

اثر محافظتی لووتیروکسین با مکانیسم کاهش استرس اکسیداتیو در مدل پیش شرطی سازی ایسکمیک در قلب موش صحرایی

مصومه تاجیک^۱، دکتر وحید خوری^۲، دکتر عبدالجلال مرجانی^۳، دکتر شهره تازیکی^۴، محمدعلی ضیغمی^۵، دکتر آزاد رضا منصوریان^{۶*}
۱- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات ایسکمی، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ۲- استاد، مرکز تحقیقات ایسکمی، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ۳- استاد، مرکز تحقیقات اختلالات متابولیک، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ۴- استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ۵- کارشناس ارشد بیوشیمی، کارشناس آزمایشگاه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ۶- استاد، مرکز تحقیقات اختلالات متابولیک، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: در پیش شرطی شدن ایسکمیک (ischemic preconditioning: IPC) قلب در دوره‌های کوتاه مدت دچار ایسکمی شده و لذا در صورت مواجهه با ایسکمی طولانی، قسمت اعظم ناحیه دچار ایسکمی از آسیب محافظت می‌گردد. این مطالعه به منظور تعیین اثر محافظتی لووتیروکسین با مکانیسم کاهش استرس اکسیداتیو در مدل پیش شرطی سازی ایسکمیک در قلب موش صحرایی انجام شد.
روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در سه گروه ۱۰ تایی انجام شد. در گروه ایسکمی پرفیوژن مجدد (IR)، قلب حیوان در دستگاه لانگندورف قرار گرفت. در گروه پیش شرطی سازی ایسکمیک (IPC) قبل از ایسکمی ماژور در معرض ۴ دوره ایسکمی ۵ دقیقه‌ای همراه با پرفیوژن مجدد قرار گرفت. در گروه دریافت کننده داخل صفاقی لووتیروکسین با دوز ۲۵ میکروگرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن حیوان، قلب در معرض ایسکمی پرفیوژن مجدد قرار گرفت. حجم ناحیه اینفارکت و میزان مالون‌دی‌آلدئید در بافت قلب سنجیده شد.

یافته‌ها: حجم ناحیه آسیب دیده گروه IR ۲۶/۵۵ میلی‌متر مکعب، گروه IPC ۱۱/۱۱ میلی‌متر مکعب و گروه دریافت کننده لووتیروکسین ۱۲/۵۶ میلی‌متر مکعب تعیین شد. تخریب لووتیروکسین همانند IPC حجم ناحیه آسیب دیده را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه IR پایین آورد ($P < 0/05$). میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه IR ۱۳۲۸، در گروه IPC ۷۷۷ و در گروه دریافت کننده لووتیروکسین ۷۶۲ تعیین شد و در گروه‌های IPC و دریافت کننده لووتیروکسین نسبت به گروه IR کاهش نشان داد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: تخریب لووتیروکسین با ایجاد پیش شرطی سازی ایسکمیک سبب کاهش اثر سوء ایسکمی پرفیوژن مجدد در قلب موش صحرایی می‌گردد.

کلید واژه‌ها: قلب، ایسکمی، لووتیروکسین، پیش شرطی سازی ایسکمیک، استرس اکسیداتیو

* نویسنده مسؤول: دکتر آزاد رضا منصوریان، پست الکترونیکی azad_r_mansourian@yahoo.com

نشانی: گرگان، ۲ کیلومتر به ساری، مجموعه آموزش عالی دانشگاه علوم پزشکی گلستان (شادروان فلسفی)، دانشکده پزشکی

گروه فارماکولوژی، تلفن ۰۳۴-۳۲۴۳۰۴۳۴-۰۱۷، شماره ۳۲۴۴۰۲۲۵

وصول مقاله ۱۳۹۵/۹/۷، اصلاح نهایی: ۱۳۹۶/۳/۲۲، پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۴/۲۷

مقدمه

عضله قلبی دچار ایسکمی ضروری است (۲۰). از طرفی خود رپرفیوژن با به راه‌انداختن شروع ناگهانی واکنش‌های اکسیداتیو و پاسخ التهابی موضعی باعث آسیب و مرگ سلولی می‌شود که به عنوان آسیب رپرفیوژن نامیده می‌شود و به مرگ کاردیومیوسیت‌هایی که قبل از رپرفیوژن زنده ماندنی بودند؛ منجر می‌گردد (۳) و پدیده ایسکمی - رپرفیوژن (I/R) ایجاد می‌شود (۲۰).

برخی مطالعات نشان داده که ایسکمی کوتاه مدت قبل از

بیماری‌های قلبی - عروقی به ویژه ایسکمی قلبی به علت تنگی عروق کرونر، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های قلبی است و زمانی حادث می‌شود که در نتیجه اختلال در عروق کرونر، خون‌رسانی به میوکارد کاهش یافته و اکسیژن مورد نیاز قلب به خوبی تامین نمی‌شود. به نظر می‌رسد برقراری پرفیوژن مجدد با استفاده از مداخلات مکانیکی یا فارماکولوژیکی بعد از ایسکمی حاد قلبی، برای نجات میوکاردیوم زنده ماندنی و حفظ عملکرد سلول‌های

روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. موش‌ها در شرایط یکسان و در دمای معمولی 25 ± 3 درجه سانتی‌گراد در آزمایشگاه نگهداری شدند و تا زمان انجام آزمایش آزادانه به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. موش‌ها به صورت تصادفی به سه گروه ده تایی تقسیم شدند.

در همه گروه‌ها بعد از بیهوشی کامل حیوان تحت عمل جراحی قرار گرفت و قلب را به سرعت ایزوله کرده و به دستگاه لانگندورف انتقال دادیم. محلول پرفیوژن، محتوی گاز کاربوژن (95% درصد اکسیژن و 5% درصد دی‌اکسید کربن)، با فشار $7/4$ PH ثابت و دمای 37 درجه سانتی‌گراد بود.

گروه بندی حیوانات به شرح زیر بود:

گروه اول (گروه ایسکمی): قلب حیوانات در معرض 30 دقیقه ایسکمی و 100 دقیقه پرفیوژن مجدد قرار گرفت. روش ایجاد ایسکمی ریپرفیوژن بدین صورت بود که بعد از باز کردن شکم و برداشتن پرده دیافراگم، جدار قفسه سینه را کنار زدیم. بعد از پریکاردیوتومی، ورید اجوف تحتانی را کلامپ کرده و با برش در آنورت در 1 تا 2 میلی‌متری قلب، کانول مخصوص متصل به تیروید اکسیژن‌دار را درون آنورت (دیستال به دریچه آنورت) (15) ثابت کردیم و سپس قلب را از قفسه سینه خارج کردیم. قلب جدا شده در محفظه مرکزی با روش تغذیه کرومر مدل لانگندورف با دمای $37 \pm 0/1$ درجه سانتی‌گراد و $7/4$ pH ثابت شد. سپس نخ $6-0$ را از زیر شریان نزولی قدامی چپ در محل اولین شاخه دیاگونال آزاد شده و ابتدای شریان سیرکومفلکس چپ رد کردیم. با قرار دادن یک الکتروود در محل گره دهلیزی - بطنی، یک الکتروود در محل باندل هیس، یک الکتروود در دهلیز چپ، یک الکتروود در نوک قلب و دو الکتروود برای حذف سیگنال‌های اضافه ثبت سه کاناله (دهلیز، هیس و ECG) از قلب صورت گرفت.

شریان نزولی قدامی چپ در گروه ایسکمی به مدت 30 دقیقه بسته شد و بعد به مدت 100 دقیقه مجدد باز شد تا ریپرفیوژن صورت گیرد. ایسکمی با سیانوز منطقه‌ای دیستال به بستن رگ و ریپرفیوژن با برطرف شدن سیانوز در منطقه مشخص می‌شود.

گروه دوم (گروه پیش شرطی سازی ایسکمی (IPC): قلب‌ها قبل از ایسکمی طولانی، در معرض 4 دوره ایسکمی 5 دقیقه‌ای همراه با ریپرفیوژن مجدد قرار گرفتند.

گروه سوم (دریافت کننده لووتیروکسین): حیوانات برای مدت 14 روز لووتیروکسین ($T4$) محصول شرکت سیگما با دوز 25 میکروگرم به ازای هر صد گرم وزن حیوان به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و پس از آن قلب حیوانات در معرض ایسکمی و ریپرفیوژن مجدد قرار گرفت.

محاسبه ناحیه در معرض خطر و اندازه آسیب: شریان نزولی قدامی چپ را مجدداً بستیم و رنگ اوانس بلو (Evans blue) با

ایسکمی طولانی، اثرات حفاظتی در برابر انفارکتوس حاد قلبی دارد. خارطه ایسکمی قلبی در محافظت از آسیب ایسکمیک شدید بعدی را پدید آورده پیش شرطی شدن ایسکمیک (IPC) (ischemic preconditioning) می‌نامند. این پدیده توضیح می‌دهد که اگر قلب در دوره‌های کوتاه مدت و متوالی دچار ایسکمی گردد؛ در صورت مواجهه با ایسکمی شدید و طولانی مدت، قسمت اعظم ناحیه دچار ایسکمی از آسیب محافظت خواهند شد.

کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP میتوکندری (mitoKATP) بیشتر از کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP غشای پلاسمایی در فرایند پیش شرطی شدن قلبی نقش داشته (4 و 5) و بر روی آپوپتوز و نیز نکروز اثر می‌گذارند (6). تعدادی از عوامل فارماکولوژیک مانند برادی کینین، نیتریک اکساید، آدنوزین و آگونیست آلفا آدرنریک باعث پری کاندیشنینگ فارماکولوژیک می‌شوند (7) و نیز اثرات حفاظتی هورمون تیروئید بر قلب، در سلول، حیوانات و انسان‌ها به اثبات رسیده است (8). درمان با هورمون تیروئیدی به صورت حاد و یا طولانی مدت، میوکاردیوم را از آسیب ایسکمی ریپرفیوژن حفظ می‌کند. درمان طولانی مدت با لووتیروکسین باز شدن منافذ نفوذپذیر گذرای میتوکندری را مهار نموده و منجر به حفاظت قلب می‌گردد (9 و 8).

هورمون‌های تیروئیدی وضعیت آنتی‌اکسیدانی سلول را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهند (10 و 11). میزان اثر هورمون‌های تیروئیدی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بر اساس نوع آنزیم و بافت مورد سنجش متغیر است. فعالیت بعضی آنزیم‌ها مانند SOD، تحت تحریک هورمون‌های تیروئیدی افزایش می‌یابد. در قلب‌های درمان شده با تجویز طولانی مدت لووتیروکسین فعالیت پروتئین کیناز فعال شده میتوژن (p38 mitogen-activated protein kinases: P38MAPK) که در پاسخ به ایسکمی ریپرفیوژن ایجاد می‌گردد؛ کاهش نشان داده (12) و فعالیت P38MAPK در ایسکمی پری کاندیشنینگ (IPC) نیز کاهش یافته و این کاهش یک عنصر مهم در محافظت قلبی ایجاد شده در شرایط IPC است (13). نهایتاً این که افزایش در سطح هورمون‌های تیروئیدی ارتباط زیادی با تغییر در میزان استرس اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدان‌ها و میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) دارد (14). این مطالعه به منظور تعیین اثر محافظتی لووتیروکسین با مکانیسم کاهش استرس اکسیداتیو در مدل پیش شرطی سازی ایسکمیک در قلب موش صحرائی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی 30 سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی $250-220$ گرم در دانشگاه علوم پزشکی گلستان در سال 1395 انجام شد.

این مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق (ir.goums.rec.1394.11) دانشگاه علوم پزشکی گلستان قرار گرفت. پروتکل اخلاقی کار بر

کرده و خوب بهم زدیم و بعد از سانتریفیوژ کردن میزان جذب فاز بوتانول را در ۵۳۵ نانومتر قرائت کردیم (۱۹).

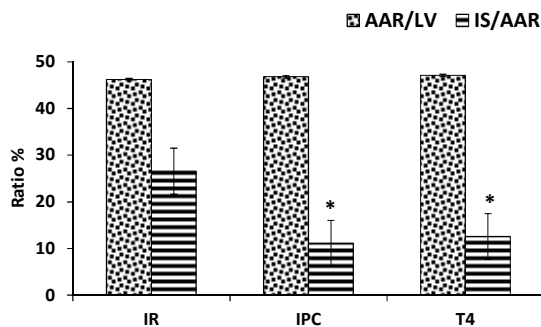
اندازه‌گیری هورمون‌های تیروئیدی T4 و T3 و TSH در سرم: در سرم حیواناتی که داروی لووتیروکسین دریافت کرده بودند؛ TSH (μIU/ml) با استفاده از کیت الایزا مخصوص موش صحرائی، محصول شرکت Casabio ژاپن و T3 (ng/ml) و T4 (μg/dl) با استفاده از کیت الایزا ساخت شرکت DBC کانادا سنجیده شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری Graphpad prism-5 تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه میزان هورمون‌های تیروئیدی قبل و بعد از تزریق لووتیروکسین از آزمون تی زوجی استفاده شد. برای آنالیز بین چند گروه برای یک متغیر از آزمون ANOVA و مقایسه دو به دو گروه‌ها از آزمون Tukey استفاده گردید. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در گروه دریافت‌کننده لووتیروکسین با دوز ۲۵ میلی‌گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن حیوان میزان T3 قبل و بعد از دریافت دارو از ۱/۶۳±۰/۱۶ به ۴/۰۱±۰/۶۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر و میزان T4 از ۵/۳۱±۰/۳۸ به ۷/۷۷±۰/۵۱ میکروگرم بر دسی‌لیتر افزایش آماری معنی‌داری یافت (P<۰/۰۵). همچنین میزان TSH قبل و بعد از دریافت لووتیروکسین از ۰/۴۲±۰/۱۲ به ۰/۱۱±۰/۰۵ (μIU/ml) کاهش آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵).

حجم ناحیه آسیب دیده در گروه IPC و همچنین در گروه T4 کاهش آماری معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل IR داشت؛ ولی گروه T4 به IPC تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد (نمودار یک).



نمودار ۱: نمودار ناحیه در معرض خطر و اندازه آسیب IR: ایسکمی ریبریوژن، IPC: ایسکمی پری کاندیشنینگ T4: گروه دریافت‌کننده لووتیروکسین؛ AAR/LV ناحیه در معرض خطر؛ IS/AAR اندازه آسیب (به نسبت ناحیه در معرض خطر) *P<۰/۰۵ نسبت به گروه IR

میزان (nmol/mg heart tissue) MDA در گروه IPC-con (۷۷۷±۶۹) و گروه T4-IR (۷۶۲±۶۸) که داروی لووتیروکسین را دریافت نموده بودند؛ کاهش آماری معنی‌داری نسبت به گروه

غلظت یک درصد، به میزان ۱ML را از طریق کانول داخل آئورت تزریق کردیم تا مناطق با پرفیوژن از مناطق بدون پرفیوژن قلب مشخص شوند. سپس ۱ تا ۲ میلی‌لیتر از محلول حاوی پتاسیم از طریق کانول تزریق کردیم تا قلب از تپش بایستد. سپس قلب را شستیم تا رنگ اضافی پاک شود و بعد از خشک کردن و پیچیدن قلب در یک نایلون پلاستیکی شفاف، آن را به مدت ۲۴ ساعت در دمای منفی ۴ درجه سانتی‌گراد منجمد کردیم تا برای برش زدن آماده باشد (۱۷ و ۱۶). سپس قلب را به صورت موازی با شیار دهلیزی بطنی به ضخامت ۳-۲ mm برش دادیم و قطعات را در رنگ تری فینیل تترازیولوم کلراید (TTC) یک درصد با غلظت یک درصد، به میزان ۲۰ میلی‌لیتر، محلول در بافر فسفات با PH=۷/۴ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کردیم (۱۶). در میوکاردیوم قابل حیات TTC توسط آنزیم دهیدروژناز تجزیه می‌شود و بافت به رنگ قرمز تیره در می‌آید و بافت انفارکت رنگ TTC را به خود نگرفته و بی‌رنگ می‌ماند.

سپس قطعات بافتی را در فرمالدهید ۱۰ درصد ثابت کردیم و بعد از ۴۸ ساعت بطن راست همه قطعات چیده شده و دور ریخته شد و قطعات بطن چپ، اسکن گردید. اندازه انفارکتشن به صورت نسبی از وزن منطقه نکروتیک به منطقه با خطر بالا بیان شد.

نواحی غیرایسکمیک عدم در معرض خطر (area non at risk: ANAR) به صورت آبی، نواحی ایسکمیک (infarct area: IA) به صورت سفید و نواحی قلبی در معرض خطر (area at risk: AAR) به صورت قرمز رنگ مشخص می‌گردند. اندازه ایسکمی به ترتیب ذیل محاسبه می‌شود:

ناحیه انفارکت IA و ناحیه در معرض خطر AAR را با توجه به تعداد پیکسل اشغال شده در هر ناحیه (میلی متر مکعب) برای هر قطعه حساب می‌کنیم (۱۸).

$$IA\% = \frac{\text{مجموع ناحیه IA}}{\text{مجموع ناحیه IA} + \text{مجموع ناحیه AAR}} \times 100 = \text{درصد ناحیه در معرض خطر}$$

اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در بافت قلب: بافت قلب منجمد شده را از دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد خارج و آن را وزن کرده و سپس با تیغ بیستوری تا آن جا که ممکن بود ریز نموده و به آن KCL ۱/۱۵ درصد اضافه کردیم. به یک گرم بافت ۱۰ میلی‌لیتر KCL اضافه شد. سپس آن را با استفاده از دستگاه سونی کیتور (XL-2000 SONICATOR) بر روی یخ، بافت را کاملاً هموژن کردیم. سپس نیم میلی‌لیتر از مخلوط هموژن شده را در یک لوله آزمایش ریخته و ۳ میلی‌لیتر اسید فسفریک یک درصد و نیز یک میلی‌لیتر تیوباریتوریک اسید ۰/۶ درصد اضافه کرده و مخلوط حاصل را به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. سپس به مخلوط خنک شده ۴ میلی‌لیتر بوتانول نرمال اضافه

IR-con (۱۲۲۸±۳۱) نشان داد ($P < 0/05$).

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر پدیده پیش شرطی سازی قلبی با کاهش اندازه ناحیه آسیب دیده اثر محافظتی در مقابل ایسکمی ریبریفرژن داشت. همچنین مشخص گردید تجویز مزمن لووتیروکسین، اثرات شبیه به IPC داشته و حجم ناحیه آسیب دیده را به طور معنی داری نسبت به گروه IR-control کاهش داده است. از طرف دیگر میزان MDA که شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدی است؛ در هر دو گروه T4 و گروه IPC نسبت به گروه IR کاهش آماری معنی داری داشت و این نتیجه با آنچه که از محاسبه اندازه آسیب دیده به دست آمد؛ هماهنگ بود. این یافته‌ها نشان می‌دهند که T4 و IPC از تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو داخل سلول جلوگیری نموده‌اند.

هورمون تیروئید به دلیل این که ضربان قلب را تند می‌کند؛ به طور بالقوه اثرات زیان‌آوری بر روی ایسکمی دارد؛ اما با توجه به مطالعات انجام شده بر روی انسان و حیوان شواهدی وجود دارد که هورمون تیروئیدی اثر حفاظتی نیز بر روی قلب دارد و درمان‌های حاد و مزمن با هورمون‌های تیروئیدی اثرات محافظتی علیه آسیب ایسکمی نشان داده‌اند (۲۰). از طرف دیگر مطالعات مختلف همچون Lin و همکاران نشان داده که T4 می‌تواند در غلظت‌های فیزیولوژیک و پایین اثر آنتی‌آپوپتوتیک داشته باشد. نتایج مطالعه آنها نشان داد T4 در تومور سل‌ها از طریق مداخله در فسفریلاسیون P53 نقش آنتی‌آپوپتوتیک خود را ایفا می‌کند (۲۱). همچنین Pantos و همکاران نشان دادند تجویز T3 به صورت حاد در حین ریبریفرژن می‌تواند ریکاوری بعد از ایسکمی را بهبود بخشیده و آپوپتوز را کاهش دهد. این اثر ممکن است نشان‌دهنده اینوتروپیک مثبت و آنتی‌آپوپتوتیک بودن T3 باشد که برای حفظ همودینامیک در شرایط ایسکمی ریبریفرژن مناسب است (۲۲).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند سیگنالینگ پیش شرطی سازی قلب (IPC) در میتوکندری موجب تولید مقادیر فراوان NO گشته که موجب باز و فعال شدن کانال‌های پتاسیمی وابسته به ATP میتوکندریایی شده و باعث می‌شود که میزان متوسطی از ROS تولید گردد. سطح بالای ROS برای کاردیومیوسایت مضر است؛ اما سطح متوسط ROS در این مسیر باعث فعال کردن پروتئین کیناز C (PKC) گشته (۲۳ و ۲۴) و در یک مسیر افزایش PKC باعث افزایش فسفریلاسیون Nrf2 گشته که یک فاکتور رونویسی است و نقش اساسی در تنظیم رونویسی ژن‌های آنتی‌اکسیدانت دارد و با عناصر پاسخ آنتی‌اکسیدانتی پیوند داده و موجب فعال شدن ژن‌های آنتی‌اکسیدانتی و افزایش تولید سوپراکسید دسمتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و در نتیجه کاهش استرس اکسیداتیو می‌گردد (۲۵ و ۲۶). در مسیری دیگر افزایش PKC سبب مهار در باز شدن MPTP (منافذ

نفوذپذیر گذرای میتوکندری) شده و رهایی سیتوکروم C کاهش می‌یابد که منجر به کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود و با پایین آوردن سطح انرژی از طریق مهار متابولیسم چرخه کربس و کاهش ATP در قلب موجب کاهش در اندازه ناحیه انفارکت می‌شود (۲۷ و ۲۸). در مطالعه حاضر نیز میزان MDA در گروه IPC کاهش معنی داری داشت که تایید کننده مطالعات قبلی و نشانه صحت مطالعه ماست.

در مطالعات مختلفی در ارتباط با اثرات محافظتی و یا مضر لووتیروکسین صحبت شده است. به عنوان مثال در مطالعه Kumar و همکاران مشخص شد پیش‌درمانی با لووتیروکسین، ایجاد پیش شرطی سازی فارموکولوژیکال کرده که از طریق یک الگوی مشابه IPC، سبب حفاظت قلب علیه آسیب ایسکمی - ریبریفرژن (I/R) می‌شود. نتایج این تحقیق نشان داد تجویز مزمن لووتیروکسین، از طریق ایجاد اختلال در باز شدن منافذ MPTP (Mitochondrial Permeability Transition pore) در میتوکندری، اثرات محافظتی خود را اعمال می‌کند (۲۹). در همین راستا Pantos و همکاران نشان دادند لووتیروکسین و IPC بر اساس یک الگوی مشابه موجب حفاظت قلب علیه آسیب ایسکمی می‌شوند (۸) که با نتیجه حاصل از مطالعه ما موافق است.

بعد از ایسکمی بافت آسیب دیده منبع غنی از رادیکال‌های آزاد است و مهم‌ترین آسیبی که این رادیکال‌ها بر روی بافت دارند؛ لیپید پراکسیداسیون است و MDA یکی از محصولات لیپید پراکسیداسیون است (۳۰). بر این اساس در مطالعه Kanwal و همکاران مشخص گردید در گروه IPC، میزان پراکسیداسیون لیپیدی کاهش معنی داری نسبت به IR دارد (۳۱) و این نتیجه با یافته مطالعه ما هماهنگ است. در مطالعه Pantos و همکاران نیز مشاهده شد سطح MDA در گروه دریافت کننده داروی لووتیروکسین به مدت ۱۴ روز، در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی داری افزایش داشته است؛ ولی در گروه دریافت کننده چهار روز از دارو تغییر معنی داری مشاهده نشد (۳۲).

بدین ترتیب نتایج متناقضی در ارتباط با MDA در مطالعات مختلف گزارش شده است. در هر حال نتایج مطالعه ما نشان داد MDA در گروه IPC و گروه درمان شده با لووتیروکسین کاهش معنی داری نسبت به گروه ایسکمی داشت. علت این نتایج متناقض و اختلاف برخی نتایج با مطالعه ما می‌تواند به علت تفاوت در دوز دارو و یا مدت زمان تماس بافت با دارو و یا نحوه دریافت دارو باشد. با توجه به آن که کاهش MDA بیانگر نقش حفاظتی T4 است؛ به نظر می‌رسد نتایج تحقیق حاضر می‌تواند در ارتباط با اثرات پری‌کاندیشنینگ ایجاد شده توسط T4 باشد و در عین حال نیاز به تحقیقات گسترده‌تری در این زمینه است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۱۸۴) خانم معصومه تاجیک برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی بالینی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود. بدین وسیله از همه کارشناسان مرکز اختلالات ایسکمیک و آزمایشگاه بیوشیمی تشکر و قدردانی می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که لووتیروکسین می‌تواند همانند پیش‌شرطی‌سازی قلبی با کاهش اندازه ناحیه آسیب‌دیده اثر کاردیوپروتکتیو داشته باشد و مکانیسم این اثرات می‌تواند از طریق کاهش مالون‌دی‌آلدئید و احتمالاً کاهش رادیکال‌های آزاد باشد.

References

- Balakumar P, Singh H, Singh M, Anand-Srivastava MB. The impairment of preconditioning-mediated cardioprotection in pathological conditions. *Pharmacol Res*. 2009 Jul; 60(1): 18-23. doi: 10.1016/j.phrs.2009.03.002
- Lesnefsky EJ, Chen Q, Tandler B, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction and myocardial ischemia-reperfusion: implications for novel therapies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2017 Jan; 57: 535-65. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010715-103335
- Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 1994 May; 81(5): 637-47.
- Suzuki M, Sasaki N, Miki T, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, et al. Role of sarcolemmal K ATP channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest*. 2002 Feb; 109(4): 509-16. doi:10.1172/JCI14270
- Bian JS, Yong QC, Pan TT, Feng ZN, Ali MY, Zhou S, et al. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Feb; 316(2): 670-78. doi: 10.1124/jpet.105.092023
- Rousou AJ, Ericsson M, Federman M, Levitsky S, McCully JD. Opening of mitochondrial KATP channels enhances cardioprotection through the modulation of mitochondrial matrix volume, calcium accumulation, and respiration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Nov; 287(5): H1967-76.
- Taliyan R, Singh M, Sharma PL, Yadav HN, Sidhu KS. Possible involvement of α 1-adrenergic receptor and KATP channels in cardioprotective effect of remote aortic preconditioning in isolated rat heart. *J Cardiovasc Dis Res*. 2010 Jul-Sep; 1(3): 145-51. doi: 10.4103/0975-3583.70917
- Pantos CI, Malliopolou VA, Mourouzis IS, Karamanoli EP, Paizis IA, Steimberg N, et al. Long-term thyroxine administration protects the heart in a pattern similar to ischemic preconditioning. *Thyroid*. 2002 Apr; 12(4): 325-29.
- Uchiyama Y, Otani H, Wakeno M, Okada T, Uchiyama T, Sumida T, et al. Role of mitochondrial KATP channels and protein kinase C in ischaemic preconditioning. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 2003 May; 30(5-6): 426-36. doi: 10.1046/j.1440-1681.2003.03853.x
- Oziol L, Faure P, Vergely C, Rochette L, Artur Y, Chomard P, et al. In vitro free radical scavenging capacity of thyroid hormones and structural analogues. *J Endocrinol*. 2001 Jul; 170(1): 197-206.
- Sayre NL, Sifuentes M, Holstein D, Cheng SY, Zhu X, Lechleiter JD. Stimulation of astrocyte fatty acid oxidation by thyroid hormone is protective against ischemic stroke-induced damage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017 Feb; 37(2):514-27. doi: 10.1177/0271678X16629153
- Pantos CI, Malliopolou VA, Mourouzis IS, Karamanoli EP, Tzeis SM, Carageorgiou HC, et al. Long-term thyroxine administration increases heat stress protein-70 mRNA expression and attenuates p38 MAP kinase activity in response

to ischaemia. *J Endocrinol*. 2001 Jul; 170(1): 207-15.

13. Marais E, Genade S, Huisamen B, Strijdom J, Moolman J, Lochner A. Activation of 938 MAPK induced by a multi-cycle ischaemic preconditioning protocol is associated with attenuated p38 MAPK activity during sustained ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2001; 33(4): 769-78.

14. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem*. 1993 Oct; 26(5): 351-57.

15. Katoh H, Nishigaki N, Hayashi H. Diazoxide opens the mitochondrial permeability transition pore and alters Ca²⁺ transients in rat ventricular myocytes. *Circulation*. 2002 Jun; 105(22): 2666-71.

16. Liang Y, Kongstad O, Luo J, Liao Q, Holm M, Olsson B, Yuan S. QT dispersion failed to estimate the global dispersion of ventricular repolarization measured using monophasic action potential mapping technique in swine and patients. *J Electrocardiol*. 2005 Jan; 38(1): 19-27. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2004.09.012

17. Eckle T, Grenz T, Köhler D, Redel A, Falk M, Rolauffs B, et al. Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Nov; 291(5): H2533-H2540. doi: 10.1152/ajpheart.00472.2006

18. Alizadeh AM, Faghihi M, Sadeghipour HR, Mohammadghasemi F, Khori V. Role of endogenous oxytocin in cardiac ischemic preconditioning. *Regul Pept*. 2011 Feb; 167(1): 86-90. doi: 10.1016/j.regpep.2010.11.004

19. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*. 1966 Aug; 16(2): 359-64.

20. Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, Heusch G. Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*. 2001 Nov; 52(2): 181-98.

21. Lin HY, Gliinsky GV, Mousa SA, Davis PJ. Thyroid hormone and anti-apoptosis in tumor cells. *Oncotarget*. 2015 Jun; 6(17): 14735-43.

22. Pantos C, Mourouzis I, Saranteas T, Clavé G, Ligeret H, Noack-Fraissignes P, et al. Thyroid hormone improves postischaemic recovery of function while limiting apoptosis: a new therapeutic approach to support hemodynamics in the setting of ischaemia-reperfusion? *Basic Res Cardiol*. 2009 Jan; 104(1): 69-77. doi: 10.1007/s00395-008-0758-4

23. Yang X, Cohen MV, Downey JM. Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2010 Jun; 24(3): 225-34. doi: 10.1007/s10557-010-6236-x

24. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2010 Mar; 105(2): 151-54. doi: 10.1007/s00395-009-0080-9

25. Zhang X, Xiao Z, Yao J, Zhao G, Fa X, Niu J. Participation of protein kinase C in the activation of Nrf2 signaling by ischemic preconditioning in the isolated rabbit heart. *Mol Cell Biochem*. 2013 Jan; 372(1-2): 169-79. doi: 10.1007/s11010-012-1458-9
26. Costa AD, Garlid KD. Intra-mitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKC, ROS, and MPT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 295(2): H874-H882. doi: 10.1152/ajpheart.01189.2007
27. Javadov S, Karmazyn M. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem*. 2007; 20(1-4): 1-22. doi: 10.1159/000103747
28. Niemann CU, Saeed M, Akbari H, Jacobsen W, Benet LZ, Christians U, et al. Close association between the reduction in myocardial energy metabolism and infarct size: dose-response assessment of cyclosporine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Sep; 302(3): 1123-8.
29. Kumar A, Taliyan R, Sharma PL. Evaluation of thyroid hormone induced pharmacological preconditioning on cardiomyocyte protection against ischemic-reperfusion injury. *Indian J Pharmacol*. 2012 Jan; 44(1): 68-72. doi: 10.4103/0253-7613.91870
30. Aggarwal BB, Gupta SC, Sung B. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *Br J Pharmacol*. 2013 Aug; 169(8): 1672-92. doi: 10.1111/bph.12131
31. Kanwal A, Nizami HL, Mallapudi S, Putcha UK, Mohan GK, Banerjee SK. Inhibition of SGLT1 abrogates preconditioning-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Apr; 472(2): 392-98. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.02.016
32. Pantos C, Malliopoulou V, Mourouzis I, Thempeyioti A, Paizis I, Dimopoulos A, et al. Hyperthyroid hearts display a phenotype of cardioprotection against ischemic stress: a possible involvement of heat shock protein 70. *Horm Metab Res*. 2006 May; 38(5): 308-13. doi: 10.1055/s-2006-925404

Original Article

Protective effect of levothyroxine with oxidative stress reduction mechanism in ischemic preconditioning model in rat heart

Masoumeh Tajik (M.A)¹, Vahid Khori (Ph.D)², Abdoljalal Marjani (Ph.D)³
Shohreh Taziki (Ph.D)⁴, Mohammad Ali Zeyghami (M.A)⁵, Azad Reza Mansourian (Ph.D)^{*6}

¹M.A in Biochemistry, Ischemia Research Center, Department of Pharmacology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. ²Professor, Ischemia Research Center, Department of Pharmacology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. ³Professor, Metabolic Disorder Research Center, Department of Biochemistry, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. ⁴Assistant Professor, Department of Pharmacology, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. ⁵M.A in Biochemistry, Laboratory Expert, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. ⁶Professor, Metabolic Disorder Research Center, Department of Biochemistry, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

Abstract

Background and Objective: A brief and short duration episode of ischemia is recorded in ischemic preconditioning (IPC). This latter condition provides a status in which large region of heart is protected when prolonged ischemia occurred. Levothyroxine play a protective role in IPC induction, and simultaneously with stress oxidative. This study was conducted to determine the protective effect of levothyroxine with oxidative stress reduction mechanism in ischemic preconditioning model in rat heart.

Methods: This experimental study was performed on 30 male Wistar rats in three groups of 10, as follows. In the reperfusion ischaemia group (IR), the heart of the animal was placed in a Langendorff apparatus. In the ischemic preconditioning group (IPC), prior to major ischemia, was exposed to 4 periods of 5-minute ischemia with reperfusion. In the intraperitoneally administered group, levothyroxine at a dose of 25 microgram per 100 g of body weight, the heart was exposed to reperfusion ischemia. The area of infarct and the level of malondialdehyde in the heart tissue were measured.

Results: The volume of Infarcted region in IR and IPC groups was 26.55 and 11.11 respectively. The same index for the Levothyroxine receiver was 12.56. Based on these findings it was demonstrated that Levothyroxine injection reduced the Infarcted region significantly similar with IPC ($P < 0.05$). The MDA Levels in IR and IPC were 1328 and 777, respectively and in Levothyroxine group it was determined as 762. The size of Infarcted region in both IPC and treated with Levothyroxine groups significantly reduced in compared to IR group ($P < 0.05$).

Conclusion: Injection of levothyroxine with ischemic preconditioning reduced the effect of reperfusion maladaptive ischemia in rat heart.

Keywords: Heart, Ischemia, Levothyroxine, Ischemic Preconditioning, Oxidative Stress

* Corresponding Author: Mansourian AR (Ph.D), E-mail: azad_r_mansourian@yahoo.com

Received 27 Nov 2016

Revised 12 Jun 2017

Accepted 18 Jul 2017