نقش محافظتی اکسی توسین در آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیوی نشان داده شد [۴۰]. همچنین نتایج مطالعه دیگر نشان داد که سطوح افزایش یافته آنزیمهای AST وALT پلاسما با جراحت I/R کبدی، توسط اکسی توسین کاهش پیدا کرده است [۲۹]. بطور مشابه اثر مهاری اکسی توسین روی LDH سرم بعنوان عامل مهم در فرایند التهابی سیستمیک در مدل گونه های مختلف موشهای صحرائی نشان داده شد [۴۰، ۳۷]. در سال ۲۰۰۹ Ondrejcakova و همکاران در قلب ایزوله نشان دادند که اکسی توسین موجب محافظت بافت قلبی در مقابل ایسکمی-پرفیوژن مجدد می گردد [۳۴]. در مطالعه قبلی ما نشان دادیم که اکسی توسین اندوژن می تواند بعنوان یک عامل مهم در محافظت قلب موش صحرایی بیهوش عمل کند [۲]. همچنین ما نشان دادیم که یکی از مکانیسم های اکسی توسین در محافظت قلب موش صحرایی، کانالهای mKATP می باشد [۱]. با شواهد فوق هدف مطالعه حاضر، بررسی اثرات پیش شرطی سازی ناشی از اکسی توسین بر مقادیر آنزیمهای قلبی آزاد شده در طی ایسکمی-پرفیوژن مجدد و همچنین نقشPKC، کانالهای mK_{ATP}، منافذ mPTP و ROS در پیش درمانی با اکسی توسین در قلب موش صحرایی می باشد.

مواد و روش ها

داروهای مورد استفاده شامل Oxytocin (عاملی برای ایجاد پیش شرطی سازی قلب)، Atosiban (آنتاگونیست گیرنده اکسی توسین)، 5-Hydroxidecanoate (مهارکننده کانالهای mK_{ATP})، Atractyloside (بازکننده منافذ mPTP)، Chelytraine (مهارکننده آنزیم PKC) و N-acetylcysteine (عامل جمع آوری کننده ROS) می باشد. تمام داروها از شرکت سیگما خریداری شده است.

حیوانات بطور تصادفی به ۱۴ گروه ۶ تایی تقسیم شده اند که عبارتند از:

۱- Sham: در این گروه پس از جراحی ۲۰۰ دقیقه پرفیوژن اعمال گردید.

۲- I/R: ۵۵ دقیقه پس از جراحی، ۲۵ دقیقه ایسکمی و متعاقب آن ۱۲۰ دقیقه پرفیوژن مجدد اعمال گردید.

۳- OT: ۲۵ دقیقه قبل از ایسکمی، اکسی توسین (µg/kg

www.SID.ir
Archive of SID

i.p ۰/۰۳) [۲۳] تزریق و مانند گروه I/R عمل شد.

۴- OT/ATO: آتوسیبان (۱/۵ µg/kg i.p) [۲۳] ۱۰ دقیقه قبل از تزریق اکسی توسین، به عنوان آنتاگونیست گیرنده اکسی توسین تزریق و مانند گروه OT عمل شد.

۵-ATO: آتوسیبان ۳۵ دقیقه قبل از ایسکمی تزریق شد و مانند گروه I/R عمل شد.

۶- OT/5HD: در این گروه، ۱۰ دقیقه قبل از تزریق اکسی توسین، 5-HD (10 mg/kg i.v) [۲۵] به عنوان مهار کننده کانالهای پتاسیمی میتوکندریایی حساس به ATP، تزریق و مانند گروه OT عمل شد.

۷- 5-HD: ۳۵ دقیقه قبل از القاء ایسکمی، 5-HD تزریق و مانند گروه I/R عمل شد.

۸- OT/ATRC: در این گروه ۱۰دقیقه قبل از تزریق اکسی توسین، ATRC (5 mg/kg i.v) [۳۵] به عنوان باز کننده منافذ نفوذپذیرگذرای میتوکندری، تزریق و مانند گروه OT عمل شد.

۹- ATRC: ۳۵ دقیقه قبل از ایسکمی، ATRC تزریق و مانند گروه I/R عمل شد.

۱۰- 5-HD/ATRC: در این گروه ۱۰ دقیقه قبل از تزریق اکسی توسین، 5-HD به همراه ATRC تزریق و مانند گروه OT عمل شد.

۱۱- OT/CHE: ۱۰ دقیقه قبل از تزریق اکسی توسین، CHE (5 mg/kg i.p) [۷] به عنوان مهار کننده پروتئین کیناز C، تزریق و مانند گروه OT عمل شد.

۱۲- CHE: در این گروه ۳۵ دقیقه قبل از ایسکمی، CHE تزریق و مانند گروه I/R عمل شد.

۱۳- OT/NAC: ۱۰ دقیقه قبل از تزریق اکسی توسین، NAC (200 mg/kg i.p) [۳۳] به عنوان جمع کننده گونه های فعال اکسیژنی، تزریق و مانند گروه OT عمل شد.

۱۴- NAC: در این گروه ۳۵ دقیقه قبل از ایسکمی، NAC تزریق و مانند گروه I/R عمل شد.

جراحی حیوانات: در این مطالعه از ۸۴ سر موش صحرایی نر، نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۳۵۰-۳۰۰ گرم موجود در حیوانخانه گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران استفاده گردید. این حیوانات تحت شرایط استاندارد نور (۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی) و حرارت (۲±۲۲ سانتی گراد) نگهداری می شدند و آب و غذا در تمام مدت بدون محدودیت در اختیار حیوانات قرار می گرفت. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت.

در ابتدا حیوان با تزریق داخل صفاقی پنتوباربیتال سدیم (۵۰ mg/kg) بیهوش و سپس ناحیه گردن و قفسه سینه آن کاملاً شیو گردید. لامپ کوچکی در کف تخت جراحی تعبیه شده تا درجه حرارت بدن حیوان را در محدوده ۳۷ درجه سانتیگراد حفظ گردد. از ترمومتر مقعدی برای سنجش درجه حرارت بدن حیوان استفاده می شد. ورید دمی با یک آنژیوکت زرد رنگ کانوله شده و جهت تزریق داروها و سرم استفاده می گردید. در ابتدا به حیوانات هپارین (۲۰۰ U/kg) وریدی تزریق می شد. جهت ثبت لید II الکتروکاردیوگرام، از طریق سوزنهای زیر جلدی الکترود مثبت به پای چپ، الکترود منفی به دست راست و الکترود خنثی به پای راست حیوان متصل می شدند و با تقویت توسط بیوآمپلی فایر، ECG حیوان توسط Power lab ثبت می گردید. پس از آماده شدن حیوان، اندامهای آن روی تخت جراحی فیکس شده و جهت تراکئوستومی و کانولاسیون نای و شریان کاروتید، با قرار دادن بالشتک کوچکی در زیر گردن، سر حیوان در وضعیت راست قرار می گرفت. ناحیه پوست گردن در خط وسط برش داده و پس از کنار زدن عضلات گردنی، شریان کاروتید پیدا شده و عصب واگ از آن جدا می گردید. سپس شریان کاروتید کانوله و به ترانسدیوسر فشار متصل می شد تا بطور مستقیم فشار خون شریانی در طی تمام مراحل آزمایش توسط دستگاه پاورلب ثبت گردد. در ادامه، پس از یافتن نای و کانولاسیون آن با یک تیوب مناسب، به ونتیلاتور (تعداد تنفس۸۰-۷۰ بار دقیقه و حجم یک میلی لیتر به ازای هر صد گرم وزن بدن) متصل می گردید. سپس قفسه سینه در سمت چپ و در فضای بین دنده ای چهارم برش داده می شد تا قلب در معرض دید مستقیم قرار گیرد. لازم به ذکر است که در این مرحله باید با دقت برش اعمال گردد تا ریه چپ و یا قلب آسیب نبینند. پس از پاره کردن پریکارد، نخ سیلک ۶/۰ با دقت از زیر شریان کرونری قدامی نزولی چپ عبور داده می شد. سپس دو انتهای نخ از داخل تیوب نرم عبور داده و به یک Adjuster متصل می گردید. بالا کشیدن Adjuster با بستن (ligation) شریان

Archive of SID

www.SID.ir

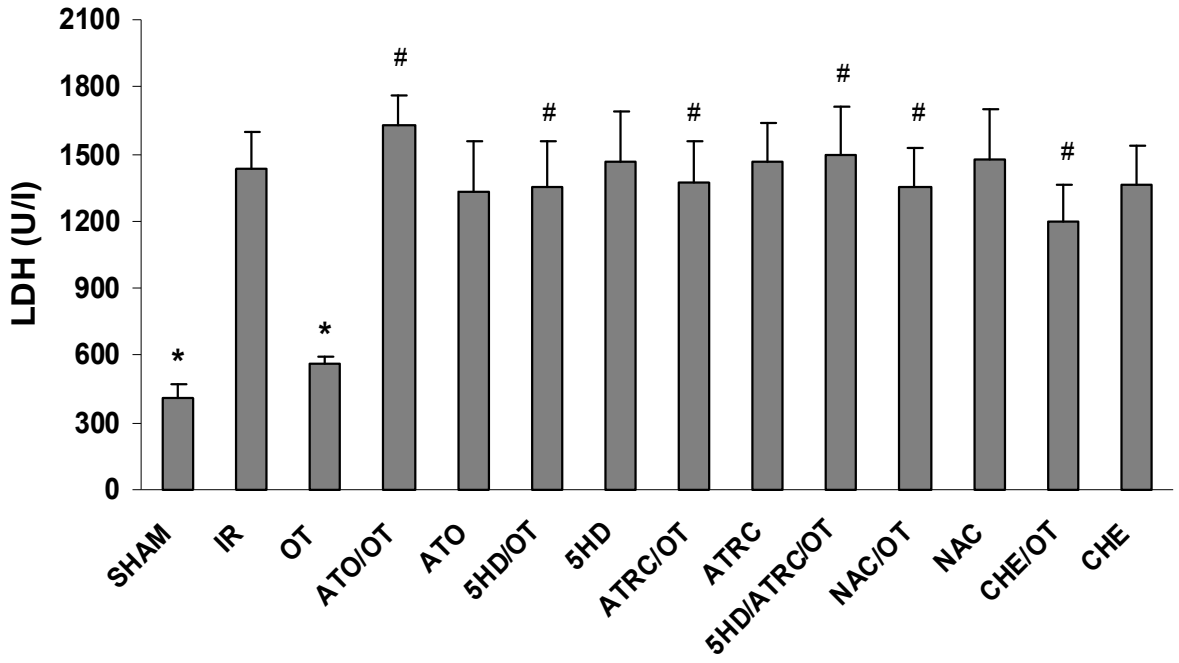
کرونری قدامی نزولی چپ، منجر بـه ایسـکمی موضـعی و آزاد کردن آن سبب برقراری پرفیوژن مجدد می شـود. چنـد دقیقـه بعد از پایان یافتن پروسه جراحی و طـی شـدن دوره ریکـاوری، حیوان به شرایط پایداری رسـیده و بـا شـروع دوره Baseline، پروتکل های مورد نظر اجرا می شدند. لازم به ذکـر اسـت کـه اگر حیوان تا این مرحله دچار آریتمی شدید فیبریلاسیون بطنـی بیش از ۵ دقیقه شود و یا فشار خون شریانی آن تا شـروع دوره Baseline به کمتر از ۸۰ میلی متر جیوه برسد از مطالعه حذف می گردید. در این مطالعـه، تمـامی حیوانـات تحـت ۲۵ دقیقـه ایسکمی و متعاقب آن ۱۲۰ دقیقه پرفیوژن مجدد قرار گرفتنـد. شاخص مورد نظر برای اطمینان از بسته شـدن شـریان کرونـر اینکه معمولاً بسته شدن شریان کرونری نزولـی چـپ و القـای ایسکمی منجر به افت شدید و ناگهانی فشار خون شریانی، بـالا رفتن قطعه ST در ECG و سیانوز قلب می شود.

اندازه گیری میزان آنزیمهای LDH وCK_{MB} پلاسما: نمونه خون جمع آوری شده (۲ سی سی) در انتهای پرفیـوژن مجـدد، بلافاصـله بـا سـرعت ۳۰۰۰ rpm و بـه مـدت ۲۰-۱۵ دقیقـه سانتریفوژ و پلاسما جدا شده و تا هنگام اندازه گیـری آنزیمهـا، در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری می شـدند. در نهایـت میـزان پلاسـمایی LDH و CK-MB بـا اسـتفاده از کیتهـای اختصاصـی و آمـاده (شـرکت پـارس آزمـون) توسـط دسـتگاه اتوآنالیزر اندازه گیری گردیدند.

آنالیز آمـاری: داده هـا بصـورت انحـراف معیـار± میـانگین گزارش گردید. جهت ارزیـابی آمـاری مقـدار آنزیمهـا از آنـالیز واریانس یکطرفه با پست تست توکی استفاده گردیـد. در تمـام آزمونها، $p<0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

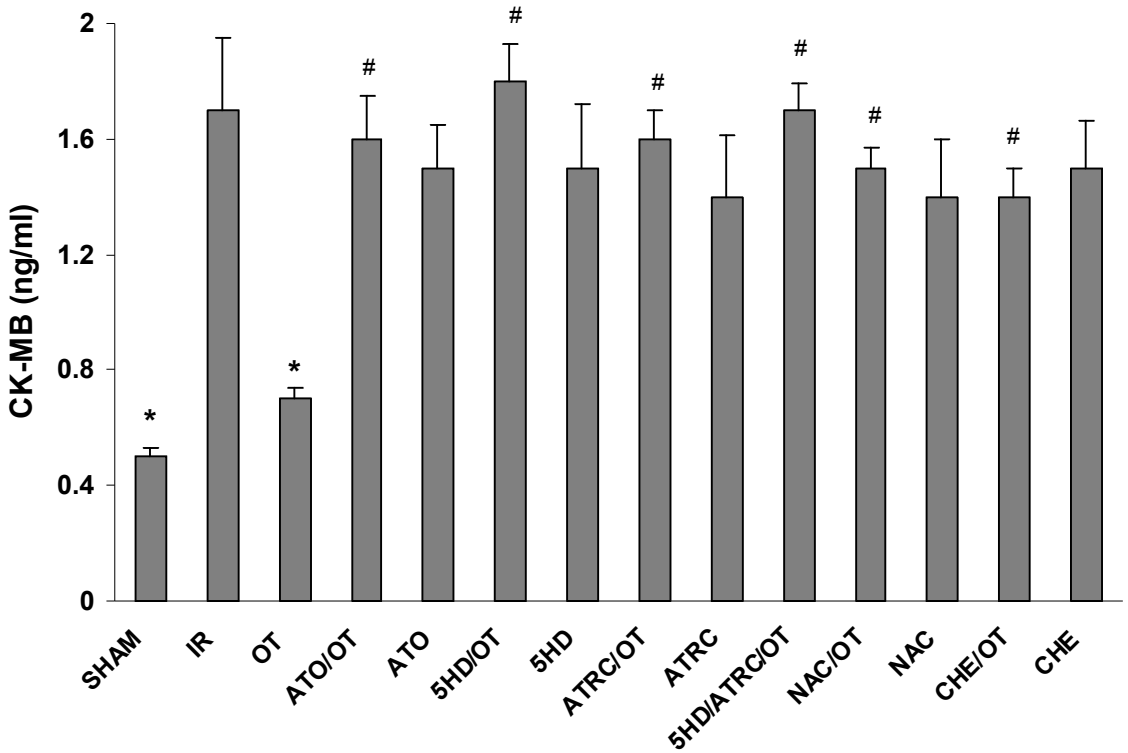
یافته ها

همواره در تمامی طول مدت انجام آزمایش فشـار شـریانی، ضربانات قلبی وECG توسط ترانسدیوسـر فشـاری متصـل بـه شریان کاروتید و الکترودهای متصل به اندامها ثبت می شـدند. پس از پایان آزمـایش، نمونـه خـون گرفتـه شـده و آنزیمهـای اختصاصی LDH و CK-MB اندازه‌گیری شدند. لازم بـه ذکـر اسـت کـه در مطالعـه حاضـر، کلیـه گروههـا بـا گـروه I/R و گروههـــــــــــای ATO/OT، 5HD/OT، ATRC/OT،



شکل ۱- اثر اکسی توسین، آتوسیبان، آتراکتیلوزید، شلاترین، استیل سیستئین و 5HD بر سطح آنزیم LDH پلاسـما. داده هـا بصـورت Mean±S.E.M نشـان داده شـده اسـت. گروههـای ATO/OT، 5HD/OT، ATRC/OT، 5HD/ATRC/OT، NAC/OT و CHE/OT با گروه OT مقایسه شدند ولی کلیه گروهها با گروه I/R مقایسه گردیدند. *اخـتلاف معنـی دار نسبت به گروه I/R را نشان می دهد ($p<0.05$).# اختلاف معنی دار نسبت به گروه اکسی توسین را نشان می دهد ($p<0.05$).
IR=Ischemia-Reperfusion; OT=Oxytocin; ATO=Atosiban; ATRC=Atractyloside; 5HD=5-hydroxydecanoic; CHE=Chelytraine; NAC=N-acetylcysteine

www.SID.ir



شکل۲- اثر اکسی توسین، آتوسیبان، آتراکتیلوزید، شلاترین، استیل سیستئین و 5HD بر سطح آنزیم CK-MB قلبی پلاسما. داده ها بصورت Mean±S.E.M نشان داده شده است.- گروههای ATO/OT، 5HD/OT، ATRC/OT، 5HD/ATRC/OT، NAC/OT و CHE/OT با گروهOT مقایسه شدند ولی کلیه گروهها با گروه I/R مقایسه گردیدند. *اختلاف معنی دار نسبت به گروه I/R را نشان می دهد (P<0.05). # اختلاف معنی دار نسبت به گروه اکسی توسین را نشان می دهد (P<0.05).
IR=Ischemia-Reperfusion; OT=Oxytocin; ATO=Atosiban; ATRC=Atractyloside; 5HD=5-hydroxydecanoic; CHE=Chelytraine; NAC=N-acetylcysteine

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز اکسی توسین قبل از ایسکمی ۲۵ دقیقه ای موجب کاهش آنزیمهای بیوشیمیایی CK-MB و LDH نسبت به I/R شده و در نتیجه اکسی توسین توانست قلب را از آسیب حاصل از ایسکمی طولانی مدت در مدل رت بیهوش حفاظت کند. از طرف دیگر ما نشان دادیم که استفاده از atosiban، بعنوان آنتاگونیست گیرنده اکسی توسین در گروه ATO/OT، chelytraine بعنوان مهارکننده PKC در گروه CHE/OT، 5HD بعنوان مهارکننده کانالهای mK_{ATP} در گروه 5HD/OT، atractyloside بعنوان باز کننده منافذ mPTP در گروه ATRC/OT و استفاده از N-acetylcysteine بعنوان جمع کننده ROS در گروه NAC/OT، موجب حذف اثر حفاظتی اکسی توسین بر قلب موش صحرایی گردید، بنابراین امکان دارد که مکانسیم های حفاظتی اکسی توسین در قلب موش صحرایی کمپلکس بوده و با مسیرهای سیگنالینگ PKC، mK_{ATP}، mPTP و ROS 5HD/ATRC/OT، NAC/OT و CHE/OT با گروه OT مقایسه گردیدند.

آنالیز بیوشیمیایی: نمودارهای ۱و ۲ سطح پلاسمایی ایزوآنزیمهای LDH و CK-MB را در گروههای مورد مطالعه نشان می دهد. القاء ایسکمی-پرفیوژن باعث افزایش سطح پلاسمایی ایزوآنزیمهای LDH و CK-MB در حیوانات مورد مطالعه شده است و استفاده از اکسی توسین قبل از ایسکمی ۲۵ دقیقه ای در گروه OT سطح آنزیمهای فوق را نسبت به گروه IR کاهش داده است ($p<0.05$) (نمودار۱،۲). سطح پلاسمایی ایزوآنزیمهای LDH و CK-MB در بقیه گروههای مورد مطالعه شامل ATO/OT، 5HD/OT، ATRC/OT، 5HD/ATRC/OT، NAC/OT وCHE/OT نسبت به گروه اکسی توسین افزایش معنی داری نشان داد ($p<0.05$)، اما در مقایسه کلیه گروهها با گروه I/R تغییر معنی داری نشان داده نشده است. همچنین سطح پلاسمایی ایزوآنزیمهای LDH و CK-MB در گروه اکسی توسین نسبت به گروه شم تفاوت معنی داری نداشته است (نمودار ۱ و ۲).

Archive of SID
www.SID.ir

مرتبط باشد. مطالعات گذشته نشان دادند که شلاترین به عنوان مهار کننده آنزیم پروتئین کیناز C می تواند عمل کند [۷] و فعال کننده های فارماکولوژیک PKC، سبب القای محافظت قلبی شده [۲۰] و در موشهای ترانس ژنیک نیز با افزایش بیان ژنی آنزیم PKC چنین حفاظتی در قلب ایجاد می شود [۱۶]. اعتقاد بر آن است تا زمانیکه جابجاییPKC (از سیتوزول به سوی غشاء) و فعالیت آن باقی باشد، اثر حفاظتی آن بر قلب ادامه خواهد داشت [۲۰]. همچنین نشان داده شده است که اکسی توسین در بافتهای مختلف باعث افزایش فعالیت آنزیم PKC می گردد [۲۴، ۶، ۸]. بخشی از اثرات اکسی توسین در عضلات رحمی با تحریک جابجایی PKC از طریق فسفولیپاز C صورت می گیرد که اکسی توسین برای انجام این جابجایی نیاز به کلسیم خارج سلولی دارد [۱۶]. همچنین آنزیم PKC می‌تواند توسط آنزیمهای فسفریله کننده، فسفولیپیدها و افزایش کلسیم داخل سلولی نیز فعال شود [۴۲] پس با توجه به نقش اکسی توسین در افزایش کلسیم داخل سلولی، این امکان وجود دارد که OT با افزایش کلسیم داخل سلول باعث افزایش فعالیت آنزیم PKC گردد. از طرف دیگر نشان داده شده است که تحریک گیرنده های G–پروتئینی نهایتا موجب فعال شدن آنزیم PKC می شود که می تواند در ایجاد PC قلبی نقش بسزایی داشته باشد [۴۲] و چون گیرنده های اکسی توسین از نوع G–پروتئین بوده [۱] پس می تواند در داخل سلول سبب فعال شدن آنزیم PKC گردد. بنابراین بنظر می رسد در مطالعه حاضر بخشی از عمل PC قلبی اکسی توسین، بواسطه فعال کردن PKC در داخل سلول باشد که منجر به PC قلب موش صحرایی شده است. مطالعات قبلی نشان دادند کانالهای mK_{ATP} در تنظیم اندازه و حجم ماتریکس میتوکندری نقش بسزایی دارند [۲۱] و 5HD به عنوان مهار کننده کانالهای پتاسیمی میتوکندریایی حساس به ATP در قلب می تواند عمل می کنند [۲۵]. باز شدن کانالهای mK_{ATP} موجب ورود یون پتاسیم به داخل میتوکندری شده و از کوچک شدن اندازه و حجم ماتریکس جلوگیری می نماید و با این عمل سبب حفظ و نگهداری ساختمان و عملکرد میتوکندری می شود. از آنجا که اثرات حفاظتی PC قلبی با مهار کانالهای mK_{ATP} توسط 5HD از بین می رود، بنابراین mK_{ATP} بایستی در قسمتی از مسیر انتقال پیام در PC باز شود [۲۱]. همچنین در یک مطالعه گزارش شده است که در بخشی، بعضی از ساب تایپ های PKC می توانند به عنوان یک عامل شروع کننده برای باز شدن کانالهای mK_{ATP} عمل کنند [۹]. نکته جالب اینکه، نشان داده شده است که اثرات کاردیوپروتکشن PKC با استفاده از مهارکننده های mK_{ATP} از بین می رود [۳۱]. همچنین نشان داده شده است که فعال شدن PKC بر باز شدن کانالهای mK_{ATP} و بسته شدن mPTP مقدم است [۵]. بنابراین می توان چنین نتیجه گرفت که اکسی توسین در بخشی از مسیر سیگنالینگ در PC قلبی با فعال کردن PKC موجب باز شدن کانالهای mK_{ATP} شده و از این طریق باعث حفاظت قلبی در مدل ایسکمی پرفیوژن مجدد موش صحرایی شده است.

نشان داده شده است که میتوکندریها نقش مهمی هم در مرگ و هم حیات سلولها بعهده دارند. در کاردیومیوسیت ها، عمل اولیه میتوکندری تهیه ATP کافی از طریق فسفوریلاسیون برای حفظ ضربانات قلبی در شرایط مختلف می باشد. با وجود این، مکانیسم هایی وجود دارند که این اندامک را از یک عامل حفاظتی به یک عامل شروع کننده آپوپتوز و نکروز در مرگ سلول تبدیل می کنند [۱۳]. نشان داد شد که آتراکتیلوزید، به عنوان باز کننده منافذ نفوذپذیرگذرای میتوکندری در قلب عمل می کند [۳۵] و باز شدن منافذ mPTP بعنوان یک عامل شروع کننده آسیب در مدل ایسکمی–پرفیوژن مجدد شناخته شده است [۱۳،۱۴]. تعدادی از مطالعات نشان دادند که منافذ نفوذپذیر گذرای میتوکندری نقش یک افکتور نهایی را در پریکاندیشنیگ قلبی بعهده دارد [۴،۳۸]. مهمترین عامل بازکننده mPTP تجمع کلسیم در میتوکندری است. استرس اکسیداتیو و دپولاریزاسیون غشای داخلی میتوکندری از جمله عواملی هستند که با تغییر دادن حساسیت mPTP به کلسیم، سبب باز و بسته شدن این منافذ می گردند [۱۵،۲۲]. همچنین در مطالعات قبلی، ما نشان دادیم که بخشی از مسیر سیگنالینگ اکسی توسین در PC قلب موش صحرایی از طریق نیتریک اکساید (NO) می باشد. نشان داده شده است که اثر NO بر mPTP دوگانه است به طوریکه در غلظتهای بالا سبب باز شدن این منافذ و در غلظتهای فیزیولوژیک منجر به بسته شدن آنها می‌گردد. به نظر می‌رسد که NO مستقیماً با فعال کردن پروتئین کیناز وابسته به

Archive of SID
www.SID.ir

cGMP و به طور غیر مستقیم با تنظیم میزان کلسیم و گونه-های فعال اکسیژن در داخل میتوکندری mPTP را تحت تاثیر قرار می‌دهد و موجب بسته شدن منافذ mPTP شده و از این طریق می تواند موجب PC قلبی گردد [۳۰]. همچنین نشان داده شده است که اثر کاردیوپروتکشن آنزیم PKC با استفاده از باز کننده های mPTP از بین می رود [۱۲]. بنابراین اینطور می توان نتیجه گرفت که اکسی توسین در بخشی از مسیر خود باعث فعال شدن آنزیم PKC و آن به نوبه خود موجب فعال شدن کانالهای mKATP و سرانجام منجر به بسته شدن منافذ mPTP شده و از این طریق موجب حفاظت قلب در مدل ایسکمی پرفیوژن مجدد موش صحرایی شده است.

مطالعات گذشته نشان دادند که ان استیل سیستئین به عنوان جمع کننده گونه های فعال اکسیژن عمل می کند [۳۳] و گونه های فعال اکسیژن، مولکولهای مهم در مسیر انتقال پیام در داخل سلول هستند که همزمان با القای PC، مقدار آنها نیز افزایش می‌یابد. این مولکولها نقش بسیار مهمی در شروع فاز زودرس و فاز دیررس PC دارند [۱۱،۴۲]. همچنین در مطالعات گذشته بیان شده است که اکسی توسین از طریق اعمال ضد التهابی و جلوگیری از بروز آسیب ناشی از ROS بعنوان یک عامل بهبود دهنده التهاب کولون عمل می کند [۲۶]. التهاب نقش مهمی در پیشرفت بیماری عروق کرونر بازی می کند و در پروسه های التهابی مربوط به نکروز و ایسکمی دخالت دارد. ایسکمی-پرفیوژن مجدد باعث فعال شدن نوتروفیل ها می گردد و نوتروفیلها از طریق تولید و رهایی متابولیتهای گونه های فعال اکسیژن و پروتئین های سیتوتوکسیک (مانند پروتئازها، میلوپراکسیداز و لاکتوفرین) بداخل مایع خارج سلولی پاسخ التهابی حاد را ایجاد می کنند [۲۸، ۱۸]. وجود اکسی توسین و رسپتورهای آن در تیموس پیشنهاد کننده نقش تعیین کننده اکسی توسین در پروسه های ایمنی و التهابی است. اکسی توسین رهایش اینترلوکین-۶ را کاهش داده [۴۲] و سبب آزاد شدن پروستاسیکلین که مهار کننده تجمع پلاکتی است می شود [۴۱]. همچنین مشخص شده است که تولید رادیکالهای فعال اکسیژن بعنوان یکی از فاکتورهای اصلی در آسیب ایسکمی پرفیوژن مجدد دخالت دارند. ROS در مهاجرت نوتروفیلها به بافت آسیب دیده نقش دارد و نوتروفیلهای فعال شده خود منبع بالقوه ROS و ملکولهای کموتاکتیک از جمله سیتوکینهای TNF-α هستند [۱۸]. احتمال دارد که اثرات حفاظتی اکسی توسین ناشی از مهار TNF-α و ترشح نوتروفیلی باشد. بنابراین به نظر می رسد اثرات سودمند اکسی توسین بر آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد از طریق مهار مهاجرت نوتروفیلها و سیتوکاینهای التهابی مشتق از نوتروفیلها به انجام برسد. بعلاوه OT سبب رهایش NO می شود و نشان داده شده است که NO مهار کننده چسبندگی و فعال شدن نوتروفیلها است [۲۷،۳۴،۳۶]. Tugtepe و همکاران اثر حفاظتی اکسی توسین در ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیه را به توانایی آن در برقراری بالانس وضعیت اکسیدانها، مهار نفوذ نوتروفیلی و تنظیم فعالیت واسطه های ایجاد کننده التهاب می دانند [۴۰]. همچنین نشان داده شده است که ROS در غلظت های پایین، از طریق فعال کردن PKC سبب بروز اثرات شبیه IPC بر سایز انفارکتوس می شود [۳۹]. بعلاوه، ROS می‌تواند سبب باز شدن کانالهای mK_{ATP} گردد [۴۳]. بنابراین می توان چنین نتیجه گرفت که اکسی توسین در بخشی از مسیر سیگنالینگ در PC قلبی، با بالانس ROS موجب فعال شدن PKC [۴۰] و بدنبال آن باز شدن کانالهای mK_{ATP} را در پی داشته و به نوبه خود سبب بسته شدن منافذ mPTP شده و از این طریق باعث حفاظت قلبی در مدل ایسکمی پرفیوژن مجدد موش صحرایی گردیده است. بنابراین اکسی توسین می تواند در حفاظت قلب موش صحرایی از طریق مکانیسمهای متفاوتی اثرات PC ایجاد کند.

مطالعه حاضر نشان می دهد که مکانسیم های حفاظتی اکسی توسین در قلب موش صحرایی کمپلکس بوده و مسیرهای سیگنالینگ می تواند از طریق کانالهای پتاسیمی میتوکندریایی حساس به ATP، منافذ نفوذپذیر گذرای میتوکندریایی، فعالیت آنزیم پروتئین کیناز C و گونه های فعال اکسیژن باشد.

سپاسگزاری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر، حاصل پایان نامه دکتر علی محمد علیزاده جهت اخذ مدرک دکتری تخصصی از دانشگاه علوم پزشکی تهران می باشد که بدینوسیله نویسندگان از مسئولین مربوطه تقدیر و تشکر می نمایند.

Archive of SID
www.SID.ir

References

[1] Adan RA, Van Leeuwen FW, Sonnemans MA, Hoffman G, Verbalis JG, Burbach JP. The rat oxytocin receptor. cDNA cloning and immunocytochemical localization in brain, pituitary, mammary gland and uterus. ***Adv Exp Med Biol*** 395 (1995) 345-6.

[2] Alizadeh AM, Faghihi M, Sadeghipour H, Mohammadghasemi F, Imani A, Houshmand F, et al. Oxytocin protects rat heart against ischemia-reperfusion injury via pathway involving mitochondrial ATP-dependent potassium channel. ***Peptides*** 31 (2010) 1341-1345.

[3] Alizadeh AM, Faghihi M, Sadeghipour HR, Mohammadghasemi F, Khori V. Role of endogenous oxytocin in cardiac ischemic preconditioning. ***Regul Pept*** 167 (2011) 86-90.

[4] Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. ***Circ*** 111 (2005) 194-7.

[5] Baines CP, Song CX, Zheng YT, Wang GW, Zhang J, Wang OL, Guo Y, Bolli R, Cardwell EM, Ping P. Protein kinase C (epsilon) interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. ***Circ Res*** 8 (2003) 873-80.

[6] Ball A, Wei Wang J, Wong S, Zielnik B, Mitchell J, Wang N. Phorbol ester treatment of human myometrial cells suppresses expression of oxytocin receptor through a mechanism that does not involve activator protein-1. ***Am J Physiol Endocrinol Metab*** 291 (2006) 922-8.

[7] Bao N, Minatoguchi S, Kobayashi H, Yasuda S, Kawamura I, Iwasa M, Yamaki T, Sumi S, Misao Y, Arai M, Nishigaki K, Takemura G, Fujiwara T, Fujiwara H. Pravastatin reduces myocardial infarct size via increasing protein kinase C-dependent nitric oxide, decreasing oxyradicals and opening the mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in rabbits. ***Circ J*** 10 (2007) 1622-8.

[8] Bocker D, Verspohl EJ. Role of Protein Kinase C, PI3-kinase and Tyrosine Kinase in Activation of MAP Kinase by Glucose and Agonists of G-protein Coupled Receptors in INS-1 Cells. ***Int Jnl Experimental Diab Res*** 2 (2001) 233-44.

[9] Budas GR, Mochly-Rosen D. Mitochondrial protein kinase Cε (PKCε): emerging role in cardiac protection from ischaemic damage. ***Biochem Soc Trans*** 35 (2007) 1052-4.

[10] Cohen MV, Baines CP, Downey JM. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor of KATP channel. ***Annu Rev Physiol*** 62 (2000) 79-109.

[11] Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K_{ATP} channels. ***Circ Res*** 89 (2001) 273-78.

[12] Costa AD, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, Garlid KD. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel opening and H_2O_2 inhibit the mitochondrial permeability transition. ***J Biol Chem*** 281 (2006) 20801-8.

[13] Crompton M, Costi A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca2+, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca2+ overload. ***Eur J Biochem*** 178 (1988) 489-501.

[14] Crompton M, Costi A, Hayat L. Evidence for the presence of a reversible Ca2+ dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. ***Biochem J*** 245 (1987) 915-8.

[15] Crompton M, Virji S, Doyle V, Johnson N, Ward JM. The mitochondrial permeability transition pore. ***Biochem Soc Symp*** 66 (1999) 167-79.

[16] Cross HR, Murphy E, Bolli R, Ping P, Steenbergen C. Expression of activated PKC protects the ischemic heart without attenuating ischemic H+ production. ***J Mol Cell Cardiol*** 34 (2002) 361-7.

[17] Devost D, Carrier ME, Zingg HH. Oxytocin-induced activation of eukaryotic elongation factor 2 in myometrial cells is mediated by protein kinase C. ***Endocrinology*** 149 (2008) 131-8.

[18] Dusunceli F, Iseri SO, Ercan F, Gedik N, Yegen C, Yegen BC. Oxytocin alleviates hepatic ischemia–reperfusion injury in rats. ***Peptides*** 29 (2008) 1216-22.

[19] Elsasser A, Suzuki K, Lorenz-Meyer S, Bode C, Chaper J. The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal. ***Basic Res Cardiol*** 96 (2001) 219-26.

[20] Garg V, Hu K. Protein kinase C isoform-dependent modulation of ATP-sensitive K^+ channels in mitochondrial inner membrane. ***Am J Physiol Heart***

Archive of SID
www.SID.ir

Circ Physiol 293 (2007) 322-32.

[21] Garlid K, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa A, paucek P. Mitochondrial potassium transport: the role of mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel in cardiac function and cardioprotection. ***Biochem Biophys Acta*** 1606 (2003) 1-21.

[22] Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. ***Biochim Biophys Acta*** 1366 (1998) 79-94.

[23] Houshmand F, Faghihi M, Zahediasl S. Biphasic protective effect of oxytocin on cardiac ischemia/reperfusion injury in anaesthetized rats. ***Peptides*** 30 (2009) 2301-8.

[24] Hu J, Braileanu GT, Mirando MA. Oxytocin stimulates prostaglandin F2-alpha secretion from porcine endometrial cells through activation of calcium-dependent protein kinase C. ***Prostaglandins Other Lipid Mediat*** 3 (2001) 85-101.

[25] Imani A, Faghihi M, Sadr SS, Keshavarz M, Niaraki SS. Noradrenaline reduces ischemia-induced arrhythmia in anesthetized rats: involvement of alpha1-adrenoceptors and mitochondrial K ATP channels. ***J Cardiovasc Electrophysiol*** 19 (2008) 309-15.

[26] Iseri SO, Sener G, Saglam B, Gedik N, Ercan F, Yegen BC. Oxytocin ameliorates oxidative colonic inflammation by a neutrophil-dependent mechanism. ***Peptides*** 26 (2005) 483-91.

[27] Jankowski M, Bissonauth V, Gao L, Gangal M, Wang D, Danalache B, Wang Y, Stoyanova E, Cloutier G, Blaise G, Gutkowska J. Anti-inflammatory effect of oxytocin in rat myocardial infarction. ***Basic Res Cardiol*** 105 (2010) 205-18.

[28] Kevin LG, Novalija E, Stowe DF. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice. ***Anesth Analg*** 101 (2005) 1275-87.

[29] Light PE, Bladen C, Winkfein RJ, Walsh MP, French RJ. Molecular basis of protein kinase C-induced activation of ATP-sensitive potassium channels. ***Proc Natl Acad Sci*** 97 (2000) 9058-63.

[30] Lisa FD, Bernardi P. Mitochondria and ischemia–reperfusion injury of the heart: Fixing a hole. ***Cardiovascular Research*** 70 (2006) 191-9.

[31] Liu Y, Ytrehus K, Downey JM. Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. ***J Mol Cell Cardiol*** 26 (1994) 661-8.

[32] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. ***Circ*** 5 (1986) 1124-36.

[33] Oksuz H, Senoglu N, Yasim A, Turut H, Tolun F, Ciralik H, Bilge F. Propofol with N-acetylcysteine reduces global myocardial ischemic reperfusion injury more than ketamine in a rat model. ***J Invest Surg*** 5 (2009) 348-52.

[34] Ondrejcakova M, Ravingerova T, Bakos J, Pancza D, Jezova D. Oxytocin exerts protective effects on in vitro myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. ***Can J Physiol Pharmacol*** 87 (2009) 137-42.

[35] Pagel PS, Krolikowski JG, Shim YH, Venkatapuram S, Kersten JR, Weihrauch D, Warltier DC, Pratt PF. Noble gases without anesthetic properties protect myocardium against infarction by activating prosurvival signaling kinases and inhibiting mitochondrial permeability transition in vivo. ***Anesth Analg*** 3 (2007) 562-9.

[36] Pournajafi-Nazarloo H, Perry A, Partoo L, Papademeteriou E, Azizi F, Carter CS. Neonatal oxytocin treatment modulates oxytocin receptor, atrial natriuretic peptide, nitric oxide synthase and estrogen receptor mRNAs expression in rat heart. ***Peptides*** 6 (2007) 1170-77.

[37] Sauer H, Rahimi G, Hescheler J, Wartenberg M. Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. ***J Cell Biochem*** 75 (1999) 710-23.

[38] Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, Heusch G. Signal transduction of ischemic preconditioning. ***Cardiovasc Res*** 52 (2001) 181-98.

[39] Tritto I, Andrea D, Eramo N, Scognamiglio A, De Simone C, Violante A, Esposito A, Chiariello M, Ambrosio G. Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. ***Circ Res*** 80 (1997) 743-8.

[40] Tugtepe H, Sener G, Bıyıklı NK, Yuksel M, Cetinel S, Gedik N. The protective effect of oxytocin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. ***Regul Pept*** 3 (2007) 101–8.

[41] Williams PD, Bock MG, Evans BE, Freidinger RM,

Archive of SID
www.SID.ir

Pettibone DJ. Progress in the development of oxytocin antagonists for use in preterm labor. ***Adv Exp Med Biol*** 449 (1998) 473-9.

[42] Zaugg M, Lucchinetti E, Uecker M, PaschT, Schaub MC. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. ***Brit J Anaesth*** 4 (2003) 551-65.

[43] Zhang HY, McPherson BC, Liu H, Baman TS, Rock P, Yao Z. H_2O_2 opens mitochondrial K(ATP) channels and inhibits GABA receptors via protein kinase C-epsilon in cardiomyocytes. ***Am J Physiol Heart Circ Physiol*** 282 (2002) 1395-403.

Archive of SID

www.SID.ir