فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۷ (۲)، ۱۴۸ – ۱۵۵
تابستان ۱۳۹۲

فیزیولوژی و فارماکولوژی

افزایش سطح uncoupling protein-2 در بافت ایسکمیک قلب موش صحرایی

فاطمه صفری[۱،۲،۳]، غلامرضا بیات[۳،۴]، سید حسین مشتاقیون[۱]، شهناز شکرفروش[۵]، عاصفه فکری[۱]، مهدی فروزنده مقدم[۶]، سهراب حاجی زاده[۳*]

۱. مرکز تحقیقات قلب و عروق یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد
۲. گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد
۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۴. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج
۵. گروه فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان، فارس
۶. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

دریافت: ۳۰ دی ۹۱ پذیرش: ۱۷ فروردین ۹۲

چکیده

مقدمه: تجمع رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS) از مهمترین مکانیسم‌های مسئول ایجاد آسیب‌های ناشی از ایسکمی- رپرفیوژن میوکارد است. مطالعات نشان می‌دهد که پروتئین UCP2 توسط ROS فعال شده و به طور فیدبکی تولید ROS را کاهش می‌دهد. هدف از این مطالعه بررسی اثر ایسکمی- رپرفیوژن میوکارد بر سطح mRNA و پروتئین UCP2 در قلب موش صحرایی می‌باشد.

روش ها: در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم) استفاده شد. با بستن شریان کرونر چپ به مدت ۳۰ دقیقه و خون رسانی مجدد به مدت ۲ ساعت مدل ایسکمی-رپرفیوژن در حیوانات القا گردید. تغییرات UCP2 در سطح mRNA توسط Real-Time PCR و در سطح پروتئین توسط تکنیک وسترن بلات در ناحیه ایسکمی بطن چپ و نیز ناحیه غیر ایسکمی بطن راست مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که به دنبال ایسکمی- رپرفیوژن میوکارد، در ناحیه ایسکمی بطن چپ سطح پروتئین UCP2 نسبت به بطن چپ گروه کنترل به طور معنی داری افزایش می‌یابد (P<۰/۰۰۱, ۱۸±۱۱۶٪) اما سطح mRNA تغییر معنی داری نمی‌یابد. این در حالیست که در بطن راست سطح mRNA و پروتئین UCP2 تغییر معنی داری نمی‌یابد.

نتیجه گیری: به دنبال ایسکمی- رپرفیوژن میوکارد سطح پروتئین UCP2 به صورت موضعی در ناحیه ایسکمی بطن چپ افزایش می‌یابد. همچنین افزایش پروتئین UCP2 ناشی از افرایش میزان نسخه برداری ژن UCP2 نمی‌باشد بنابراین ممکن است تغییرات بعد از نسخه برداری مسوول افزایش سطح پروتئین باشد.

واژه‌های کلیدی: ایسکمی- رپرفیوژن میوکارد، نسخه‌برداری، UCP2

مقدمه

ایسکمی میوکارد یکی از مهمترین علل مرگ و میر در دنیا است. شایعترین علت ایسکمی میوکارد بیماری‌های عروق کرونر است، اما در طول اعمال جراحی مانند پیوند اندام و جراحی‌های عروقی نیز عملاً قلب مدتی دچار ایسکمی می‌گردد [۷، ۱۴]. برای جبران این مشکل بهترین راه برقراری مجدد جریان خون به ناحیه ایسکمی است که در اصطلاح رپرفیوژن نامیده می‌شود. با برقراری مجدد جریان خون، بافت

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: Fa.cardio@gmail.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

Archive of SID
www.SID.ir

میوکارد ممکن است عملکرد طبیعی خود را باز یابد اما آسیب‌های اضافی و حتی گاهی شدیدتر از آسیب‌های ایسکمی را به علت خود پدیده رپرفیوژن تجربه خواهد کرد این پدیده که آسیب ناشی از رپرفیوژن میوکارد نامیده می‌شود به شکل متناقضی اثرات سودمند رپرفیوژن را کاهش می‌دهد به طوری که میزان مرگ سلول‌های قلبی که از مرحله ایسکمی آغاز شده بود در این مرحله به سرعت افزایش می‌یابد [۱۰، ۱۹]. مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مسئول ایجاد آسیب‌های ایسکمی- رپرفیوژن میوکارد هنوز به طور کامل شناسایی نشده‌اند. پدیده استرس اکسیداتیو ناشی از تجمع رادیکالهای آزاد اکسیژن (ROS) از مهمترین مکانیسم‌های درگیر در آسیب ایسکمی رپرفیوژن میوکارد است [۱، ۱۲]. بنابراین شناسایی عواملی که بتوانند تولید ROS را در این شرایط کاهش دهند در پیشگیری و درمان آسیب‌های ایسکمی رپرفیوژن میوکارد اهمیت زیادی دارد. تحقیقات دهه اخیر نشان می‌دهد که پروتئین‌هایی در غشای داخلی میتوکندری به نام uncoupling proteins (UCP) می‌توانند تولید ROS را کاهش دهند. UCP1 که از سالها پیش شناخته شده است در بافت چربی قهوه ای وجود دارد و به واسطه القای نشت هیدروژن فسفریلاسیون اکسیداتیو را جدا کرده و باعث تولید گرما می‌شود. اما عملکرد فیزیولوژیک عضو دیگر این خانواده یعنی UCP2 همچنان ناشناخته است [۴، ۸]. UCP2 که در سال ۱۹۹۷ کلون شد توزیع وسیعی در بافت‌های بدن و از جمله قلب دارد [۲۲]. بر اساس مدل مطرح شده توسط Brand و همکارانش این پروتئین فعالیت پایه ناچیزی برای انتقال یون هیدروژن در غشاء میتوکندری دارند، اما با نفوذ رادیکال آزاد سوپراکساید به غشای داخلی میتوکندری UCP2 فعال شده و با افزایش نشت هیدروژن به داخل میتوکندری، گرادیان هیدروژنی را کم کرده و الکترون‌ها به جای انتقال به اکسیژن بر روی عوامل زنجیره انتقال الکترون تجمع می‌یابند و در نتیجه تولید سوپراکساید به طور فیدبکی کم می‌شود. به عبارتی یک لوپ فیدبکی بین ROS و پروتئین UCP2 وجود دارد که با افزایش ROS فعالیت پروتئین UCP2 افزایش یافته و به طور فیدبکی تولید ROS میتوکندریایی را کاهش می‌دهد به بیان دیگر UCP2 می‌تواند به عنوان یک پروتئین ضد استرس اکسیداتیو عمل کند [۹، ۲۲]. در ادامه این تحقیقات Teshima و همکارانش نشان دادند که UCP2 over expression تجمع کلسیم، تولید ROS و فعالیت caspase3 را کم کرده و در نتیجه تحمل سلولهای قلبی به استرس اکسیداتیو ناشی از ایسکمی- رپرفیوژن را افزایش می‌دهد [۲۷]. Mcleod و همکارانش نیز نشان دادند که در طی پروسه preconditioning قلب موش صحرایی UCP2 و UCP3 هم در سطح mRNA و هم در سطح پروتئین افزایش می‌یابد و میتوکندری های جدا شده از قلب در این شرایط، نشت هیدروژنی بیشتر و ROS کمتری را تولید می‌کنند [۲۰]. Noma و همکارانش نیز نشان دادند که بیان UCP2 mRNA در بطن چپ در مرحله حاد نا رسایی قلبی کاهش می‌یابد تا بتواند تولید ATP را در سلولهای قلبی افزایش دهد اما با نارسایی مزمن قلبی که تولید ROS افزایش می‌یابد بیان این پروتئین‌ها نیز زیاد می‌شود که می‌تواند دلیلی بر کاهش energy efficiency قلب در این بیماران باشد [۲۳].

با توجه به اینکه در شرایط ایسکمی رپرفیوژن، سلول‌های قلبی در معرض مقدار زیادی ROS قرار می‌گیرند این سوال مطرح می‌گردد که آیا به دنبال ایسکمی رپرفیوژن میوکارد سطح mRNA و پروتئین UCP2 در بافت قلب تغییر می‌کند؟ تحقیق حاضر به بررسی این موضوع اختصاص داده شده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم) استفاده شد. حیوانات با سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته، دمای حدود ۲۵ درجه سانتیگراد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

گروههای آزمایشی شامل: ۱- گروه کنترل: در حیوانات سالم دست نخورده یک نمونه از بافت بطن چپ و یک نمونه از بطن راست جمع آوری شد تا سطح mRNA و پروتئین UCP2 در بطن چپ و راست قلب طبیعی به منظور مقایسه با گروه ایسکمی مورد بررسی قرار گیرد.

۲- گروه شم: در این گروه حیوانات مراحل جراحی را

Archive of SID
www.SID.ir

پشت سر گذاشتند اما نخی که از زیر LAD عبور کرده گره زده نمی‌شد به عبارتی ایسکمی ایجاد نگردید سپس نمونه بافتی بطن چپ و راست جمع آوری گردید. هدف از انجام آزمایش در این گروه بررسی اثر پروسه جراحی به تنهایی بر تغییرات احتمالی پروتئین UCP2 بود.

۳- گروه ایسکمی-رپرفیوژن که ابتدا ایسکمی به مدت ۳۰ دقیقه و رپرفیوژن به مدت ۲ ساعت اعمال و سپس نمونه بافتی از ناحیه ایسکمیک بطن چپ و نمونه ای از بطن راست به عنوان ناحیه غیر ایسکمیک جمع آوری گردید. بیان ژن‌های مورد نظر در ناحیه ایسکمی بطن چپ گروه ایسکمی - رپرفیوژن با نمونه مربوط به بطن چپ گروه‌های کنترل و شم مقایسه می‌گردد. نمونه مربوط به بطن راست گروه ایسکمی - رپرفیوژن نیز با نمونه مربوط به بطن راست گروه‌های کنترل و شم مورد مقایسه قرار می‌گیرد.

جهت القای مدل ایسکمی- رپرفیوژن میوکارد پس از بیهوش کردن حیوان با تزریق mg/kg ۵۰ پنتوباربیتال سدیم، حیوان توراکوتومی شده و به ونتیلاتور متصل گردید. شریان کاروتید چپ به منظور ثبت مستقیم فشار خون کانوله و با اتصال به دستگاه فیزیوگراف فشار متوسط شریانی ثبت گردید. الکترودهای الکتروکاردیوگرافی زیر جلدی به منظور ثبت الکتروکاردیوگرام به حیوان وصل شدند. پس از باز کردن قفسه سینه در فضای بین دنده‌ای چهارم و پنجم و پاره کردن پریکارد با عبور دادن نخ ۰-۵ سیلک از زیر شریان کرونر چپ انسداد شریان به مدت ۳۰ دقیقه و سپس رپرفیوژن به مدت ۲ ساعت صورت گرفت. در پایان رپرفیوژن، دوباره شریان بسته و یک میلی لیتر اوانس بلو ۱٪ از طریق ورید فمورال تزریق شد تا ناحیه ایسکمی را از ناحیه غیر ایسکمیک جدا کند. در پایان آزمایش قلب را خارج کرده پس از شستشو با محلول PBS سرد بلافاصله ناحیه ایسکمی (Area at risk: AAR) را جدا نمودیم به منظور بررسی تغییرات سطح mRNA و پروتئین UCP2 در ناحیه غیر ایسکمیک، ناحیه ای از بطن راست که از نظر آناتومی معادل ناحیه ایسکمیک بطن چپ بود نیز جدا کردیم. تمام نمونه‌ها در نیتروژن مایع منجمد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند [۱۱]. اندازه گیری mRNA مربوط به ژن UCP2 توسط Real time-PCR صورت گرفت. در این تحقیق ابتدا با استفاده از کیت استخراج RNA مخصوص بافت فیبروز (Qiagen) RNA بافت استخراج گردید. سپس طی واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم reverse transcriptase نسخه cDNA از روی RNA ساخته شد (کیت سنتز شرکت Fermentaz). cDNA به دست آمده توسط RT-PCR (با SYBR Green) تکثیر شد. ژن بتا - اکتین نیز به عنوان house keeping برای مقایسه نسبی بیان ژن UCP2 تکثیر گردید [۱۵]. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ خلاصه شده‌اند.

در این مطالعه بررسی میزان بیان پروتئین UCP2 در میتوکندری میوکارد با تکنیک وسترن بلات مورد سنجش قرار گرفت. با توجه به اینکه UCP2 یک پروتئین میتوکندریایی است ابتدا میتوکندری های بافت قلبی را استخراج کرده و سپس وسترن بلات انجام گردید. جهت جدا کردن میتوکندری‌ها، نمونه بافت قلب از فریزر خارج و در درون یک لوله شیشه‌ای توسط یک میلی لیتر از بافر لیز کننده حاوی آنتی پروتئاز هموژنیزه گردید. بافت هموژن شده در دمای ^{oC}۴ با سرعت g۶۰۰ برای مدت ۱۰ دقیقه به منظور حذف مواد اریتروسیتی سانتریفیوژ شد. محلول رویی را برداشته و مجدد در دمای ^{oC}۴ با سرعت g۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل که حاوی میتوکندری می‌باشد با یک سی سی از بافر B (۱ EDTA میلی‌مول، ۱۰Tris میلی مول، pH=7.4) شستشو داده می‌شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از بافر B و ۶۶ میکرولیتر از SDS ۱۶ درصد بر روی رسوب ریخته و خوب مخلوط شد تا غشاهای میتوکندری به کمک دترژن SDS لیز گردد. در مرحله بعد، این مخلوط در دمای اتاق با سرعت g۱۱۰۰ برای مدت ۲۰ دقیقه جهت حذف مواد غیر محلول سانتریفیوژ گردید. در انتها، محلول رویی در داخل لوله اپندورف در ^{oC}۸۰- منجمد گردید [۱۵]. جهت انجام وسترن بلات ابتدا غلظت پروتئین با روش برادفورد سنجیده می‌شود. پس از آماده سازی ژل SDS-PAGE، غلظت مناسبی از پروتئین هر نمونه بر روی ژل الکتروفورز می‌شود. سپس باندهای موجود بر ژل بر روی کاغذ PVDF منتقل می‌شود. غشاءها در محلول ۲ درصد شیر خشک بدون چربی و BSA۱٪ برای مدت یک ساعت بلاک شدند. UCP2 با آنتی‌بادی اولیه UCP2 (N-19) polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) و آنتی‌بادی ثانویه

www.SID.ir
Archive of SID

جدول ۱- توالی پرایمر های مورد استفاده در RT-PCR

Gene	Sense primer (5'–3')	Antisense primer (5'–3')
UCP2	GCCCGGGCTGGTGGTGGTC	CCCCGAAGGCAGAAGTGAAGTGG
β-actin	GAACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT	ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG

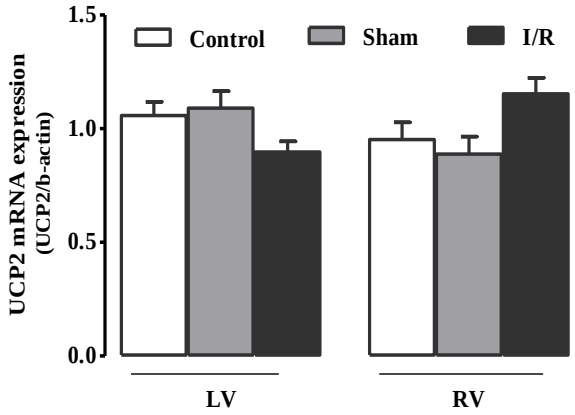
Horseradish peroxidase-conjugated Donkey anti-Goat (Santa Cruz Biotechnology) مورد شناسایی قرار گرفتند. در مرحله آخر، بلات با ماده ظهور کمولومینسانس آغشته می‌شود و در تاریک خانه در مجاورت فیلم عکاسی قرار می‌گیرد تا محل ظهور کمپلکس پروتئین- آنتی بادی بر روی فیلم ظاهر شود [۲۶]. لازم به ذکر است که با توجه به اینکه در مطالعه حاضر تغییرات پروتئین در میتوکندری‌های جدا شده مورد بررسی قرار گرفته است نمی‌توان از بتا اکتین به عنوان رفرانس استفاده کرد بنابراین از روش نرمالیزاسیون استفاده گردید.

آنالیز آماری: مقایسه سطح mRNA و پروتئین UCP2 بین گروههای مختلف توسط آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون متعاقب Tukey صورت گرفت. تعداد نمونه‌ها در هر گروه ۷ نمونه بوده است. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. مقادیر P<۰/۰۵ به عنوان حداقل سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

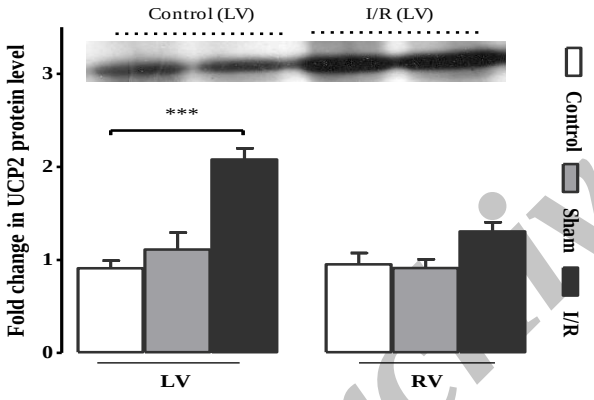
یافته ها

اثر ایسکمی- رپرفیوژن میوکارد بر سطح mRNA ژن UCP2: همانطور که شکل شماره ۱ نشان می‌دهد انجام پروسه جراحی بدون القای ایسکمی (گروه شم) اثر معنی‌داری بر سطح mRNA UCP2 ایجاد نمی‌کند. همچنین با اعمال ایسکمی به مدت ۳۰ دقیقه و رپرفیوژن به مدت ۲ ساعت ایسکمی-رپرفیوژن میوکارد نیز تغییر معنی‌داری در سطح UCP2 mRNA در ناحیه ایسکمی بطن چپ و همچنین در ناحیه غیر ایسکمی بطن راست مشاهده نمی‌گردد.

اثر ایسکمی- رپرفیوژن میوکارد بر سطح پروتئین UCP2: همانگونه که در شکل شماره ۲ مشاهده می‌گردد با اعمال ایسکمی به مدت ۳۰ دقیقه و رپرفیوژن به مدت ۲ ساعت در ناحیه ایسکمی بطن چپ سطح پروتئین UCP2 در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش می‌یابد (P<۰/۰۰۱,



شکل ۱- اثر ایسکمی رپرفیوژن میوکارد (IR) بر سطح mRNA مربوط به ژن UCP2 در ناحیه ایسکمی بطن چپ (LV) و ناحیه غیر ایسکمی از بطن راست (RV). مقادیر به صورت Mean ± S.E.M گزارش شده‌اند.



شکل ۲- اثر ایسکمی-رپرفیوژن میوکارد (IR) بر سطح پروتئین UCP2 در ناحیه ایسکمی بطن چپ (LV) و ناحیه غیر ایسکمی از بطن راست (RV). مقادیر به صورت .Mean±S.E.M گزارش شده اند. *** در سطح P<0.001 نسبت به بطن چپ گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد.

۱۸±۱۱۶٪). اما در بطن راست سطح پروتئین در مقایسه با بطن راست گروه کنترل تغییر معنی داری نمی‌یابد.

بحث

در این مطالعه بررسی اثر ایسکمی رپرفیوژن میوکارد بر بیان ژن UCP2 مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات نشان داده است که تغییرات سطح mRNA و پروتئین UCP2 ممکن است به موازات یکدیگر صورت نگیرد بنابراین بررسی تغییرات

Archive of SID
www.SID.ir

mRNA به تنهایی کافی نبوده و به طور همزمان ارزیابی سطح پروتئین نیز ضروری می‌باشد [۲۴، ۲۶]. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که به دنبال ایسکمی رپرفیوژن موضعی در بطن چپ سطح پروتئین UCP2 در ناحیه ایسکمی به طور معنی داری افزایش می‌یابد اما در بطن راست که عملاً پدیده ایسکمی در آن رخ نداده است و با ناحیه ایسکمی نیز مجاورتی ندارد سطح پروتئین UCP2 تغییر معنی داری نیافته است بنابراین می‌توان اثر ایسکمی بر سطح پروتئین UCP2 را اثری موضعی دانست. یافته جالب توجه دیگر در تحقیق حاضر این است که تغییر پروتئین مستقل از تغییر mRNA رخ داده است به عبارتی افزایش سطح پروتئین UCP2 در بافت قلب که به دنبال ایسکمی رپرفیوژن رخ می‌دهد ناشی از افزایش نسخه برداری از ژن UCP2 نمی‌باشد زیرا همانطور که اشاره شد سطح mRNA مربوط به UCP2 نه تنها افزایش نیافته بلکه تمایل به کاهش نیز نشان داده است. یکی از مکانیسم‌های افزایش UCP2، استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش ROS می‌باشد با توجه به اینکه در ایسکمی و به ویژه در دقایق اولیه رپرفیوژن سطح ROS به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد بنابراین ممکن است افزایش ROS یکی از دلایل افزایش سطح پروتئین UCP2 باشد [۲۵، ۲۸]. میتوکندری تنها اندامک های غیر فعال و قربانی ایسکمی نیست بلکه به عنوان یک اندامک دینامیک و کارامد به روند ایسکمی رپرفیوژن قلب پاسخ می‌دهد تا تحمل سلول‌های قلب را به آسیب ایسکمی افزایش دهد. به عبارتی کاردیومیوسیتها تلاش خواهند کرد تا به واسطه تغییرات عملکرد میتوکندری های خود نسبت به آسیب‌های ناشی از ایسکمی و رپرفیوژن تحمل بیشتری یابند. یکی از جذاب‌ترین استراتژی‌های کاهش تولید ROS میتوکندری کاهش پتانسیل غشای میتوکندری است. به طور کلی هنگامی که پتانسیل غشای داخلی میتوکندری منفی‌تر می‌شود تولید ROS از میتوکندری ها افزایش می‌یابد زیرا در این شرایط در کمپلکس I و III اکسیژن‌های مولکولی بیشتری الکترون جذب کرده و تولید آنیون سوپراکساید بیشتر می‌شود. در مقابل کاهش نسبی پتانسیل غشای میتوکندری (دپولاریزاسیون میتوکندری) جابجایی اکترون ها در زنجیره انتقال الکترون را افزایش داده و بدین ترتیب احتمال جدا شدن تصادفی الکترون‌ها از زنجیره انتقال و انتقال آن به اکسیژن مولکولی و در نتیجه تولید سوپراکساید را کاهش می‌دهد (۱۷ و ۲۵) به طوریکه تنها با کاهش پتانسیل غشای میتوکندری به میزان ۱۰ میلی ولت تولید H_2O_2 از سلول‌های قلبی تا ۷۰ درصد کم می‌شود [۱۳]. پدیده Uncoupling می‌تواند با افزایش نشت هیدروژنی پتانسیل غشای میتوکندری را کاهش دهد مطالعات نشان داده است که استفاده از یکuncoupler مصنوعی به نام FCCP در موش‌های صحرایی پتانسیل غشای میتوکندری و تولید آنیون سوپراکساید و پراکسید هیدروژن توسط میتوکندری ها را کاهش می‌دهد و به عبارتی سبب محافظت کاردیومیوسیت ها در برابر آسیب ایسکمی رپرفیوژن می‌گردد [۳، ۱۸، ۲۱]. پس از preconditioning یا مقاوم سازی در قلب موش صحرایی میتوکندری های جدا شده از قلب ، نشت هیدروژنی بیشتر، پتانسیل غشایی کمتر، محتوای ATP کمتر، مصرف اکسیژن بیشتری داشته و تولید ROS از آنها نسبت به میتوکندری های قلبprecondition به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. نکته جالب توجه این است که به طور همزمان سطح mRNA و پروتئین UCP2/3 در قلب مقاوم شده نسبت به قلب‌های مقاوم نشده افزایش می‌یابد و استفاده از GDP که مهارکننده UCP است از بروز اثرات مذکور پیشگیری می‌کند. بعلاوه با کاهش محتوای UCP2/3 توسط تکنیک SiRNA اثرات مقاوم سازی تضعیف شده و درصد مرگ سلولی تا سطح precondition نشده افزایش می‌یابد [۲۰]. همچنین UCP2 overexpression موجب افزایش مقاومت سلول‌های قلب [۲۷] و نیز سلول‌های تالاموس مغز [۵] نسبت به آسیب ایسکمی رپرفیوژن می‌گردد به طوریکه میتوکندری های جدا شده از این سلول‌ها ROS کمتری تولید می‌کنند و در نهایت اندازه ناحیه انفارکت کوچکتر می‌شود. بنابراین افزایش سطح UCP2 می‌تواند به عنوان یک مکانیسم جبرانی به منظور افزایش مقاومت سلول‌ها به ایسکمی عمل کند. در نارسایی مزمن قلبی نیز که با افزایش تولید ROS در سلول‌ها همراه است نیز بیان این پروتئین‌ها افزایش می‌یابد تا تحمل سلول‌ها به استرس اکسیداتیو را افزایش دهد. حتی در طی روند پیر شدن (aging) کاهش محتوای UCP2/3 به عنوان یکی از دلایل ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت‌های پیر مطرح شده است به طوریکه در قلب موش‌های پیر نسبت به موش‌های

Archive of SID
www.SID.ir

جوان سطح پروتئین UCP2/3 کمتر و تولید آنیون سوپراکساید و هیدروژن پراکساید از سلولهای قلب بیشتر است [۶، ۱۶]. بنابراین UCP2 را می‌توان جزو اصلی مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی سلول و یا به بیان دیگر پروتئین‌های ROS detoxifying دانست که در پاسخ به استرس ایسکمی در قلب القا و تنظیم می‌شوند و با توجه به اینکه حتی یک دپولاریزاسیون اندک در پتانسیل داخل غشای میتوکندری در حد ۱۰ میلی ولت کافی است تا تولید ROS را به طور قابل توجهی کاهش دهد بنابراین تغییر در میزان تولید و یا فعالیت UCP2 می‌تواند اثرات فیزیولوژیک مهمی را در جهت کاهش آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو که عامل اصلی آسیب ایسکمی رپرفیوژن میوکارد می‌باشد اعمال کند به طوریکه اکنون به این پروتئین‌ها به عنوان یکی از پروتئین‌های هدف برای ساخت داروهای کاهنده استرس اکسیداتیو توجه می‌شود [۲۶]. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر افزایش پروتئین UCP2 ناشی از افزایش نسخه برداری ژن UCP2 نمی‌باشد با ادامه این تحقیق می‌توان به یافته های دقیق‌تری در خصوص مکانیسم دقیق افزایش سطح پروتئین UCP2 در طی ایسکمی رپرفیوژن میوکارد نیز دست یافت.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی و دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. از جناب آقای دکتر جوان عضو هیئت علمی گروه فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس که امکان انجام تکنیک وسترن بلات را فراهم آوردند و همچنین جناب آقای دکتر مانی عضو هیئت علمی گروه فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس جهت مشاوره علمی و موثر ایشان تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

[1] Becker LB, New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. ***Cardiovas Res*** 61 (2004) 461-470.

[2] Besse S, Bulteau AL, Boucher F, Riou B, Swynghedauw B, de Leiris J, Antioxidant treatment prevents cardiac protein oxidation after ischemia-reperfusion and improves myocardial function and coronary perfusion in senescent hearts. ***J Physiol Pharmacol*** 57 (2006) 541-552.

[3] Boveris A, Chance B, The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. ***Biochem J*** 3 (1973) 707-716.

[4] Cioffi F, Senese R, de Lange P, Goglia F, Lanni A, Lombardi A, Uncoupling proteins: a complex journey to function discovery. ***Biofactors*** 35 (2009) 417-428.

[5] Deierborg T, Wieloch T, Diano S, Warden CH, Horvath TL, Mattiasson G, Overexpression of UCP2 protects thalamic neurons following global ischemia in the mouse. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 28 (2008) 1186-1195.

[6] Dikov D, Aulbach A, Muster B, Dröse S, Jendrach M, Bereiter-Hahn J, Do UCP2 and mild uncoupling improve longevity?. ***Exp Gerontol*** 45 (2010) 586-95.

[7] Dorweiler B, Pruefer D, Andrasi T, Maksan S, Ischemia-reperfusion injury, pathophysiology and clinical implication. ***Eur J Trauma Emerg Surg*** 33 (2007) 600-612.

[8] Echtay KS, Mitochondrial uncoupling proteins-what is their physiological role? ***Free Radical Bio Med*** 43 (2007) 1351-1371.

[9] Echtay KS, Brand MD, Roussel D, Jakabsons MB, Cadenas S, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD, Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. ***Nature*** 415 (2002) 96-99.

[10] Fliss H, Accelerated apoptosis in reperfused myocardium: Friend of foe? ***Basic Res Cardiol*** 93 (1998) 90-93.

[11] Foadoddini M, Esmailidehaj M, Mehrani H, Sadraei SH, Golmanesh L, Wahhabaghai H, Valen G, Khoshbaten A, Pretreatment with hyperoxia reduces in vivo infarct size and cell death by apoptosis with an early and delayed phase of protection. ***Eur J Cardiothorac Surg*** 39 (2011) 233-240.

[12] Gross GJ, Auchampach JA, Reperfusion injury: Does it exist*? J Mol Cell Cardiol* 42 (2007) 8-12.

[13] Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene VJ, Dependence of H2O2 formation by rat heart mitochondria on sustrate availability and donor age. ***J Bioenerg Biomembr*** 29 (1997) 89-95.

[14] Hearse DJ, Ischemia, reperfusion and cardioprotection:

Archive of SID
www.SID.ir

successes and failures in the journey from molecule to man. ***Eur Heart J*** 3 (2001) 11-21.

[15] Heid CA, Stevens J, Livak KJ. Real time quantitative PCR. ***Genome Res*** 6 (1996) 986-994.

[16] Ji LL, Dillon D, Wu E, Myocardial aging: antioxidant enzyme systems and related biochemical properties. ***Am J Physiol*** 26 (1991) 386-392

[17] Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA, High protonic potential actuates a mechanism of production of ROS in mitochondria. ***FEBS Lett*** 416 (1997) 8-15.

[18] Liu SS, Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. ***Biosci Rep*** 17 (1997) 259-272.

[19] Logue SE, Gustafsson AB, Samali A, Gottlieb RA, Ischemia-reperfusion injury at the intersection with cell death. ***J Mol Cell Cardiol*** 38 (2005) 21-33.

[20] Mcleod CJ, Aziz A, Hoyt RF, McCoy JP, Sack MN, Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia. ***J Biol Chem*** 280 (2005) 33470-33476.

[21] Modrianský M, Gabrielová E, Uncouple my heart: the benefits of inefficiency. ***J Bioenerg Biomembr*** 41 (2009) 133-136.

[22] Murray AJ, Anderson R, Watson GC, Radda G, Clarke K, Uncoupling proteins in human heart. ***Lancet*** 364 (2004) 1786-1788.

[23] Noma T, Nishiyama A, Mizushige K, Murakami K, Tsuji T, Kohno M, Rahman M, Fukui T, Abe Y, Kimura S, Possible role of uncoupling protein in regulation of myocardial energy metabolism in aortic regurgitation model rats. ***FASEB J*** 15 (2001) 1206-1208.

[24] Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F, Miroux B, UCP2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress and evidence for translational regulation. ***J Biol Chem*** 276 (2001) 8705-8712.

[25] Sack MN, Mitochondrial depolarization and the role of uncoupling proteins in ischemia tolerance. ***Cardiovas Res*** 72 (2006) 210-219.

[26] Sivitz W, Fink B, Donohoue P, Fasting and leptin modulate adipose and muscle uncoupling protein: divergent effects between messenger ribonucleic acid and protein expression. ***Endocrinology*** 140 (1999) 1511-1519.

[27] Teshima Y, Akao M, Jones SP, Marban E, Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. ***Circ Res*** 93 (2003) 192-200.

[28] Tompkins AJ, Burwell LS, Digerness SB, Zaragoza C, Holman WL, Brookes PS, Mitochondrial dysfunction in cardiac ischemia–reperfusion injury: ROS from complex I, without inhibition. ***Biochim Biophys Acta*** 1762 (2006) 223-231.

Archive of SID

www.SID.ir