Physiology and Pharmacology, 16 (4), 393-403
Winter 2013 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Preconditioning effects of oxytocin in reducing cardiac arrhythmias in a rat heart regional ischemia-reperfusion model

Mahdih Faghihi[1], Ali Mohammad Alizadeh[2,*], Vahid Khori[3], Hamid Khodayari[4], Saeed Moradi[2]

1. Dept. of Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Cancer Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Golestan Cardiovascular Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
4. Islamic Azad University, Tehran Pharmaceutical Sciences Branch, Tehran, Iran

Received: 12 Jul 2012 **Accepted: 17 Sept 2012**

Abstract

Introduction: Occurrence of cardiac arrhythmias and myocardial infarction are two main deleterious events that are caused by ischemia-reperfusion (IR) injury in the heart. Cardiac preconditioning represents the most potent method of rescuing heart tissue from undergoing irreversible ischemic damage. The aim of the present study was to evaluate oxytocin (OT) cardioprotective effects and its signaling pathways in cardiac arrhythmias including ventricular tachycardia (VT) and ventricular fibrillation (VF) in anesthetized rats.

Methods: Fifty-four rats were divided into nine groups. Animals' hearts were subjected to 25 min ischemia and 2 h reperfusion. Oxytocin was used 25 min prior to ischemia. In certain groups, atosiban (an oxytocin receptor antagonist), atractyloside (an opener of mitochondrial permeability transition pore, mPTP) and *N*-acetylcysteine (a reactive oxygen species scavenger) were used 10 min prior to OT administration. Then, the severity and incidence of cardiac arrhythmias including VT and VF were measured.

Results: OT administration significantly decreased the severity and incidence of cardiac arrhythmias compared to the IR group ($P<0.05$). Administration of atosiban, atractyloside and *N*-acetylcysteine abolished the cardiac preconditioning effect of OT in cardiac arrhythmia ($P<0.05$).

Conclusion: The present study demonstrates that preconditioning with oxytocin reduced ischemia-reperfusion-induced ventricular arrhythmias and its signaling pathways are probably mediated through mitochondrial permeability transition pore and reactive oxygen species.

Key words: Ischemia-reperfusion, oxytocin, cardiac arrhythmia, atractyloside, N-acetylcysteine

* Corresponding author e-mail: aalizadeh@razi.tums.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۶ (٤)، ۳۹۳ - ٤۰۳
زمستان ۱۳۹۱

فیزیولوژی و فارماکولوژی

اثرات پیش شرطی سازی اکسی توسین بر کاهش آریتمی های قلبی در مدل ایسکمی-پرفیوژن مجدد موضعی قلب موش صحرایی

مهدیه فقیهی[۱]، علی محمد علیزاده[۲]*، وحید خوری[۳]، حمید خدایاری[۴]، سعید مرادی[۲]
۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۲. مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۳. مرکز تحقیقات قلب و عروق گلستان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان
۴. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی تهران، تهران

دریافت: ۲۲ تیر ۹۱ پذیرش: ۲۶ شهریور ۹۱

چکیده

مقدمه: وقوع آریتمی‌های قلبی و انفارکتوس میوکارد دو مورد اصلی از آثار زیان بار ناشی از پدیده ایسکمی-پرفیوژن مجدد در قلب هستند. پیش شرطی سازی قلب یک روش مهم برای کاهش آسیب‌های ناشی از ایسکمی طولانی مدت می‌باشد. هدف مطالعه حاضر شناسایی اثرات پیش شرطی سازی اکسی توسین و مکانیسم‌های احتمالی آن بر آریتمی های قلبی در موش صحرایی بیهوش می‌باشد.

روش ها: ۵۴ سر موش صحرایی به ۹ گروه ۶ تایی تقسیم گردیدند. قلب حیوانات تحت ۲۵ دقیقه ایسکمی و ۱۲۰ دقیقه پرفیوژن مجدد قرار گرفت. در گروه اکسی توسین، ۲۵ دقیقه قبل از ایسکمی، اکسی توسین و در گروههای دیگر ۱۰ دقیقه قبل از اکسی توسین، آتوسیبان (آنتاگونیست گیرنده اکسی توسین)، آتراکتیلوزید (بازکننده منافذ نفوذپذیرگذرای میتوکندریایی) و ان-استیل-سیستئین (جمع کننده گونه های فعال اکسیژن) تزریق شدند. سپس شدت و بروز آریتمی های قلبی نظیر تاکی کاردی و فیبریلاسیون بطنی اندازه گیری گردیدند.

یافته ها: تجویز اکسی توسین قبل از ایسکمی طولانی مدت موجب کاهش معنی دار در شدت و بروز آریتمی‌های قلبی نظیر تاکی کاردی و فیبریلاسیون بطنی گردید ($P<۰/۰۵$) و کاربرد آتوسیبان، آتراکتیلوزید و ان-استیل-سیستئین موجب حذف اثرات حفاظتی اکسی توسین بر آریتمی های قلبی شد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: نتایج نشان می‌دهد که پیش شرطی سازی با اکسی توسین موجب کاهش آریتمی‌های کشنده و تهدید کننده حیات ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد شده است و مکانیسم احتمالی آن از طریق منافذ نفوذپذیرگذرای میتوکندریایی و گونه های فعال اکسیژنی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ایسکمی-پرفیوژن مجدد، اکسی توسین، آریتمیهای قلبی، آتراکتیلوزید، ان-استیل سیستئین

مقدمه

امروزه آریتمی های قلبی یکی از مشکلات شایع بوده و در اکثر بیماران تحت درمان با داروها یا افراد مبتلا به انفارکتوس حاد میوکارد دیده می‌شود. آریتمی ها چه بصورت کاهش یا افزایش ریتم طبیعی قلب و چه بصورت ناهماهنگی بین ریتم‌ها، موجب کاهش برون ده قلبی می‌شوند [۱۶]. وقوع آریتمی های قلبی و انفارکتوس میوکارد دو مورد اصلی از آثار زیان بار ناشی از پدیده ایسکمی- پرفیوژن مجدد (Ischemia-Reperfusion, IR) هستند [۲۶]. لذا پیش شرطی سازی بافت (Preconditioning, PC)، مواجهه کردن

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

بافت با یک عامل آسیب رسان کم قدرت چه بصورت ایسکمیک یا فارماکولوژیک قبل از مواجهه با عامل آسیب رسان قویتر و کشنده، می‌تواند تا با تحریک مکانیسم‌های دفاعی درونی، مقاومت بافت را افزایش داده و شدت ضایعات ناشی از IR را کاهش دهد. پیش شرطی سازی قلبی یک روش مهم شناخته شده برای کاهش آسیب‌های قلبی ناشی از ایسکمی طولانی مدت می‌باشد [۲۸].

مطالعات گذشته نشان داده است که کاربرد اکسی توسین (Oxytocin, OT) بلافاصله قبل از ایسکمی طولانی مدت، موجب کاهش اندازه ناحیه انفارکتوس در محیط *In vitro* و *In vivo* در قلب موش صحرایی می‌شود [۲، ۳۱]. فرضیه وجود اعمال متفاوت فیزیولوژیک برای اکسی توسین از این حقیقت ناشی شد که سطح در گردش OT و تعداد نورونهای اکسی توسینرژیک در هیپوتالاموس بصورت غیر وابسته به جنس است. بعلاوه محرکهایی نظیر افزایش اسمولاریته و هیپوولمی سبب رهایش OT در هر دو جنس نر و ماده می‌شود [۱۹]. نوروپپتید اکسی توسین در نورونهای ماگنوسلولار هسته های پاراونتریکولار فوق بصری هیپوتالاموس ساخته شده [۲۷] و آزاد شدن آن در پاسخ به طیف وسیعی از محرکها از جمله مکیدن، زایمان، خونریزی و برخی انواع استرسها نظیر تب، عدم تحرک فیزیکی، درد و تزریق محلولهای هیپرتونیک، دهیدراتاسیون و محرکهای فارماکولوژیک رخ می‌دهد [۱۲]. اکسی توسین در موشهای صحرایی نر و ماده قادر به ایجاد اثرات آنتی استرسی نظیر کاهش فشار خون، میزان کورتیزول/کورتیکوسترون و افزایش در میزان انسولین و CCK است [۳۰]. اکسی توسین نه تنها مسئول اثرات آنتی استرسی ایجاد شده در دوران شیردهی بوده بلکه ممکن است در بهبود پیشرفت ارتباطات، تماسهای اجتماعی و شبکه های اجتماعی نیز دخالت داشته باشد [۲۹]. همچنین اکسی توسین یک عامل ناتریورز غیرفشاری است که در تنظیم اسمولاریته نرمال متفاوت از تنظیم حجمی و از راه هموستاز سدیم عمل می‌کند [۱۵]. تزریق داخل وریدی و یکجا محلول OT سنتتیک در انسان با هایپوتانسیون شدید ولی کوتاه مدت همراه است [۳۲].

ویژگی گیرنده OT قلب موش صحرایی ظاهراً مشابه با گیرنده OT در سایر اندامها است [۱۳]. تمایل OT برای باند شدن به گیرنده های اکسی توسین و همچنین تعداد این گیرنده‌ها در همه حفره‌های قلب مشابه است [۱۳]. همچنین مشخص شده، قلب موش صحرایی جایگاه سنتز اکسی توسین است و غلظت آن در دهلیزها بیشتر از بطنها است. غلظت OT در دهلیز راست قلب موش صحرایی تقریباً ۲۰ برابر غلظت آن در رحم است. برعکس میزان OT-mRNA در بافت قلب موش صحرایی کمتر از میزان آن در رحم می‌باشد [۱۸]. گیرنده های OT با اتصال به GTP – پروتئین‌های کلاس Gp/11a و فعال کردن ایزوفرم‌های C-β فسفولیپاز، منجر به تولید اینوزیتول تری فسفات و ۲،۱– دی اسیل گلیسرول می‌شوند. اینوزیتول تری فسفات با رهایی Ca^{2+} از ذخایر داخل سلولی و دی اسیل گلیسرول با فعال کردن پروتئین کیناز C سبب فسفوریلاسیون پروتئینهای هدف می‌شود. در نهایت در پاسخ به افزایش غلظت Ca^{2+} داخل سلولی، رویدادهای سلولی متعددی می‌توانند فعال شوند [۳۳]. در مطالعه قبلی ما نشان دادیم که اکسی توسین اندوژن می‌تواند به عنوان یک عامل مهم در محافظت قلب موش صحرایی بیهوش عمل کند [۵]. همچنین ما نشان دادیم که یکی از مکانیسم‌های اکسی توسین در محافظت قلبی، کانالهای پتاسیمی حساس به ATP میتوکندریایی (Mitochondrial ATP-dependent potassium channel, mKATP) می‌باشد [۴]. بخش مهمی از اثرات مفید اکسی توسین کاملاً مستقل از اثر آن بر فشارخون و یا سایر متغیرهای همودینامیکی بوده و با عملکرد در سطح سلولی و مولکولی صورت می‌گیرد [۴]. از آنجائی که آریتمی‌های قلبی مانند تاکی کاردی بطنی (Ventricular Tachycardia, VT) و فیبریلاسیون بطنی (Ventricular Fibrillation, VF) مهمترین علت مرگ و میر متعاقب اعمال جراحی قلب و انفارکتوس حاد میوکارد بوده و در شرایط ایسکمی–پرفیوژن مجدد بسیار شایع می‌باشند، ضروری است تا میزان اثرات محافظتی آن بر آریتمی های قلبی در برابر ایسکمی–پرفیوژن مجدد میوکارد و مکانیسم درگیر آن مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر به صورت تجربی در گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران از خردادماه سال

۱۳۸۸ تا خردادماه سال ۱۳۸۹ انجام گرفت. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت.

داروهای مورد استفاده شامل اکسی توسین (عاملی برای ایجاد پیش شرطی سازی قلب)، آتوسیبان (آنتاگونیست گیرنده اکسی توسین)، آتراکتیلوزید (بازکننده منافذ نفوذپذیر گذرای میتوکندریایی) و ان-استیل-سیستئین (عامل جمع کننده گونه های فعال اکسیژن) می‌باشد. تمام داروها از شرکت سیگما (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA) خریداری شده است. حیوانات بطور تصادفی به ۹ گروه ۶ تایی تقسیم شده‌اند که عبارتند از (شکل ۱):

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

۲- IR: 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 (۰/۰۳ μg/kg IP) تزریق و مانند گروه IR عمل شد.

۴- OT+ATO: آتوسیبان (۱/۵ μg/kg IP) ۱۰ دقیقه قبل از تزریق اکسی توسین، به عنوان آنتاگونیست گیرنده اکسی توسین تزریق و مانند گروه OT عمل گردید.

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

۶- OT+ATRC: در این گروه ۱۰دقیقه قبل از تزریق اکسی توسین، آتراکتیلوزید (5 mg/kg IV) به عنوان باز کننده منافذ نفوذپذیرگذرای میتوکندری (Mitochondrial permeability transition pore, mPTP)، تزریق و مانند گروه OT عمل گردید.

۷- ATRC: ۳۵ دقیقه قبل از ایسکمی، آتراکتیلوزید تزریق و مانند گروه IR عمل شد.

۸- OT+NAC: ۱۰ دقیقه قبل از تزریق اکسی توسین، ان استیل سیستئین (200 mg/kg IP) به عنوان جمع کننده گونه های فعال اکسیژنی (Reactive oxygen species, ROS)، تزریق و مانند گروه OT عمل گردید.

۹- NAC: در این گروه ۳۵ دقیقه قبل از ایسکمی، ان استیل سیستئین تزریق و مانند گروه IR عمل شد.

جراحی حیوانات: در این مطالعه از ۵۴ 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 سانتی‌گراد) نگهداری می‌شدند.

در ابتدا حیوان با تزریق داخل صفاقی پنتوباربیتال سدیم (۵۰ mg/kg) بیهوش و سپس ناحیه گردن و قفسه سینه آن کاملاً شیو گردید [۱۷]. 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 می‌شد. ورید دمی با یک آنژیوکت زرد رنگ کانوله شده و جهت تزریق داروها و سرم استفاده می‌گردید. در ابتدا به حیوانات هپارین (۲۰۰U/kg) وریدی تزریق می‌شد. 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 و با تقویت توسط بیوآمپلی فایر، ECG حیوان توسط پاورلب (Instruments, Australia) ثبت می‌گردید. پس از آماده شدن حیوان، اندامهای آن روی تخت جراحی فیکس شده و جهت تراکئوستومی و کانولاسیون نای، با قرار دادن بالشتک کوچکی در زیر گردن، سر حیوان در وضعیت راست قرار می‌گرفت. ناحیه پوست گردن در خط وسط برش داده و پس از یافتن نای و کانولاسیون آن با یک تیوب مناسب، به ونتیلاتور (Harvard Apparatus, model 683) به تعداد تنفس۸۰-۷۰ بار دقیقه و حجم یک میلی لیتر به ازای هر صد گرم وزن بدن متصل می‌گردید. سپس قفسه سینه در سمت چپ و در فضای بین دنده‌ای چهارم برش داده می‌شد 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 می‌شد. سپس دو انتهای نخ از داخل تیوب نرم عبور داده و به یک Adjuster متصل می‌گردید. بالا کشیدن Adjuster با بستن شریان کرونری قدامی نزولی چپ، منجر به ایسکمی موضعی و آزاد کردن آن سبب برقراری پرفیوژن مجدد می‌شود. چند دقیقه بعد از پایان یافتن پروسه جراحی و طی شدن دوره ریکاوری، حیوان به

شرایط پایداری رسیده و پروتکل‌های مورد نظر اجرا می‌شدند. لازم به ذکر است که اگر حیوان تا این مرحله دچار آریتمی شدید فیبریلاسیون بطنی بیش از ۵ دقیقه شود و یا فشار خون شریانی آن تا شروع دوره Baseline به کمتر از۸۰ میلی متر جیوه برسد از مطالعه حذف می‌گردید. در این مطالعه، حیوانات به استثنای گروه Sham، تحت ۲۵ دقیقه ایسکمی و متعاقب آن ۱۲۰ دقیقه پرفیوژن مجدد قرار گرفتند. شاخص مورد نظر برای اطمینان از بسته شدن شریان کرونر اینکه معمولاً بسته شدن شریان کرونری نزولی چپ و القای ایسکمی منجر به افت شدید و ناگهانی فشار خون شریانی، بالا رفتن قطعه ST در ECG و سیانوز قلب می‌شود.

تعیین و ارزیابی آریتمی های بطنی: در این مطالعه آریتمی های بطنی در طی ۲۵ دقیقه ایسکمی و با محاسبه دو شاخص شدت و میزان بروز آریتمی ها و نیز سیستم امتیازدهی مورد ارزیابی قرار گرفته است. شایع‌ترین و خطرناک‌ترین آریتمی های بطنی طبق مدل Lambeth شامل ضربانات نابجای بطنی (Ventricular Ectopic Beats, VEBs)، VT و VF می‌باشد [۲۲، ۳۸]. VEBs به کمپلکس های QRS زودرس و پهن شده اطلاق می‌شود که هرگاه یکی در میان با کمپلکس طبیعی QRS حادث شود به آن بای ژمینه و هرگاه به ازای هر دو کمپلکس QRS طبیعی، یک VEBs ایجاد گردد به آن تری ژمینه گویند و سایر انواع مرکب کوپلت (دو عدد VEBs پشت سر هم) و تریپلت (سه عدد VEBs پشت سر هم) نامیده می‌شوند. در این بررسی VEBs بطور جداگانه شمارش شدند. VT به ایجاد بیش از سه عدد VEBs پشت سر هم گفته می‌شود VF نیز به کمپلکسهای نامشخص و کم ولتاژ QRS اطلاق می‌شود که اگر کمتر از ۲ دقیقه طول بکشد به آن VF گذرا و در غیر اینصورت VF پایدار خواهد بود. در این مطالعه میزان بروز (درصدی از حیوانات که دچار VT و VF شدند) و همچنین شدت آریتمی های بطنی، بطور جداگانه در طی ۲۵ دقیقه ایسکمی مورد بررسی قرار گرفتند.

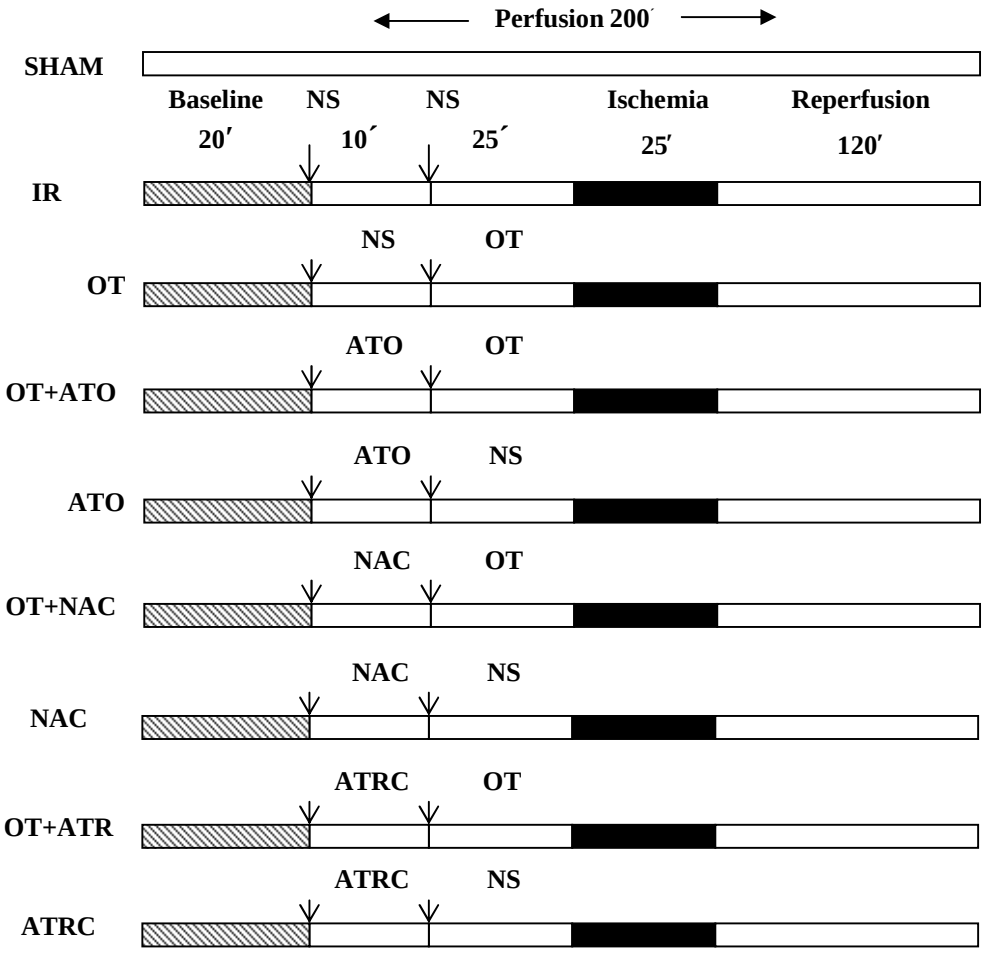
در بررسی شدت آریتمی از سیستم امتیاز دهی به شرح ذیل استفاده شد [۳۴]: صفر امتیاز: ۰ تا ۴۹ عدد VEBs، یک امتیاز: ۵۰ تا ۴۹۹ عدد VEBs، دو امتیاز: بیش از۵۰۰ عدد VEBs یا یک اپیزود VT و یا VF، سه امتیاز: بیش از یک اپیزود VT و یا VF گذرا یا هر دو به مدت کمتر از ۶۰ ثانیه، چهار امتیاز: VT و یا VF گذرا یا هر دو به مدت ۶۰ تا ۱۲۰ ثانیه، پنج امتیاز: VT و یا VF گذرا یا هر دو به مدت بیش از ۱۲۰ ثانیه، شش امتیاز: VF کشنده بعد از ۱۵ دقیقه انسداد شریان کرونر، هفت امتیاز: VF کشنده بین دقیقه ۴ تا دقیقه ۱۵ بعد از انسداد شریان کرونر، هشت امتیاز: VF کشنده بین دقیقه ۱ تا دقیقه ۴ بعد از انسداد شریان کرونر و نه امتیاز: VF کشنده کمتر از یک دقیقه بعد از انسداد شریان کرونر.

جهت آنالیز آماری داده‌ها، از نرم افزار SPSS ویراست ۱۶ استفاده گردید. داده ها بصورت انحراف معیار± میانگین گزارش گردید. داده های مربوط به بروز آریتمی ها به درصد گزارش شده و برای آنالیز آماری از Fisher Exact Test استفاده شد. برای آنالیز آماری داده های مربوط به شدت آریتمی های بطنی از آزمون Kruskal-Wallis استفاده گردید. در تمام آزمونها، p<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

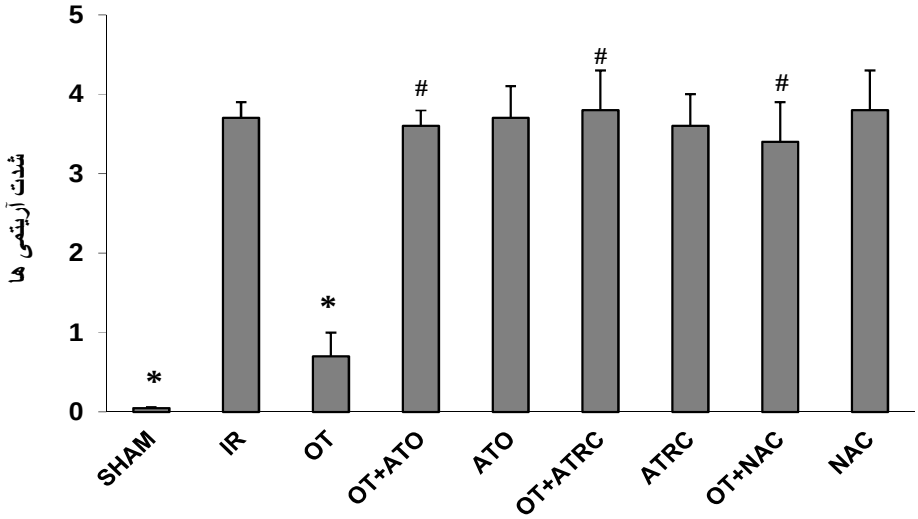
یافته ها

شدت آریتمی ها: بستن شریان کرونری قدامی نزولی چپ و ایجاد ایسکمی ۲۵ دقیقه ای در گروه IR منجر به ظهور آریتمی های بطنی شده و شدت این آریتمی ها ۰/۴ ± ۳/۷ بوده است. استفاده از اکسی توسین قبل از ایسکمی ۲۵ دقیقه ای در گروه OT، بطور معنی داری سبب کاهش شدت آریتمی های بطنی (۰/۲ ± ۰/۷) در مقایسه با گروه IR گردیده است (P<۰/۰۵، شکل ۲). شدت آریتمی ها در بقیه گروههای مورد مطالعه شامل OT+ATO، OT+ATRC و OT+NAC نسبت به گروه اکسی توسین افزایش معنی داری نشان داد (P<۰/۰۵) اما در مقایسه با گروه IR تغییر معنی داری نشان داده نشده است (شکل ۲).

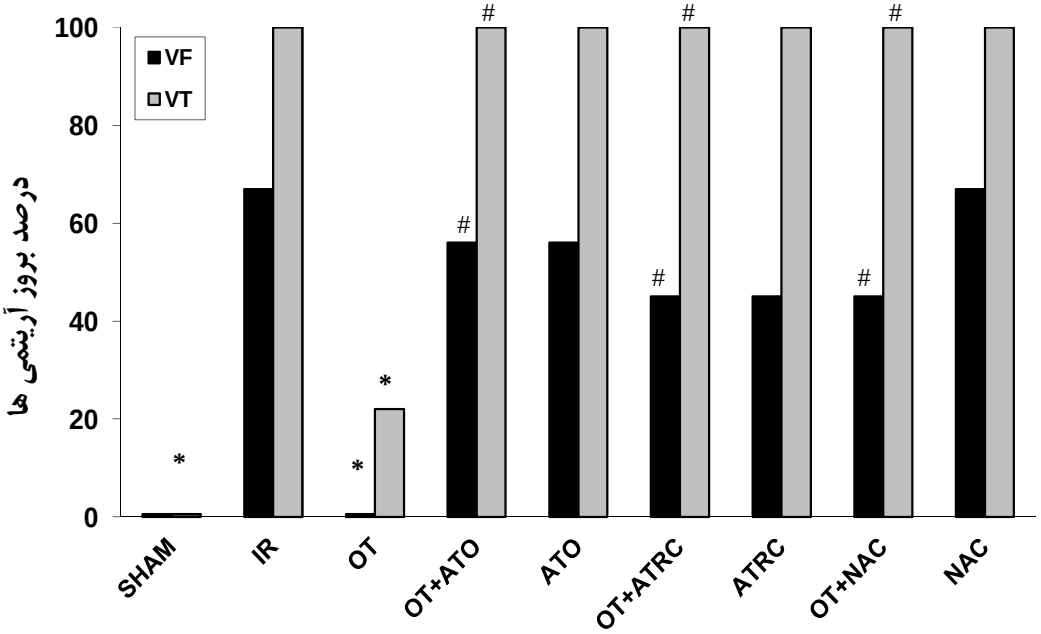
میزان بروز آریتمی ها: شکل ۳ میزان بروز آریتمی های VT و VF در طی ۲۵ دقیقه ایسکمی در گروههای مختلف را نشان می‌دهد. ایسکمی ۲۵ دقیقه‌ای در گروه IR، سبب بروز VT در تمام حیوانات شده و در ۶۷ درصد از آنها نیز VF ایجاد گردید. استفاده از اکسی توسین قبل از ایسکمی ۲۵ دقیقه‌ای موجب کاهش VT به ۲۲ درصد (P<۰/۰۵) و حذف کاملVF در تمام حیوانات شده است (P<۰/۰۵). میزان بروز VT وVF در بقیه گروههای مورد مطالعه شامل OT+ATO، OT+ATRC و



شکل۱- گروهها و پروتکل‌های بکار رفته در حضور اکسی توسین، آتوسیبان، آتراکتیلوزید و ان- استیل سیستئین در مدل ایسکمی- پرفیوژن مجدد قلب موش صحرایی.
NS= Normal saline; IR=Ischemia-Reperfusion; OT=Oxytocin; ATO=Atosiban;
ATRC=Atractyloside; NAC=N-acetyl cysteine



شکل۲- اثر اکسی توسین، آتوسیبان، آتراکتیلوزید و ان-استیل سیستئین و بر شدت آریتمی‌های قلبی. داده‌ها بصورت انحراف معیار± میانگین نشان داده شده است. گروههای OT+ATO، OT+ATRC و OT+NAC با گروه OT مقایسه شدند ولی کلیه گروهها با گروه IR مقایسه گردیدند. *اختلاف معنی دار نسبت به گروه IR را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). # اختلاف معنی دار نسبت به گروه اکسی توسین را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).
IR=Ischemia-Reperfusion; OT=Oxytocin; ATO=Atosiban; ATRC=Atractyloside; NAC=N-acetylcysteine



شکل۳- اثر اکسی توسین، آتوسیبان، آتراکتیلوزید و ان-استیل سیستئین و بر درصد بروز آریتمی های قلبی. داده ها بصورت انحراف معیار± میانگین نشان داده شده است. گروههای OT+ATO، OT+ATRC و OT+NAC با گروه OT مقایسه شدند ولی کلیه گروهها با گروه IR مقایسه گردیدند. * اختلاف معنی دار نسبت به گروه IR را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). # اختلاف معنی دار نسبت به گروه اکسی توسین را نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).

IR=Ischemia-Reperfusion; OT=Oxytocin; ATO=Atosiban; ATRC=Atractyloside; NAC=N-acetylcysteine; VT=Ventricular Tachycardia; VF= Ventricular Fibrillation

OT+NAC نسبت به گروه اکسی توسین افزایش معنی داری نشان داد (P<۰/۰۵) اما در مقایسه با گروه IR تغییر معنی داری مشاهده نگردیده است (شکل ۳).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز اکسی توسین قبل از ایسکمی ۲۵ دقیقه ای موجب کاهش آریتمی های بطنی شامل تاکی کاردی و فیبریلاسیون بطنی نسبت به گروه IR شده و در نتیجه اکسی توسین توانست قلب را از آسیب حاصل از ایسکمی طولانی مدت در مدل موش صحرایی بیهوش حفاظت کند. همچنین نشان داد که استفاده از آتوسیبان به عنوان آنتاگونیست گیرنده اکسی توسین در گروه OT+ATO، آتراکتیلوزید، به عنوان بازکننده منافذ mPTP در گروه OT+ATRC و استفاده از ان-استیل-سیستین، به عنوان جمع کننده ROS در گروه OT+NAC، موجب حذف اثرات حفاظتی اکسی توسین بر آریتمی های قلبی گردیده است. بنابراین امکان دارد که مکانسیم های حفاظتی اکسی توسین بر آریتمی های قلبی در موش صحرایی از طریق منافذ گذرای میتوکندریایی و گونه های فعال اکسیژنی باشد.

در مطالعه قبلی، ما گزارش کردیم که 5HD، یک عامل بلوکر اختصاصی کانال پتاسیمی حساس به ATP، مانع اثرات حفاظتی اکسی توسین بر قلب موش صحرایی می‌گردد [۴]. داس و همکاران نشان دادند که فعال شدن کانال پتاسیمی حساس به ATP در نتیجه اکسی توسین، در پیشگیری از آریتمی های بطنی در طول پرفیوژن مجدد موثر است [۱۰]. با این حال، نویسندگان بروز و شدت آریتمی ها در طول مرحله ایسکمی قبل از پرفیوژن مجدد را گزارش نکردند. اما در مطالعه حاضر، یک دیدگاه جدیدی از اثرات ضدآریتمی اکسی توسین در مرحله ایسکمی گزارش گردید که تجویز اکسی توسین قبل از ایسکمی طولانی مدت، منجر به سرکوب آریتمی های کشنده و تهدید کننده حیات نظیر تاکی کاردی و فیبریلاسیون بطنی شده است.

مطالعات گذشته مکانیسم‌های مختلف ایجاد آریتمی را در مراحل ایسکمی و پرفیوژن مجدد نشان دادند [۶]. در واقع، وقوع و سرکوب آریتمی های قلبی در مرحله ایسکمی به تحریکات نشات گرفته از عوامل درون زا مانند NO و ROS وابسته است [۶]. علاوه بر این، عوامل دارویی مانند دیازوکساید

[۷] و پرواستاتین [۳۶] در مرحله ایسکمی از طریق مسیرهای واسطه‌ای ROS و PKC مانع ایجاد آریتمی می‌گردند. در این راستا، در مطالعه حاضر تجویز اکسی توسین مشابه عوامل فارماکولوژیک موجب اثرات ضدآریتمی در مرحله ایسکمی شده است و تجویز ان- استیل- سیستئین به عنوان جمع کننده گونه های فعال اکسیژن قبل از اکسی توسین موجب مهار اثرات حفاظتی اکسی توسین بر آریتمی های قلبی شده است. در سال ۲۰۰۸ اب و همکاران [۱] نشان دادند که کاربرد ان- استیل- سیستئین بعد از ایسکمی طولانی مدت و قبل از پرفیوژن مجدد دارای اثرات حفاظتی در آسیب‌های ناشی از پدیده ایسکمی-پرفیوژن مجدد می‌باشد اما کاربرد آن قبل از ایسکمی طولانی مدت موجب تشدید این آسیب‌ها می‌گردد و نتیجه گرفتند که ROS دارای اثرات دوگانه است و به مقدار کم در مرحله ایسکمی به عنوان مدیاتور و یا تریگر عمل کرده و موجب اثرات شبیه پیش شرطی سازی در مرحله ایسکمی شده است [۱]. به علاوه نشان داده شده است که ROS در غلظت‌های پایین، از طریق فعال کردن PKC سبب بروز اثرات شبیه پیش شرطی سازی، بر سایز انفارکتوس می‌شود [۳۶]. همچنین نشان داده شده است که ROS می‌تواند سبب باز شدن کانالهای mKATP گردد [۳۹] و ما در مطالعه قبلی نشان دادیم که باز شدن کانالهای mKATP توسط اکسی توسین موجب کاهش آریتمی های قلبی در موش صحرایی می‌گردد [۴]. بنابراین در مطالعه حاضر، تجویز ان- استیل- سیستئین قبل از اکسی توسین موجب مهار اثرات حفاظتی اکسی توسین بر آریتمی های قلبی شده است که بیانگر نقش گونه های فعال اکسیژن در اثرات ضدآریتمی اکسی توسین در مرحله ایسکمی می‌باشند.

در بخشی دیگر از مطالعه حاضر، تجویز آتراکتیلوزاید به عنوان بازکننده منافذ نفوذپذیرگذرای میتوکندریایی قبل از اکسی توسین موجب مهار اثرات حفاظتی اکسی توسین بر آریتمی های قلبی شده است. تعدادی از مطالعات نشان دادند که منافذ نفوذپذیرگذرای میتوکندری نقش یک افکتور نهایی را در پیش شرطی سازی قلبی بعهده دارد [۸، ۲۵، ۳۵]. 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 می‌گردند [۹، ۱۴]. همچنین در مطالعات قبلی، ما نشان دادیم که بخشی از مسیر سیگنالینگ اکسی توسین در پیش شرطی سازی قلب موش صحرایی از طریق NO می‌باشد [۱۱]. 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 [۲۶]. به نظر می‌رسد که NO مستقیماً با فعال کردن پروتئین کیناز وابسته به cGMP و به طور غیرمستقیم با تنظیم میزان کلسیم و گونه‌های فعال اکسیژن در داخل میتوکندری mPTP را تحت تأثیر قرار می‌دهد و موجب بسته شدن منافذ mPTP شده و از این طریق می‌تواند موجب حفاظت قلبی گردد [۲۰، ۲۱، ۲۴]. بنابراین منافذ نفوذپذیر گذرای میتوکندریایی احتمالاً در بخشی دیگر از اثرات ضدآریتمی اکسی توسین می‌توانند نقش ایفا کنند.

از طرف دیگر نشان داده شده است که گونه های فعال اکسیژنی و اندازه ناحیه انفارکتوس دو عامل مهم تعیین کننده در شدت آریتمی ها در مرحله پرفیوژن مجدد می‌باشند [۶]. در مطالعه قبلی، ما نشان دادیم که اکسی توسین از طریق افزایش نیتریک اکساید، تعادل در گونه های فعال اکسیژن و بستن منافذ نفوذپذیر گذرای میتوکندری در قلب موجب کاهش اندازه ناحیه انفارکتوس می‌گردد [۳، ۱۱]. در مطالعه حاضر ما سطح سوپراکساید و گونه های فعال اکسیژن را اندازه گیری نکردیم اما در یک مطالعه پایلوت، ما نشان دادیم که اکسی توسین سطح پلاسمایی مالون دی الدئید در مدل ایسکمی- پرفیوژن مجدد را کاهش می‌دهد (۲/۳ ± ۰/۳ در مقابل ۳/۷ ± ۰/۴ نانومول در میلی لیتر). بنابراین بخشی از اثرات ضد آریتمی اکسی توسین در مرحله پرفیوژن مجدد، می‌تواند از طریق کاهش سطح ROS باشد. علاوه بر این، بی ثباتی در علائم همودینامیک نظیر کاهش متوسط فشار شریانی نشانه ای از آزادسازی ROS از میتوکندری در مرحله پرفیوژن مجدد مطرح می‌باشد.

در مطالعه قبلی، ما نشان دادیم که اکسی توسین از طریق کاهش آزادسازی ROS و بستن منافذ گذرای میتوکندری موجب بهبود کاهش فشارخون شریانی ناشی از ایسکمی طولانی مدت شده است [۳، ۱۱]. بنابراین احتمالاً اکسی توسین با ایجاد تعادل در ROS و بستن منافذ نفوذپذیرگذرای

میتوکندری موجب کاهش آریتمی های تهدید کننـده حیـات در مرحله پرفیوژن مجدد نیز خواهد شد.

نتایج نشان می‌دهد که پیش شرطی سازی با اکسی توسین موجب کاهش آریتمی های کشنده و تهدید کننده حیات ناشـی از ایسکمی پرفیوژن مجدد شده است و مکانسیم احتمالی آن از طریق منافذ نفوذپذیرگذرای میتوکندریایی و گونـه هـای فعـال اکسیژنی می‌باشد.

سپاسگزاری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر، حاصل پایان نامـه دکتـری آقـای علـی محمد علیزاده جهت اخذ مدرک دکتری تخصصی از دانشگاه علوم پزشکی تهران می‌باشد که بدینوسیله نویسندگان از مسئولین مربوطه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References

[1] Abe M, Takiguchi Y, Ichimaru S, Tsuchiya K, Wada K, Comparison of the protective effect of N-acetylcysteine by different treatments on rat myocardial ischemia-reperfusion injury. ***J Pharmacol Sci*** 106 (2008) 571-7.

[2] Alizadeh AM, Faghihi M, Khori V, Mohsenikia M, Effect of pre-treatment with oxytocin on cardiac enzymes in regional ischemiareperfusion injury induced in the rat heart. ***Physiol Pharmacol*** 15 (2012) 572-582.

[3] Alizadeh AM, Faghihi M, Khori V, Sohanaki H, Pourkhalili K, Ghasemi FM, Mohsenikia M, Oxytocin protects cardiomyocytes from apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rat heart: Role of mitochondrial ATP-dependent potassium channel and permeability transition pore. ***Peptides*** 36 (2012) 71-7.

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

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

[6] Brown DA, O'Rourke B, Cardiac mitochondria and arrhythmias. ***Cardiovasc Res*** 88 (2010) 241-9.

[7] Chen J, Shen H, Nagasawa Y, Mitsui K, Tsurugi K, Hashimoto K, Pravastatin inhibits arrhythmias induced by coronary artery ischemia in anesthetized rats. ***J Pharmacol Sci*** 103 (2007) 317-22.

[8] 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.

[9] Crompton M, Virji S, Doyle V, Johnson N, Ward JM, The mitochondrial permeability transition pore. ***Biochem Soc Symp*** 66 (1999) 167-179.

[10] Das B, Sarkar C, Is preconditioning by oxytocin administration mediated by iNOS and/or mitochondrial K (ATP) channel activation in the in vivo anesthetized rabbit heart? ***Life Sci*** 90 (2012) 763-9.

[11] Faghihi M, Alizadeh AM, Khori V, Latifpour M, Khodayari S, The role of nitric oxide, reactive oxygen species, and protein kinase C in oxytocin-induced cardioprotection in ischemic rat heart. ***Peptides*** 37 (2012) 314-319.

[12] Gimpl G, Fahrenholz F, The oxytocin receptor system: Structure, function, and regulation. ***Physiol Rev*** 81 (2001) 629-83.

[13] Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM, Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 94 (1997) 11704-9.

[14] 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.

[15] Huang W, Lee SL, Arnason SS, Sjoquist M, Dehydration natriuresis in male rats is mediated by oxytocin. ***Am J Physiol*** 270 (1996) 427-33.

[16] Hume RJ, Grant OA, Agents Used in Cardiac Arrhythmias, In: Katzung Basic and Clinical pharmacology, 10 th edition, New York: ***Mc Graw-Hill***

(2007) 211.

[17] Imani A, Faghihi M, Sadr SS, Niaraki SS, Alizadeh AM, Noradrenaline protects in vivo rat heart against infarction and ventricular arrhythmias via nitric oxide and reactive oxygen species. ***J Sur Res*** 169 (2011) 9-15.

[18] Jankowski M, Hajjar F, Kawas SA, Mukaddam-Daher S, Hoffinan G, McCann SM, Gutkowska J, Rat heart: A site of oxytocin production and action. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 95 (1998) 14558-63.

[19] Kadekaro M, Summy-Long JY, Freeman S, Harris JS, Terrell ML, Eisenberg HM, Cerebral metabolic responses and vasopressin and oxytocin secretions during progressive water deprivation in rats. ***Am J Physiol*** 262 (1992) 310-17.

[20] Khori V, Alizadeh AM, Navaeian A, Nayebpour M, Pourabouk M, Badaghabadi F, Changizi S, Rajaei M, Moheimani H, Yazdi H, Saleki S, Role of nitric oxide on the electrophysiological properties of isolated rabbit atrioventricular node by extracellular field potential during atrial fibrillation. ***Physiol Pharmacol*** 15 (2011) 295-307.

[21] Khori V, Alizadeh AM, Yazdi H, Rakhshan E, Mirabbasi A, Changizi S, Mazandarani M, Nayebpour M, Frequency-dependent Electrophysiological Remodeling of the AV Node by Hydroalcohol Extract of Crocus sativus L. (Saffron) During Experimental Atrial Fibrillation: The Role of Endogenous Nitric Oxide. ***Phytother Res*** 26 (2012) 826-832.

[22] Khori V, Azadbakht M, Nayebpour M, Jamshidi AH, Pourabouk M, Alizadeh AM, Badaghabadi F, Changizi S, Rajaei M, Frequency-dependent anti arrhythmic effects of crataegus monogyna on the extracellular field potential recordings in the rabbit atrioventricular node, an experimental model of AF. ***Physiol Pharmacol*** 15 (2011) 36-46.

[23] Khori V, Davarian A, Nayebpour M, Salaki S, Salehi A, Shirafkan AA, Badaghabadi F, Pourabouk M, Alizadeh AM, Changizi S, Effect of nitric oxide modulation on the basic and rate-dependent electrophysiological properties of AV-node in the isolated heart of rabbit: The role of adrenergic and cholinergic receptors. ***Physiol Pharmacol*** 14 (2010) 2-22.

[24] Khori V, Nejad SS, Alizadeh A-M, Yazdi HR, Pourabouk M, Badaghabadi F, Moheimani HR, Changizi S, Rajaei M, Nayebpour M, Protective role of cyclosporine on the model simulated the rotational nodal arrhythmia (AVNRT) by using extracellular field potential recordings of isolated atrioventricular-node of rabbit. ***Physiol Pharmacol*** 15 (2011) 249-259.

[25] Khori V, Shariatnezhad S, Alizadeh AM, Yazdi H, Pourabouk M, Badaghabadi F, Rajaei M, Moheimani H, Saleki S, Nayebpour M, Acute direct effects of cyclosporine on extracellular field potential of isolated rabbit AV node during experimental atrial fibrillation. ***Physiol Pharmacol*** 15 (2012) 507-516.

[26] Lango R, Smolenski RT, Narkiewicz M, Suchorzewska J, Lysiak-Szydlowska W, Influence of L-carnitine and its derivatives on myocardial metabolism and function in ischemic heart disease and during cardiopulmonary bypass. ***Cardiovasc Res*** 51 (2001) 21-29.

[27] Leng G, Brown CH, Russell JA, Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. ***Prog Neurobiol*** 57 (1999) 625-55.

[28] Lisa FD, Bernardi P, Mitochondria and ischemia–reperfusion injury of the heart: Fixing a hole. ***Cardiovasc Res*** 70 (2006) 191-199.

[29] Oldenburg 0, Critz SD, Cohen MV, Downey JM. Acetylcholine-induced production of reactive oxygen species in adult rabbit ventricular myocytes is dependent on phosphatidylinositol 3-and src-kinase activation and mitochondria K (ATP) channel opening. ***J Mol Cell Cardiol*** 35 (2003) 653-60.

[30] Onaka T, Catecholaminergic mechanisms underlying neurohypophysial hormone responses to unconditioned or conditioned aversive stimuli in rats. ***Exp Physiol*** 85 (2000) 101-10.

[31] 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) 137-142.

[32] Rosaeg OP, Cicutti NJ, Labow RS, The effect of oxytocin on the contractile force of human atrial trabeculae. ***Anesth Analg*** 86 (1998) 40-4.

[33] Sanborn BM, Dodge K, Monga M, Qian A, Wang W, Yue C, Molecular mechanisms regulating the effects of oxytocin on myometrial intracellular calcium. ***Adv Exp Med Biol*** 449 (1998) 277-86.

[34] Sarraf G, Barrett TD, Walker MJ, Tedisamil and lidocaine enhance each other's antiarrhythmic activity against ischemia–induced arrhythmias in rats. ***Br J***

preconditioning in rabbit hearts. ***Circ Res*** 80 (1997) 743-748.

[38] Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DW. The Lambeth conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. ***Cardiovasc Res*** 22 (1998) 447-455.

[39] 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) 1395-1403.

Pharmacol 139 (2003) 1389-1398.

[35] Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, Heusch G. Signal transduction of ischemic preconditioning. ***Cardiovasc Res*** 52 (2001) 181-198.

[36] Thuc LC, Teshima Y, Takahashi N, Nagano-Torigoe Y, Ezaki K, Yufu K, Nakagawa M, Hara M, Saikawa T. Mitochondrial KATP channels-derived reactive oxygen species activate pro-survival pathway in pravastatin-induced cardioprotection. ***Apoptosis*** 15 (2010) 669-78.

[37] Tritto I, Andrea D, Eramo N, Scognamiglio A, De Simone C, Violante A, Esposito A, Chiariello M, Ambrosio G. Oxygen radicals can induce