

## بررسی نقش اسید آمینه ال - سیستئین در حفظ عملکرد قلبی متعاقب کاردیوپلژی در قلب مجزا شده رت

دکتر داریوش شکیبایی \*

دریافت : ۸۴/۸/۲۵ ، پذیرش : ۸۵/۳/۱۱

### چکیده:

**مقدمه وهدف:** در مطالعات گذشته نقش اشکال فعال اکسیژن تشکیل شده در حین ری پرفیوژن (Reperfusion) در ایجاد اختلالات عملکرد قلبی مشخص گردیده است. آنتی اکسیدانتهای داخل سلولی و از جمله گلووتاتیون نقش مهم حفاظتی در این رابطه دارند. مشخص شده که ساخت گلووتاتیون تحت تاثیر میزان سیستئین داخل سلولی می باشد. هدف مطالعه حاضر تعیین نقش اسید آمینه ال - سیستئین در حفظ عملکرد قلبی متعاقب کاردیوپلژی می باشد.

**روش کار:** مطالعه از نوع تجربی و بر روی رتهای نر بالغ در دو گروه کنترل (n=10) و تست (n=6) صورت گرفت. قلب هریک از حیوانات پس از مجزا و آماده سازی مطابق روش قلب فعال (working heart) تحت پرفیوژن با محلول کربس قرار گرفته و پارامترهای قلبی فشار و جریان آئورتی، فشار دهلیز چپ و جریان کرونری آنها ثبت گردید. هریک از قلبها سه مرحله تثبیت اولیه (۲۵ دقیقه) کاردیوپلژی (۲۵ دقیقه) و ری پرفیوژن (۳۰ دقیقه) را می گذراندند. به محلول تغذیه ای قلبها در گروه تست، اسید آمینه سیستئین با غلظت ۵ میلی مول در لیتر و به مدت ده دقیقه قبل و پس از کاردیوپلژی اضافه گردید. بررسی میزان تغییرات پارامترهای قلبی و مقایسه در گروههای تست و کنترل با استفاده از آزمون تی تست (Unpaired t-test) و ANOVA صورت گرفت.

**نتایج:** بررسی ها نشان داد که درصد بازگشت فشار و جریان آئورتی پس از کاردیوپلژی در گروه تست به ترتیب  $91/2 \pm 1/69$  و  $61/176 \pm 3/98$  نسبت به کنترل ( $85/74 \pm 1/28$  و  $44/495 \pm 4/85$ ) بشکل معنی داری ( $p = 0/0324$  و  $p = 0/0213$ ) از وضعیت مناسب تری برخوردار بوده است.

**نتیجه نهایی:** نتایج بیانگر حفظ مناسبتر عملکرد قلبی متعاقب کاردیوپلژی در گروه دریافت کننده سیستئین نسبت به کنترل می باشد. این تاثیر مثبت احتمالاً بدلیل نقش آنتی اکسیدانی سیستئین بوده است.

**کلید واژه ها:** حفاظت قلبی / سیستئین / قلب مجزا شده / کاردیوپلژی

### مقدمه:

دوره ری پرفیوژن متعاقب ایسکمی افزایش می یابند (۲) و منجر به اختلال عملکرد قلبی و استرس اکسیداتیو می گردند (۳) آنتی اکسیدانتهای درون زای قلبی مانند گلووتاتیون تا حدودی می توانند در برابر این عوامل از قلب محافظت کنند. علاوه بر آن آنتی اکسیدانتهای دیگر مانند ویتامین های C و E و بتاکارتن نیز در این رابطه تاثیر دارند. اما مشخص شده که مهمترین نقش

عملکرد قلبی متعاقب ایسکمی به درجات مختلفی مختل می گردد. در این رابطه اشکال فعال اکسیژن تشکیل شده (Reactive oxygen species) در حین ری پرفیوژن نقش کلیدی دارد (۱). از جمله این مواد می توان به هیدروژن پراکسید، رادیکال سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و پراکسی نیتریت اشاره نمود که در

\* استادیار گروه فیزیولوژی و عضو مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (d\_shackebaei @ yahoo.com)

حیوانات به روش استاندارد (۱۵) مجزا شده و دردو گروه تست (n=۶) و کنترل (n=۱۰) تحت پرفیوژن با محلول کربس قرار گرفت. محتویات این محلول برحسب میلی مول در لیتر عبارتند از :

(KCl 4.8, KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, Glucose II, . CaCl<sub>2</sub> 1.2 NaCl 118, NaHCO<sub>3</sub> 25) محلول کربس با گاز اکسیژن ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵٪ همراه شده و با pH= ۷/۴ و حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد مورد استفاده قرار گرفت. روش کار بدین ترتیب بود که پس از بیهوشی حیوانات با اتر، قلب هریک از آنان مجزا می گردید (متوسط وزنی قلب ها ۰/۰۲۶ ± ۱/۰۱۷ گرم) ، ابتدا آئورت مطابق روش لانگندورف کانوله شده و پس از ۱۰-۵ دقیقه، دهلیز چپ کانوله شده و تغذیه قلب به روش قلب فعال ( working Heart ) با پیش بار ( Pre load ) و پس بار ( After load ) به ترتیب ۱۵ و ۸۰ سانتیمتر آب انجام می گرفت. پارامترهای قلبی نظیر فشار بطن چپ ، فشار آئورتی ، جریان آئورتی و جریان کرونری نیز سنجش می گردید. برای سنجش دو پارامتر اول از Pressure transducer و با کمک دستگاه Power lab و برای سنجش دو پارامتر بعدی از روش اندازه گیری مستقیم با سیلندر مدرج استفاده شد.

مراحل آزمایش بدین ترتیب بود : الف- مرحله اول : در این مرحله پرفیوژن طبیعی قلب جهت تثبیت و همچنین ثبت فعالیت پایه به مدت ۲۵ دقیقه ادامه می یافت. ب - مرحله دوم: یا کاردیوپلژی یا ، در این مرحله با پرفیوژن محلول کربس محتوی ۲۰ میلی مول KCl در لیتر به مدت ۲ دقیقه، قلب دچار ایست می گردید، بلافاصله پرفیوژن مایع بطور کامل قطع شده و سپس قلب به مدت ۲۵ دقیقه در این مرحله باقی می ماند. در طی این مدت قلب در محلول کربس با درجه حرارت طبیعی (۳۷ درجه سانتیگراد) غوطه ور بوده و در واقع تحت کاردیوپلژیای نورموترمیک قرار داشت. ج- مرحله سوم: یا ری پرفیوژن ، که در آن مجدداً پرفیوژن طبیعی با محلول کربس برقرار شده و به مدت ۳۰ دقیقه ادامه می یافت که ۱۵ دقیقه ابتدایی به روش لانگندورف و ۱۵ دقیقه بعدی به روش قلب فعال بود. علاوه بر این روند ، در گروه تست به میزان ۵ میلی مول در لیتر اسید آمینه ل - سیستین (تهیه شده از SIGMA) به محلول کربس به مدت ده دقیقه قبل و بعد از ایست قلبی اضافه گردید. جهت بررسی

در این خصوص بعهده گلوکوتایون است (۴) در حقیقت گلوکوتایون مهمترین تیول غیر پروتئینی در سلولهای پستانداران بوده و نقش مهم آنتی اکسیدانی دارد(۵). بیوسنتز گلوکوتایون عمدتاً بوسیله غلظت اسیدهای آمینه پیش ساز آن تعیین می شود(۶) و مشخص شده که ساخت آن بوسیله مقدار سیستین موجود در سطح داخل سلولی تعیین می گردد (۷) به زبان دیگر سیستین اسید آمینه تعیین کننده میزان ساخت گلوکوتایون می باشد(۵) منبع L-cysteine در پستانداران عمدتاً پروتئینهای غذایی، پرتولیز اندوزن و سنتز آن از L-Methionine می باشد(۸). همچنین مشخص شده که تقریباً کلیه سلولهای پستانداران واجد سیستمهای نقل و انتقال اسیدهای آمینه خنثی هستند که سیستین نیز می تواند از این طریق وارد سلولها شود ، (۹) این موضوع نکته مثبتی در خصوص سیستین می باشد چرا که اشکال دیگر این اسید آمینه ، از جمله Cystine که ساختمان مولکولی متفاوتی (cys-cys) دارد خنثی نبوده (۹) و شکل مناسبی برای آزاد سازی این اسید آمینه بداخل سلول نمی باشد(۱۰). در هر صورت در خصوص فعالیت آنتی اکسیدان سیستین و تأثیرات بافتی آن نتایج متناقضی گزارش شده (۱۱) از یک طرف نشان داده شده که اتواکسیداسیون سیستین ، منجر به تأثیرات توکسیک خصوصاً در سلول های حساسی مانند هیپاتوسیتها شده است (۱۲) و از طرف دیگر تأثیرات حفاظتی بر روی قلب نیز از آن گزارش گردیده است(۱۱). در یک مطالعه تجویز سیستین قبل از ایسکمی و ری پرفیوژن منجر به کاهش ناتوانی عملکردی قلب ( myocardial stunning ) متعاقب ایسکمی شده است(۱۳) و در واقع ضعف عملکرد قلبی بدنال ایسکمی را بهبود بخشیده است. همچنین بازگشت مناسبتر سطح ATP داخل سلولی پس از بکار گیری سیستین(۱۴) نیز گزارش گردیده است. در مجموع مطالعات اندکی در این رابطه صورت گرفته و با توجه به ابهامات موجود در رابطه با اسید آمینه سیستین و کمبود اطلاعات خصوصاً در زمینه تأثیر این اسید آمینه در شرایط کاردیوپلژی ، مطالعه حاضر جهت تعیین نقش اسید آمینه سیستین در حفظ پارامترهای مختلف عملکردی قلبی متعاقب کاردیوپلژی در قلب مجزا شده رت انجام شده است.

### روش کار:

مطالعه به روش تجربی و بر روی رت بالغ نر از نژاد ویستار (۳۴۰ - ۳۱۰ گرم) انجام گرفت . قلب هریک از

جریان آئورتی و جریان کرونری در هر دو گروه کنترل و تست تقریباً مشابه بوده و تفاوت معنی دار و قابل توجهی در این رابطه وجود ندارد. این موضوع نشان دهنده یکسان بودن شرایط در ابتدای آزمایش می باشد. ستون دوم مقادیر پارامترهای مختلف قلبی را ۲۰ دقیقه پس از شروع آزمایش نشان می دهد. این در حالی است که در گروه تست اضافه شدن اسید آمینه سیستئین به مدت ده دقیقه سپری شده و همانگونه که از مقایسه مقادیر این ستون با مقادیر پایه مشاهده می گردد، افزودن سیستئین به مدت ده دقیقه به محلول تغذیه ای قلب، تاثیر چندانی بر پارامترهای عملکردی آن نسبت به مقادیر کنترل و پایه نداشته است. از طرف دیگر ستون سوم میزان پارامترهای قلبی را پس از طی مرحله کاردیوپلژی و برگشت روند تغذیه ای طبیعی نشان می دهد. همانگونه که مشاهده می شود در گروه کنترل افت واضحی در پارامترهای فشار آئورتی، جریان آئورتی و جریان کرونری و همچنین افزایش مشخصی در پارامتر فشار دهلیز چپ رخ داده که حاکی از درجات متوسطی از آسیب قلبی ناشی از ایسکمی می باشد. کلیه این تغییرات در گروه تست به میزان کمتری رخ داده است. تفاوت بین گروههای کنترل و تست در کلیه موارد مشابه بوده اما فقط در رابطه با فشار دهلیز چپ ( $12/48 \pm 0/41$  میلیمتر جیوه در گروه تست، نسبت به  $13/74 \pm 0/27$  در گروه کنترل  $P = 0/0179$ ) و میزان جریان آئورتی ( $26 \pm 1/693$  میلی لیتر بر دقیقه در گروه تست نسبت به  $19/4 \pm 2/115$  در گروه کنترل  $P = 0/0483$ ) این تغییرات معنی دار بودند.

در نمودار ۱ میزان درصد بازگشت پارامترهای قلبی نسبت به خط پایه، پس از خاتمه مرحله کاردیوپلژی و گذراندن دوره ری پرفیوژن به مدت ۳۰ دقیقه مشاهده می گردد. در گروه دریافت کننده سیستئین پارامترهای فشار آئورتی و میزان جریان آئورتی ( $91/2 \pm 1/69$  و  $61/176 \pm 3/98$  درصد) افت کمتری را در مقایسه با گروه کنترل ( $85/74 \pm 1/28$  و  $44/495 \pm 4/85$  درصد) نشان داده که این تفاوتها معنی دار بودند ( $P = 0/0213$  و  $P = 0/0324$ ). میزان کاهش جریان مایع کرونری و افزایش فشار دهلیز چپ در گروه تست کمتر از کنترل بوده و هر چند که این اختلافات هماهنگ با سایر تغییرات فوق الذکر می باشد اما از نظر آماری به سطح معنی داری نرسیده است.

نتایج بدین ترتیب عمل شد که از مقایسه مقادیر پارامترهای مختلف در دقیقه دهم و بیستم پس از شروع فعالیت قلبی، میزان تاثیر افزودن اسید آمینه سیستئین بر فعالیت قلبی مشخص گردید. میزان بازگشت فعالیت قلبی در رابطه با پارامترهای مختلف بشکل درصد محاسبه شد. به این منظور از مقایسه مقادیر پارامترهای مختلف در دقیقه سی ام پس از مرحله ایست قلبی نسبت به مقادیر پایه (دقیقه دهم پس از شروع فعالیت قلبی) استفاده گردید. سپس میزان درصد تغییرات پارامترهای قلبی در دو گروه مورد مقایسه قرار گرفت. جهت آنالیز و مقایسه اطلاعات در گروههای تست و کنترل نیز از آزمونهای Unpaired t-test و ANOVA و همچنین Tukey post test استفاده گردید.

### نتایج:

میانگین مقادیر پارامترهای مختلف قلبی در دوره های متوالی آزمایش در جدول ۱ نمایش داده شده است.

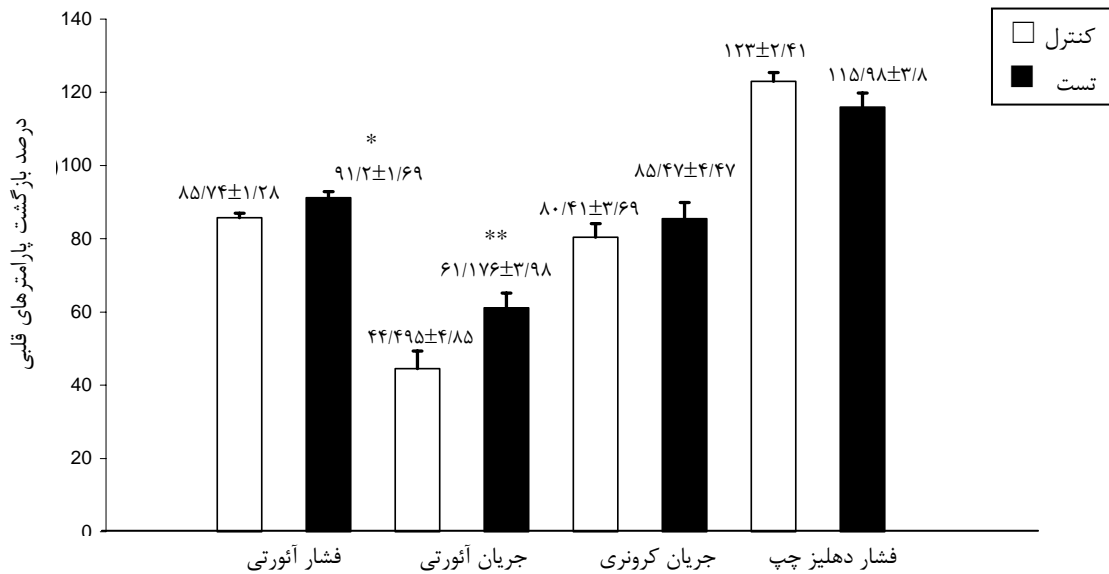
جدول ۱: پارامترهای مختلف قلبی، قبل و پس از کاردیوپلژی نورموترمیک (با حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد)، در گروههای کنترل و تست

پارامترهای قلبی	زمان و مراحل آزمایش		
	قبل از کاردیوپلژی	قبل از کاردیوپلژی	پس از کاردیوپلژی
فشار آئورتی (mmHg)	زمان از شروع آزمایش (۱۰ min)	زمان از شروع کاردیوپلژی (۲۰ min)	زمان از خاتمه کاردیوپلژی (۳۰ min)
گروه کنترل	$103/1 \pm 0/836$	$102/3 \pm 1/39$	$88/4 \pm 1/327$
گروه تست	$100/5 \pm 1/31$	$103 \pm 1/342$	$91/66 \pm 1/7$
فشار دهلیز چپ (mmHg)			
گروه کنترل	$11/17 \pm 0/274$	$11/19 \pm 0/289$	$13/74 \pm 0/27$
گروه تست	$10/76 \pm 0/266$	$10/33 \pm 0/178$	$12/48 \pm 0/41$
جریان آئورتی (ml/min)			
گروه کنترل	$43/6 \pm 1/194$	$43/9 \pm 1/516$	$19/4 \pm 2/115$
گروه تست	$42/5 \pm 1/668$	$45/33 \pm 1/7$	$26 \pm 1/693$
جریان کرونری (ml/min)			
گروه کنترل	$14/55 \pm 0/45$	$15/35 \pm 0/422$	$11/7 \pm 0/538$
گروه تست	$14/91 \pm 0/436$	$15/083 \pm 0/81$	$12/75 \pm 0/667$

مقادیر بشکل  $Mean \pm SEM$  نمایش داده شده و تفاوت بین تست و کنترل با  $P < 0.05$  معنی دار تلقی شده است.

$$P = 0/0483^{**}, P = 0/0179^*$$

همانگونه که در ستون اول این جدول مشاهده می گردد مقادیر پایه برای پارامترهای فشار آئورتی، فشار دهلیزی



نمودار ۱: میزان درصد بازگشت پارامترهای مختلف قلبی، ۳۰ دقیقه پس از دوره کاردیوپلژیای نوروموترمیک نسبت به خط پایه در گروه های کنترل و تست. (مقادیر به شکل Mean ± SEM نمایش داده شده است).

\* P=0.0213

\*\* P=0.0324

مشخص شده که تقریباً کلیه سلولهای پستانداران واجد سیستم های نقل و انتقال اسیدهای آمینه خنثی هستند که سیستئین نیز می تواند از این طریق وارد سلولها شود (۹) در مطالعات گذشته نشان داده شده که جذب L-cysteine توسط سلولهای قلبی از طریق دو ناقل مشخص صورت می گیرد (۱۶). بنابراین پرفیوژن قلبی با استفاده از سیستئین می تواند منجر به افزایش مقدار این اسید آمینه در سطح داخل سلولی و بدنبال آن افزایش میزان گلوکوتایون گردد. در مطالعات گذشته افزایش مقدار گلوکوتایون داخل سلولی با استفاده از پرفیوژن سیستئین نشان داده شده است (۱۷) هر چند که در خصوص تاثیرات آنتی اکسیدانی سیستئین اختلاف نظرهای وجود دارد (۱۱) اما هماهنگ با نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، در خصوص تاثیرات حفاظتی آن بر روی قلب نیز گزارشاتی ارائه شده، از جمله مشخص شده که تجویز سیستئین قبل از ایسکمی و ری پرفیوژن منجر به کاهش ناتوانی عملکردی قلب (myocardial Stunning) متعاقب ایسکمی شده است (۱۴) همچنین بازگشت مناسبتر سطوح ATP داخل سلولی پس از بکارگیری سیستئین (۱۵) گزارش شده است، در یک مطالعه دیگر مشخص شده که تجویز N-acetyl cysteine منجر به حفظ

مهمترین یافته مطالعه حاضر عبارتست از اینکه تجویز اسید آمینه سیستئین در دوره قبل و پس از کاردیوپلژیای منجر به بازگشت مناسبتر عملکرد قلبی در طی دوره ری پرفیوژن گردیده است. از جمله شواهد این یافته می توان به موارد زیر اشاره نمود:

الف) حفظ معنی دار فشار و جریان آئورتی و افزایش کمتر میزان فشار دهلیزی در این مرحله نسبت به گروه کنترل. ب) میزان درصد بازگشت بالاتر و معنی دار فشار و جریان آئورتی در این مرحله نسبت به گروه کنترل.

در مطالعات گذشته نقش اشکال فعال اکسیژن تشکیل شده در حین ری پرفیوژن در ایجاد اختلالات عملکردی قلبی موسوم به Myocardial stunning مشخص گردیده است (۱) افزایش این مواد در دوره ری پرفیوژن متعاقب ایسکمی نیز نشان داده شده (۲) و مشخص گردیده که منجر به اختلال عملکرد قلبی و استرس اکسیداتیو می گردند (۳) آنتی اکسیدانتهای درون زای قلبی می توانند در برابر این عوامل تا حدودی از قلب محافظت کنند. مشخص شده که مهمترین نقش در این رابطه بعهده گلوکوتایون می باشد (۴) و نقش مهم آنتی اکسیدانی دارد (۵) از طرف دیگر میزان ساخت گلوکوتایون تحت تاثیر میزان سیستئین داخل سلولی می باشد (۷) همچنین

7. Rishikof DC, Krupsky M, Goldstein RH. The effect of prostaglandin E2 on cystine uptake and glutathione synthesis by human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1405: 155-160
8. O'Connor E, Devesa A, Garcia C, Puertes IR, Pellin A, Vina JR. Biocynthesis and maintenance of GSH in primary astrocyte cultures: role of L-cystine and ascorbate. *Brain Res* 1995; 680:157-163
9. Bannai S, Sato H, Ishii T, and Sugita Y. Induction of cystine transport activity in human fibroblasts by oxygen. *J Biol Chem* 1989; 264(31): 18480-18484.
10. Anderson ME, Meister A. Intracellular delivery of cysteine. *Methods Enzymol* 1987; 143: 313-325
11. Pisarenko OI, Mechanisms of myocardial protection by amino acids: Facts and hypotheses. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996; 23:627-633.
12. Saez G, Thornalley PJ, Hill HAO, Hems R, Bannister JV. The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Acta* 1982; 719 : 24-31.
13. Tang LD, Sun JZ, Wu K, Sun CP, Tang ZM. Beneficial effects of N-acetylcysteine and cysteine in stunned myocardium in perfused rat heart. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 601-606
14. Tani M. Effects of anti-free radical agents on Na<sup>+</sup>,Ca<sup>2+</sup>, and function in reperfused rat hearts. *Am J physiol* 1990, 259 (Heart Circ. Physiol . 28): H 137-H 143,1990
15. Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res* 2000; 41(6) : 613-627.
16. Lin H, King N, Mc Givan JD, Suleiman M-S. Expression of ASCT2 and characterization of L-cysteine uptake in isolated rat cardiomyocytes. *J Physiol* 2004; 557: 14 PC
17. Shackebaei D, King N, Shukla Suleiman MS. Mechanisms underlying the cardioprotective effect of L-cysteine Molecular and cellular. *Biochemistry* 2005;227:27-31
18. Fischer UM, Cox CS, Allen SJ, Stewart RH, Mehlhorn U, Laine GA. The antioxidant N-acetylcysteine preserves myocardial function and diminishes oxidative stress after cardioplegic arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003 Nov;126(5):1483-1488.

عملکرد سیستولیک قلب پس از Cardiopulmonary bypass وایست قلبی می گردد. (۱۸) علاوه بر آن تاثیر مثبت بکارگیری سیستئین بر بازگشت عملکرد قلبی متعاقب ایسکمی گلوبال نیز در یک مطالعه دیگر نشان داده شده است (۱۷).

### نتیجه نهائی :

بنابراین با توجه به نکات فوق الذکر، تاثیر مثبت مشاهده شده از تجویز سیستئین می تواند ناشی از نقش آنتی اکسیدانی آن باشد. بدین ترتیب که این اسید آمینه احتمالاً موجب تشدید ساخت گلوپروتئین بعنوان آنتی اکسیدان مهم داخل سلولی شده و بنابراین موجب کاهش آسیب های سلولی دوره ری پرفیوژن و بهبود نسبی پارامترهای قلبی درمقایسه با کنترل شده است. در مجموع با توجه به تاثیر مثبت گزارش شده از اسید بالینی، انجام مطالعات تکمیلی جهت تعیین دقیق تر مکانیسم اثر و بررسی کاربرد بالینی آن پیشنهاد می گردد.

### منابع :

1. Klawitter PF, Murray HN, Clanton TL, Angelos MG. Reactive oxygen species generated during myocardial ischaemia enable energetic recovery during reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H 1656-H1661.
2. Dalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000; 47 : 446-456
3. Ferrari R, Pepi P, Ferrari F, Nesta F, Benigno M, Visioli O. Metabolic derangement in ischaemic heart disease and its therapeutic control. *Am J Cardiol* 1998;82:2K-13K
4. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983; 52: 711-760
5. Li J, Wang H, Stoner GD, Bary TM. Dietary supplementation with cysteine prodrugs selectively restores tissue glutathione levels and redox status in protein malnourished mice. *J Nutr Biochem* 2002;13 :625 –633
6. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function . *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.