

# دانشور

## پزشکی

## افزایش استرس اکسیداتیو و بیان ژن های p53، bax و bcl2 در بیماران مبتلا به انفارکتوس قلبی حاد

نویسندگان: اکرم سادات طباطبائی پناه<sup>۱</sup>، رضا اکبرزاده<sup>۲</sup>، زهره خدایی<sup>۳</sup>، سید محمدحسین قادریان<sup>۳\*</sup>

۱. باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران
۲. گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. گروه بیوشیمی، تغذیه و ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی البرز، البرز، ایران

\*نویسنده مسئول: سید محمدحسین قادریان E-mail: sghaderian@yahoo.co.uk

### چکیده

مقدمه و هدف: آپوپتوزیس در تغییر شکل نامطلوب بطن چپ در طی انفارکتوس قلبی حاد (AMI) دخیل است و آسیب DNA<sup>۱</sup> و p53 نقش مهمی در تنظیم آپوپتوزیس ایفا می کنند. آسیب اکسیداتیو باعث تشدید نارسایی قلبی و کاهش عملکرد قلب می شود. در این مطالعه، سطوح سرمی p53 و bax و bcl-2 پس از وقوع AMI در بیماران بررسی گردید.

مواد و روش ها: تحقیق به روش همگروهی تاریخی انجام شد. تعداد ۵۰ فرد مبتلا به AMI و ۵۰ نفر سالم مشابه آن ها در مورد وضعیت شاخص سطح سرمی p53 با روش های الایزا<sup>۱</sup>، وسترن بلاتینگ<sup>۱</sup> و بیان p53 mRNA، bax و bcl-2 توسط Real-time RCR اندازه گیری و مقادیر آن ها مورد قضاوت آماری قرار گرفت. همچنین سطح سرمی 8-OHdG در این افراد اندازه گیری گردید.

نتایج: سطوح سرمی p53 و 8-OHdG در بیماران مبتلا به AMI در مقایسه با افراد کنترل افزایش پیدا کرد ( $P < 0.001$ ). بیان p53 mRNA و bax در بیماران افزایش یافت، در حالی که bcl-2 کاهش نشان داد ( $P < 0.001$ ). وزن مولکولی پروتئین p53، ۵۳kDa تعیین گردید.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که p53 و 8-OHdG می تواند به ترتیب به عنوان مارکرهای قابل اعتماد برای گزارش آپوپتوزیس و آسیب DNA به دنبال وقوع AMI مطرح گردند. نتایج این مطالعه آشکار کرد که آپوپتوزیس در اثر افزایش بیان p53 و bax و کاهش بیان bcl-2 اتفاق می افتد که ممکن است یک روش درمانی در بهبود AMI باشد.

واژگان کلیدی: آپوپتوزیس، p53، آسیب DNA، 8-OHdG، انفارکتوس قلبی حاد، bax، bcl-2

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیست و سوم-شماره ۱۲۰  
دی ۱۳۹۴

دریافت: ۱۳۹۴/۰۸/۱۷  
آخرین اصلاح ها: ۱۳۹۴/۰۹/۳۰  
پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۰۶

## مقدمه

ردیابی چنین فاکتورهای مهمی، نقش بااهمیتی در طراحی راهکار درمانی برای ممانعت از آپوپتوزیس در بهبود AMI ایفا می‌کند. در این تحقیق، اهمیت ارزیابی سطوح p53 و 8-OHdG به ترتیب به عنوان مارکرهای آپوپتوزیس و آسیب DNA در سرم بیماران مبتلا به AMI باتوجه به موارد ذکر شده نشان داده شده است. به دلیل اهمیت این مارکرها در سنجش وجود آپوپتوزیس و همچنین آسیب DNA، سطوح سرمی p53 و 8-OHdG بررسی گردید. همچنین بیان mRNA ژن‌های p53, bax و bcl-2 به عنوان ژن‌های مداخله‌گر در بیماری قلبی مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

## مواد و روش‌ها

## طراحی مطالعه

در این مطالعه، از روش هم‌گروهی تاریخی و از ۵۰ بیمار مبتلا به AMI بین سال‌های ۸۹-۸۸ استفاده گردید. از ۶۵ بیمار غربال شده، ۵۹ نفر ثبت‌نام شدند. سه بیمار از ثبت‌نام در این مطالعه امتناع کردند و دو بیمار به علت فقدان اطلاعات آماری از مطالعه خارج شدند. چهار بیمار هم به علت پردازش نامناسب نمونه‌های آزمایشگاهی از مطالعه کنار گذاشته شدند. تمام بیماران، مورد ارزیابی اطلاعات اولیه قبل از شروع کار آزمایشگاهی قرار گرفتند. در این مطالعه از ۵۰ فرد کنترل نیز نمونه‌گیری شد. تمام نمونه‌ها با همکاری کادر پزشکی و پرستاری بیمارستان شهید مدرس در تهران جمع‌آوری گردید. اطلاعات فرم‌ها و نحوه و علت استفاده از نمونه‌ها به وسیله افراد بیمار و کنترل تأیید شد. همچنین کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید بهشتی بر نمونه‌گیری، فرم اطلاعات و روش‌های انجام شده نظارت داشت.

انفارکتوس قلبی<sup>۱</sup> (MI) یکی از فراوان‌ترین وقایع قلبی‌عروقی در جهان است. آپوپتوزیس یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی یک واقعه فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی است و در مرگ سلول عضله قلب در طی MI و نارسایی قلبی<sup>۲</sup> دخالت دارد (۱،۲). آپوپتوزیس در طی انفارکتوس قلبی حاد و مزمن در مطالعاتی بر روی انسان و حیوانات اثبات شده است (۳-۵). آپوپتوزیس می‌تواند توسط آسیب DNA و افزایش بیان p53 فعال شود (۶) که به وسیله استرس اکسیداتیو اثر می‌پذیرد. استرس اکسیداتیو به دلیل گونه اکسیژن واکنشگر<sup>۳</sup> (ROS) در سمیت اکسیژن دخالت می‌کند و باعث القای آسیب اندامک‌های سلولی مثل غشای سلولی (۷،۸) و میتوکندری (۹) یا رتیلولوم سارکوپلاسمیک (۱۰) در سلول عضله قلبی توسط اکسیداسیون پروتئین‌ها و لیپیدها از طریق تغییر ساختارهای سلولی و ژنومی می‌شود (۱۱). بنابراین، ROS به عملکرد قلبی آسیب می‌رساند و به عنوان یک فاکتور مهم در ایجاد نارسایی قلبی تشخیص داده می‌شود (۲۱-۱۲). به دلیل اینکه DNA یکی از اهداف مهم ROS است، این مسئله باعث افزایش شکل‌گیری DNA با رشته‌های شکسته شده و آسیب DNA ترمیم نشده و می‌تواند باعث القای جهش‌ها در ژن‌های تنظیم‌کننده رشد سلول شود. آسیب DNA ژن p53 را فعال کرده و پروتئین p53 یک فاکتور رونویسی است که مسئول تنظیم پاسخ سلولی به آسیب می‌باشد. سطوح پروتئینی p53 باعث افزایش در پاسخ به آسیب DNA (۲۱) و استرس اکسیداتیو (۲۲) می‌شود. قابل‌اعتمادترین مارکر آپوپتوزیس و آسیب DNA اکسیداتیو در سرم به ترتیب p53 و 8-OHdG است (۲۷-۲۳). آپوپتوزیس ممکن است توسط رونویسی ژن پیش‌آپوپتوزی bax تحریک شده، با p53 (۲۸-۳۰) و ممانعت ژن آنتی‌آپوپتوزی bcl-2 (۳۱-۲۸) تعیین شود.

1. myocardial infarction

2. heart failure

3. reactive oxygen species

p53 به شرح زیر بود: ۳۰ دقیقه در  $60^{\circ}\text{C}$ ، ۱۰ دقیقه در  $95^{\circ}\text{C}$  و سپس ۴۵ سیکل تکثیر برای ۱۵ ثانیه در  $95^{\circ}\text{C}$  و ۱ ساعت در  $55^{\circ}\text{C}$  که توسط طویل شدن انتهایی برای ۱۰ دقیقه در  $72^{\circ}\text{C}$  دنبال شد. PCR در مورد bcl-2 و bax به شکل زیر انجام شد: (a).  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه؛ (b). ۵۰ سیکل  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ دقیقه؛ (c).  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ ساعت. همه نمونه‌ها با GAPDH مقایسه گردیدند. هر نمونه به شکل سه تایی تکثیر و با کنترل‌های منفی کافی، واکنش PCR انجام شد. اختصاصیت PCR توسط ارزیابی منحنی ذوب و متعاقب آن توسط الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد.

#### کنترل‌های داخلی برای ارزیابی ژن هدف

از ژن‌های سرای گردان معمول، GAPDH برای انتخاب یک کنترل داخلی مناسب استفاده شد که ساده‌ترین نتایج را تحت شرایط آزمایش در بر داشته باشد. توالی‌های پرایمر و پروب از توالی‌های مقالاتی که منتشر شده بود، به دست آمد (۳۳) که در جدول ۱ آمده است. پروب‌ها با رنگ گزارشگر FAM<sup>۳</sup> و رنگ خاموش‌کننده TAMRA<sup>۴</sup> نشان‌گذاری شدند. ژن‌های کنترل به شکل سه تایی تحت شرایط به کاررفته برای تکثیر ژن‌های هدف تکثیر شدند.

#### ردیابی p53 به وسیلهٔ آزمون وسترن بلائینگ

سدیم دو دسیل سولفات-پلی‌اکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) به وسیلهٔ روش لاملی<sup>۵</sup> (۲۸) و وسترن بلائینگ بر طبق روش توپین<sup>۶</sup> (۲۹) انجام شد. PBMCs با استفاده از بافر لیزکننده شامل ۱٪ NP40، ۰/۵٪ سدیم داکسی کولات<sup>۷</sup>، ۰/۱٪ سدیم دو دسیل سولفات<sup>۸</sup> (SDS)، ۱ mM فنیل متیل سولفونیل فلوراید<sup>۹</sup> (PMSF)، ۱۰ mg/ml لئوپتین<sup>۱۰</sup>، ۱۰ mg/ml آپروتینین<sup>۱</sup>،

#### جمع‌آوری خون و جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی<sup>۱</sup> (PBMCs)

در این مطالعه، نمونه‌های خون محیطی از بیماران مبتلا به AMI در طی ۲۴-۴۸ ساعت اولیه پس از رخداد AMI برای اندازه‌گیری مقادیر p53 و 8-OHdG در سرم جمع‌آوری شد. سرم از ۵ میلی‌لیتر خون محیطی به وسیلهٔ سانتریفیوژ به دست آمده و در  $-85^{\circ}\text{C}$  درجهٔ سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. PBMCs از دندگان خون به وسیلهٔ سانتریفیوژ گردان دانسیته بر روی فایکول (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) برای وسترن بلائینگ جداسازی گردید.

#### اندازه‌گیری p53 و 8-OHdG به وسیلهٔ آزمون الایزا

مقادیر p53 و 8-OHdG در نمونه‌های سرم افراد بیمار و کنترل به ترتیب با استفاده از کیت‌های الایزا Bender MedSystems (Burlingame, CA, USA) (۲۶) و GENTAUR (8-OHdG Fukuroi, Shizuoka, Japan) که قبلاً گزارش شده است (۶)، به دست آمد. اندازه‌گیری بر طبق دستورالعمل کیت انجام گردید. ضمناً به منظور اطمینان از یافته‌ها، آزمون از هر نمونه سه بار صورت گرفت.

#### Real time- RT RCR

بیان ژن p53، bax و bcl-2 و همچنین ژن سرای گردان<sup>۲</sup> گلیسر آلدئید<sup>۳</sup>- فسفات دهیدروژناز (GAPDH) ارزیابی شد. mRNA از PBMCs جدا شد و به cDNA با استفاده از کیت‌های تجاری در دسترس (Sigma) طبق دستورالعمل کیت، تبدیل شد. تولید cDNA با توجه به نحوهٔ دستورالعمل کیت (USA Invitrogen, California) با استفاده از پرایمرهای الیگو- dT انجام شد. بیان mRNA MMPs توسط Real time- RT RCR با استفاده از آزمایش بیان Taqman q-PCR (Invitrogen) آزمایش شد. از پرایمرهای تصادفی طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. توالی‌های پروب و پرایمر از توالی‌هایی که از قبل منتشر شده است، به دست آمد (۳۳، ۳۴). توالی‌ها در مورد پرایمرها و پروب‌ها برای p53، bax و bcl-2 در جدول ۱ آمده است. شرایط RT-PCR در مورد

<sup>1</sup> peripheral blood mononuclear cells

<sup>2</sup> Housekeeping

<sup>3</sup> 6-carboxy-fluorescein

<sup>4</sup> 6-carboxytetramethylrhodamine

<sup>5</sup> Laemmli

<sup>6</sup> Towbin

<sup>7</sup> sodium deoxycholate

<sup>8</sup> sodium dodecyl sulfate

<sup>9</sup> phenyl methyl sulfonyl fluoride

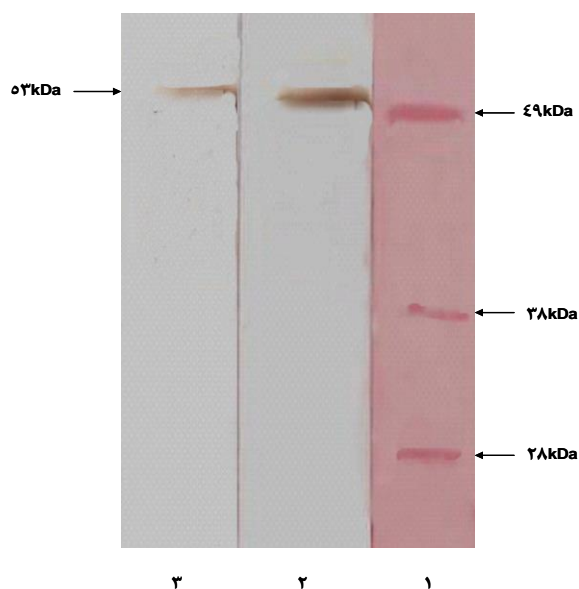
<sup>10</sup> Leupeptin

### سطوح 8-OHdG سرم

سطوح سرمی 8-OHdG به وسیلهٔ آزمون الایزا اندازه‌گیری شد که نتایج نشان داد که سطوح 8-OHdG (جدول ۳) در بیماران، سطح بالاتری نسبت به افراد طبیعی نشان داد ( $P < 0.001$ ).

### نتایج وسترن بلائینگ p53

ارزیابی وسترن بلائینگ PBMCs لیز شده درمورد پروتئین p53 انجام شد. عصاره‌های سلولی افراد بیمار و کنترل شامل باندهای ۵۳ کیلودالتونی بود (شکل ۱).



شکل ۱. وسترن بلائینگ p53 درمورد افراد مبتلا به انفارکتوس قلبی حاد و افراد کنترل. Lane 1: مارکر وزن مولکولی، lane 2: نمونه بیمار، lane 3: نمونه کنترل

### بیان p53 mRNA, bax و bcl-2

سطح p53 mRNA, bax و bcl-2 توسط Real time- RT RCR بر روی نمونه‌های مربوط به بیماران مبتلا به AMI و افراد کنترل بررسی شد. مقایسهٔ بیماران و افراد کنترل اثبات کرد که در بیماران، بیان p53 و bax به ترتیب ۴/۵ و ۳ برابر بیشتر از افراد کنترل می‌باشد ( $P < 0.001$ ). به شکل نامشابه، بیان bcl-2 بیماران حدود ۰/۷۵ برابر در مقایسه با افراد کنترل کاهش یافت ( $P < 0.001$ ) (شکل ۲).

۲ mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ، ۱۰ mM NaF (تماماً از شرکت Sigma خریداری شدند) لیز شدند. پروتئین‌های جدا شده به وسیلهٔ ژل SDS-PAGE جدا شده و بر روی غشای نیتروسولوز (Sigma) منتقل شدند. سپس در معرض بافر مسدودکننده (PBS شامل ۲٪ BSA) قرار گرفتند. غشای نیتروسولوز با محلول BSA ۱٪ شامل رقت ۵۰۰:۱ از آنتی‌بادی اولیه (آنتی‌بادی مونوکلونال ضد p53 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA. USA) برای ۹۰ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه انکوبه شد. پس از شستشو با PBS/Tween، آنتی‌بادی‌های متصل شده توسط رقت goat anti mouse immunoglobulin-HRP conjugate ۱:۱۰۰۰ (Dako) ۹۰ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه مجاور شدند. سپس محلول DAB با غشاهای نیتروسولوز برای ۱۰ دقیقه انکوبه شدند تا باندهای پروتئینی p53 نمایان شود.

### ارزیابی آماری

ارزیابی آماری اطلاعات توسط SPSS نسخهٔ ۱۶، برنامهٔ نرم‌افزار آماری و آزمون t انجام شد و دو گروه بیمار و کنترل باهم مقایسه گردید. P value کمتر از ۰/۰۰۱ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

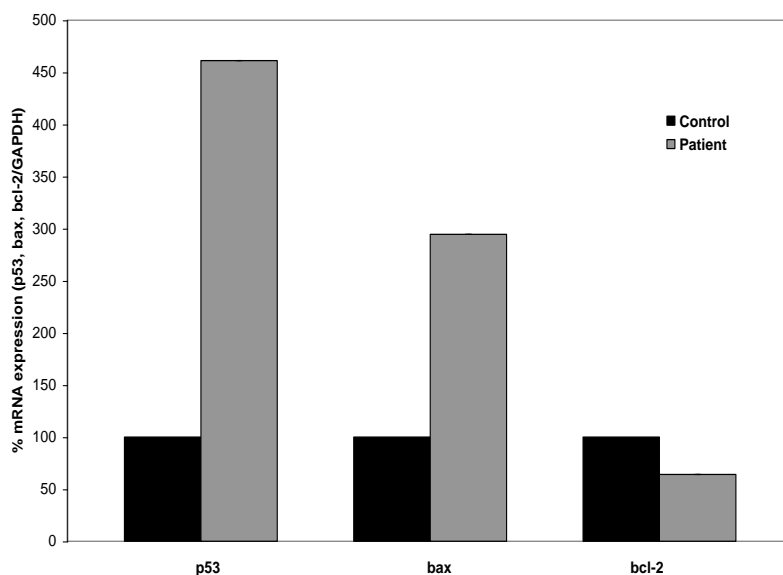
#### خصوصیات آماری

در این مطالعه که به روش هم‌گروهی تاریخی انجام شد، ۵۰ بیمار مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید مدرس تهران و ۵۰ نفر کنترل مطالعه گردید. اطلاعات آماری در جدول ۲ نشان داده شده است.

#### سطوح p53 سرم

سطوح سرمی p53، به وسیلهٔ آزمون الایزا اندازه‌گیری شد که نتایج نشان داد که سطوح سرمی p53 (جدول ۳) در بیماران، سطح بالاتری نسبت به افراد طبیعی نشان داد ( $P < 0.001$ ).

<sup>1</sup>. Aprotinin



شکل ۲. تغییرات در بیان mRNA p53T, bax و bcl-2 توسط Real-time PCR در ۵۰ نفر افراد بیمار مبتلا به انفارکتوس قلبی حاد و ۵۰ نفر افراد سالم (\*P<0.001, mean ± SE)

جدول ۱. پرایمرها و پروب‌های استفاده شده در بیان mRNA توسط real time RT-PCR

ژن	پرایمر	سکانس پرایمر
P53	Forward	5'-TAA CAG TTC CTG CAT GGG CGG C-3'
	Reverse	5'-AGG ACA GGC ACA AAC ACG CAC C-3'
	Probe	5'-CGG AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC A-3'
bax	Forward	5'-TGG AGC TGC AGA GGA TGA TTG-3'
	Reverse	5'-GAA GTT GCC GTC AGA AAA CAT G-3'
	Probe	5'-ACA TAC TAA ATT GGA GCA CTC TGT GTG-3'
bcl-2	Forward	5'-TTG GCC CCC GTT GCT T-3'
	Reverse	5'-CGG TTA TCG TAC CCC GTT CTC-3'
	Probe	5'-AGC GTG CGC CAT CTT TCC CAG-3'
GAPDH	Forward	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'
	Reverse	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'
	Probe	5'-CCG ACT CTT GCC CTT CGA AC-3'

جدول ۲. توزیع افراد مورد بررسی برحسب خصوصیات و به تفکیک گروه.

بیماران مبتلا به انفارکتوس قلبی حاد N=۵۰	افراد سالم (کنترل) N=۵۰	گروه خصوصیات	
		۲۸	۲۵
۱۲	۲۵	زن	
۳۸	۳۴	بیشتر از ۴۵	سن
۱۲	۱۶	کمتر از ۴۵	
۳۸	۱۲	بله	اعتیاد به سیگار
۱۲	۲۹	خیر	
۳۵	۱۴	بله	افزایش کلسترول
۱۵	۳۶	خیر	
۳۴	۱۰	بله	افزایش فشار خون
۱۶	۴۰	خیر	
۳۳	۲۲	بله	دیابت
۱۷	۲۸	خیر	
۴۱	۱۲	بله	نارسائی قلبی قبلی
۸	۳۸	خیر	
۲۸	۱۱	بله	تاریخچه خانوادگی نارسائی قلبی
۲۲	۳۹	خیر	
۴۲	۲۶	بله	استرس
۸	۲۴	خیر	
۶	۵۰	بله	مصرف الکل
۴۴	۰	خیر	
۳۳	۵	بله	مصرف آسپیرین
۱۷	۴۵	خیر	
۲۶	۴	بله	مسدودکننده های بتا
۲۴	۵۶	خیر	

جدول ۳. اثر انفارکتوس قلبی حاد بر (8-OHdG (ng/ml و p53 (U/ml)

سطح 8-OHdG (ng/ml)	سطح p53 (U/ml)	تعداد	گروه
۱/۳۹±۱/۱۶	۴/۴۵±۱/۷۱	۵۰	بیماران مبتلا به انفارکتوس قلبی حاد
۰/۲۵±۰/۱۵	۰/۶۲±۰/۱۶	۵۰	افراد سالم (کنترل)

8-OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

## بحث

توسط انواعی از تحریکات و در تعدادی از بیماری‌ها مثل MI (۳۶-۳۴) و نارسایی قلبی (۳۹-۳۶) القا شود. MI از طریق آپوپتوزیس باعث آسیب سلولی شده و صدمه ایجاد شده در MI یا در سکتة در نواحی انفارکتوسی همانند سلول‌های مجاور در نتیجه آغاز تخریب سلولی ناشی از آپوپتوزیس است (۶). در این مسیر، آسیب سلولی p53 را فعال می‌کند که یک ژن تنظیم‌کننده رونویسی است. پروتئین p53 به طور طبیعی در غلظت‌های کم در سیتوزول وجود دارد که در پاسخ به تعدادی از تحریکات القا شده p53 با آپوپتوزیس شامل استرس اکسیداتیو (۲۲) و آسیب DNA (۲۱) افزایش پیدا می‌کند. ROS مسئول هیدروکسیلاسیون ۲-دئوکسی گوانوزین برای تولید 8-OHdG است که به عنوان یک مارکر قابل اعتماد برای آسیب DNA اکسیداتیو به کار می‌رود (۲۶-۲۳). اندازه‌گیری مستقیم ROS به دلیل نیمه‌عمر کوتاه آن در سرم مشکل است، هرچند اندازه‌گیری فرآورده‌های ناشی از اکسیداتیو می‌تواند آسان‌تر باشد. بنابراین در مطالعه حاضر 8-OHdG بررسی گردید که یکی از محصولات فراوان DNA اکسیداتیو و یک مارکر حساس آسیب DNA است. افزایش آسیب DNA اکسیداتیو در سرم بیماران مبتلا به AMI یافت می‌شود، بنابراین استرس اکسیداتیو یکی از شرایطی است که در آن، آسیب DNA رخ می‌دهد. در نتایج این مطالعه، افزایش p53 و 8-OHdG سرمی مشاهده شد که با مطالعات پیشین موافق بود (۲۷، ۴۰).

علاوه بر این، خانواده ژن bcl-2 یک شبکه پیچیده تنظیم‌کننده آپوپتوزیس است که برخی از ژن‌های آن می‌توانند آپوپتوزیس را مهار کنند و برخی دیگر آن را القا کنند (۶۸). آپوپتوزیس به وسیله محرک‌های مختلفی آغاز شده و به وسیله افزایش بیان bcl-2 مهار می‌شود. افزایش بیان و فعالیت p53، رونویسی bax را افزایش داده و رونویسی bcl-2 را مهار می‌کند (۳۱، ۳۰). p53، bax را در سطح رونویسی تنظیم می‌کند (۲۸). در این مطالعه، افزایش بیان bax و مهار رونویسی bcl-2 نشان

سه یافته مهم در مطالعه حاضر به دست آمد: اول از همه، سطوح بیان p53 mRNA و پروتئین آن در بیماران مبتلا به AMI در مقایسه با افراد کنترل افزایش یافت؛ دوم اینکه، سطوح سرمی 8-OHdG در سرم این بیماران افزایش پیدا کرد و سوم اینکه، افزایش بیان bax و کاهش بیان bcl-2 نشان داده شد. بنابراین مشاهدات این مطالعه پیشنهاد می‌کند که یک راهکار مهارکننده برای افزایش بیان p53 و اثر مستقیم آن بر ژن پیش‌آپوپتوزی bax ممکن است مسیرهای درمانی مهمی باشد که برای متوقف کردن آپوپتوزیس و ممانعت از کاهش بیان bcl-2 به عنوان یک ژن آنتی‌آپوپتوزی برای بهبود AMI طراحی شود. ردیابی مکانیسم‌های مولکولی که باعث ایجاد آپوپتوزیس در سلول‌های پستانداران می‌شود و همچنین تعیین مارکرهای آپوپتوزی به عنوان فاکتورهای کلیدی شناخته شده‌اند که فرایند آپوپتوزیس را پیش می‌برند یا ممانعت می‌کنند.

مطالعات اولیه، حضور آپوپتوزیس را در بیشتر نمونه‌های AMI گزارش داده‌اند (۳۰-۳۳). از آنجاکه آپوپتوزیس تنها چند ساعت پس از رخداد MI و قبل از ظهور نکرور رخ می‌دهد، این مطالعات اثبات کردند که به طور گسترده‌ای آپوپتوزیس در AMI اتفاق می‌افتد (۳۱). به علاوه، آپوپتوزیس در میوکاردیوم طبیعی دیده نشده است (۳۱). پس از اثبات نقش آپوپتوزیس در AMI توسط مطالعات پیشین، افزایش میزان آپوپتوزیس در AMI ممکن است گردش خون محیطی را تحت تأثیر قرار دهد. در این مطالعه، سطوح سرمی p53 اندازه‌گیری گردید و افزایش در بیماران مبتلا به AMI در مقایسه با افراد کنترل نشان داده شد. پروتئین p53 به یک سطح قابل اندازه‌گیری رسیده و سطوح سرمی این مارکر ممکن است مارکر قابل اعتمادی برای AMI باشد که مسیرهای درمانی طراحی شده‌ای برای توقف آپوپتوزیس می‌باشد که باعث پیشرفت مهم بهبودی AMI می‌شود.

شواهد مطالعات انسانی همانند مدل‌های حیوانی و *in vitro* نشان می‌دهد که آپوپتوزیس میوسیت قلبی می‌تواند

داشته باشند، در این تحقیق امکان بررسی این آنزیم‌ها وجود نداشت. مطالعات بعدی می‌توانند در ارزیابی این عوامل کمک کنند.

داده شد که بیان و فعالیت p53 می‌تواند رونویسی را افزایش دهد (۳۰،۳۱).

### نتیجه‌گیری

این مشاهدات به ویژه نشان‌دهنده این حقیقت است که این فاکتورهای تنظیم‌کننده در رخداد آپوپتوزیس اهمیت داشته و می‌تواند عملکرد قلبی را تا حدودی بازیابی کند (۴۱،۴۲). همچنین p53 و 8-OHdG می‌توانند به ترتیب به عنوان مارکرهای قابل‌اعتماد برای گزارش آپوپتوزیس و آسیب DNA به دنبال وقوع AMI مطرح گردند. با توجه به اینکه عوامل مختلفی از جمله کاسپازها می‌توانند در وقوع آپوپتوزیس در بیماری‌های قلبی نقش

### تشکر و قدردانی

این پروژه توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید بهشتی سرمایه‌گذاری شده است که از این طریق از آن‌ها قدردانی به عمل می‌آید. همچنین از پرسنل بیمارستان شهید مدرس به خاطر همکاری در جمع‌آوری نمونه‌های بیماران تشکر می‌شود.

### منابع

1. Hamet P, Moreau P, Dam T, Orlov S, Tea B, de Blois D, et al. The time window of apoptosis: a new component in the therapeutic strategy for cardiovascular remodeling. *Journal of hypertension. Supplement*. 1996;14:S65-70.
2. MacLellan WR, Schneider MD. Death by Design: Programmed Cell Death in Cardiovascular Biology and Disease. *Circulation Research*, 1997;81:137-44.
3. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *The Journal of Clinical Investigation*. 1994;94:16-21.
4. Kang PM, Izumo S. Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature. *Circulation Research*. 2000;86:1107-13.
5. Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacology & Therapeutics*;2004;104:1-16.
6. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Oncologist*. 1999;4:332-9.
7. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Alfieri O, Visioli O. Myocardial damage during ischaemia and reperfusion. *European Heart Journal*. 1993;Suppl G:25-30.
8. Srivastava S, Chandrasekar B, Bhatnagar A, Prabhu SD. Lipid peroxidation-derived aldehydes and oxidative stress in the failing heart: role of aldose reductase. *The American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*. 2002;283:H2612-9.
9. Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation Research*. 2001;88:529-35.
10. Flesch M, Maack C, Cremers B, Baumer AT, Sudkamp M, Bohm M. Effect of beta-blockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction. *Circulation*. 1999;100:346-53.
11. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Review*. 1994;74:139-62.
12. Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *British Heart Journal*. 1991;65:245-8.
13. McMurray J, Chopra M, Abdullah I, Smith WE, Dargie HJ. Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *European Heart Journal*. 1993;14:1493-8.
14. Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, Mihara K, Miyazaki M, Ohe T, et al. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation*. 1998;98:794-9.
15. Nakamura K, Kusano K, Nakamura Y, Kakishita M, Ohta K, Nagase S, et al. Carvedilol decreases elevated oxidative stress in human failing myocardium. *Circulation*. 2002;105:2867-71.



16. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schafers HJ, Nickenig G, Bohm M, et al. Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation*. 2003;108:1567-74.
17. Nakamura K, Kusano KF, Matsubara H, Nakamura Y, Miura A, Nishii N, et al. Relationship between oxidative stress and systolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure*. 2005;11:117-23.
18. Castro PF, Greig D, Perez O, Moraga F, Chiong M, Diaz-Araya G, et al. Relation between oxidative stress, catecholamines, and impaired chronotropic response to exercise in patients with chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *American Journal of Cardiology*. 2003;92:215-8.
19. Tsutsui H. Novel pathophysiological insight and treatment strategies for heart failure--lessons from mice and patients. *Circulation Journal*. 2004;68:1095-103.
20. Selivanova G, Wiman KG. p53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. *Advances in Cancer Research*. 1998;63:1-8.
21. Nishizawa T, Iwase M, Kanazawa H, Ichihara S, Ichihara G, Nagata K, et al. Serial alterations of beta-adrenergic signaling in dilated cardiomyopathic hamsters: possible role of myocardial oxidative stress. *Circulation Journal*. 2004;68:1051-60.
22. Schwartz JL, Antoniades DZ, Zhao S. Molecular and biochemical reprogramming of oncogenesis through the activity of prooxidants and antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993;686:262-78.
23. Kasai H. Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002;33:450-6.
24. Gabbita SP, Lovell MA, Markesbery WR. Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. 1998;71:2034-40.
25. Cutler RG. Human longevity and aging: possible role of reactive oxygen species. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991;621:1-28.
26. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology International*. 1999;49:91-102.
27. Dincer Y, Himmetoglu S, Bozcali E, Vural VA, Akcay T. Circulating p53 and cytochrome c levels in acute myocardial infarction patients. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2009;45:32-41.
28. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227 (5259):680-5.
29. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76:4350-4.
30. Toyoda Y, Shida T, Wakita N, Ozaki N, Takahashi R, Okada M. Evidence of apoptosis induced by myocardial ischemia: A case of ventricular septal rupture following acute myocardial infarction. *Cardiology*. 1998;90:149-51.
31. Veinot JP, Gattinger DA, Fliss H. Early apoptosis in human myocardial infarcts. *Human Pathology*. 1997;28:485-92.
32. James TN. The variable morphological coexistence of apoptosis and necrosis in human myocardial infarction: significance for understanding its pathogenesis, clinical course, diagnosis and prognosis. *Coronary Artery Disease*. 1998;9:291-307.
33. Nakatome M, Matoba R, Ogura Y, Tun Z, Iwasa M, Maeno Y, et al. Detection of cardiomyocyte apoptosis in forensic autopsy cases. *International Journal of Legal Medicine*. 2002;116:17-21.
34. Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, et al. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *American Journal of Pathology*. 1995;146:1325-31.
35. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Laboratory Investigation*. 1996;74:86-107.
36. Liu Y, Cigola E, Cheng W, Kajstura J, Olivetti G, Hintze TH, et al. Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy

- induced by rapid ventricular pacing in dogs. *Laboratory Investigation*. 1995;73:771-87.
37. Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Physiology*. 1997;272:H2313-9.
38. Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, et al. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation*. 1994;89:151-63.
39. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *The New England Journal of Medicine*. 1996;335:17-22.
40. Kono Y, Nakamura K, Kimura H, Nishii N, Watanabe A, Banba K, et al. Elevated levels of oxidative DNA damage in serum and myocardium of patients with heart failure. *Circulation Journal*. 2006;70:1001-5.
41. Greenberg B, Quinones MA, Koilpillai C, Limacher M, Shindler D, Benedict C, et al. Effects of long-term enalapril therapy on cardiac structure and function in patients with left ventricular dysfunction. Results of the SOLVD echocardiography substudy. *Circulation*. 1995;91:2573-81.
42. Kabour A, Henegar JR, Devineni VR, Janicki JS. Prevention of angiotensin II induced myocyte necrosis and coronary vascular damage by lisinopril and losartan in the rat. *Cardiovascular Research*. 1995;29:543-8.

Daneshvar  
Medicine

*Scientific-Research  
Journal of Shahed  
University  
23th Year, No.120  
December 2015-  
January 2016*

Received: 08/11/2015

Last revised: 21/12/2015

Accepted: 27/12/2015

## Increased levels of oxidative stress and p53, Bax, and Bcl2 gene expression in patients with acute myocardial infarction

Akram Sadat Tabatabaei Panah<sup>1</sup>, Reza Akbarzadeh<sup>2</sup>, Zohreh Khodaii<sup>3</sup>, Sayyed Mohammad Hossein Ghaderian<sup>2</sup>

1. Young Research Club, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Department of Biochemistry, Nutrition and Medical Genetics, Faculty of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.

\*E-mail: sghaderian@yahoo.co.uk

### Abstract

**Background and Objective:** Apoptosis is implicated in unfavorable remodeling of the left ventricle during acute myocardial infarction (AMI). Both DNA damage and p53 play important roles in regulating apoptosis. Expression patterns of apoptotic regulating genes such as *p53*, *bax*, and *bcl-2* highlight the importance of inhibiting ventricle remodeling and subsequent injuries.

**Materials and Methods:** In the present cohort study, serum levels of p53 and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) as well as *p53*, *bax*, and *bcl-2* expression were examined after the onset of AMI in Iranian patients. Serum levels of p53 and 8-OHdG were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the presence of p53 protein and mRNA expression of *p53*, *bax*, and *bcl-2* were analyzed by Western blotting and real time RT-PCR methods, respectively.

**Results:** In patients presenting with AMI, serum levels of p53 and 8-OHdG increased in comparison with healthy controls. Likewise, transcripts of *p53* and *bax* were also elevated in patients, while *bcl-2* decreased.

**Conclusion:** Our data suggest the novel use of p53 and 8-OHdG as markers of apoptosis and DNA damage following AMI. Our results also revealed that apoptosis occurs in concert with an up-regulation of *p53* and *bax* and a down-regulation of *bcl-2* which may suggest a possible therapeutic intervention in patients recovering from AMI.

**Keywords:** Apoptosis, p53, bax, bcl-2, DNA damage, 8-OHdG, Acute myocardial infarction