

Evaluation of Cardiac Hemodynamic Parameters Following Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome

Mahsa Noroozzadeh¹,
Nahid Sarahian²,
Razieh Bidhendi Yarandi^{3,4},
Fahimeh Ramezani Tehrani⁵

¹ MSc in Developmental Biology, Reproductive Endocrinology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² MSc in Physiology, Reproductive Endocrinology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Reproductive Endocrinology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ PhD in Biostatistics, Department of Epidemiology and Biostatistics, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵ Professor, Reproductive Endocrinology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received January 30, 2019 ; Accepted March 1, 2020)

Abstract

Introduction: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most common endocrine disorders in women during reproductive ages. This syndrome is associated with disruption of sex hormone levels. Studies have shown that endurance of the heart to ischemia-reperfusion (I/R) injury can be affected by sex hormones. In the present study, the rate of cardiac tolerance against I/R injury in the PCOS rat model was compared with normal (control) rats.

Materials and Methods: The rats were randomly divided into two groups; PCOS and control (n=8 per group). The hearts were isolated in Langendorff isolated heart system. Cardiac perfusion was performed in a retrograde flow in the aorta at constant pressure (75 mmHg) by Krebs-Henslit buffer. A pressure (5-10 mmHg) was put to the left ventricle, using an intraventricular balloon, to measure the hemodynamic parameters of the heart. Cardiac signals were recorded while being transmitted through the catheter to the Powerbull system.

Results: Before I/R, the values for cardiac hemodynamic parameters including HR, LVDP, RPP and $\pm dp/dt$, increased in the rat model of PCOS compared to controls, although these increases were not statistically significant ($P>0.05$). These parameters had decreasing trends after I/R in PCOS rats compared to controls which were not statistically significant ($P>0.05$).

Conclusion: Cardiac resistance to I/R injury was found to be similar in both PCOS and control animals, which could be due to the cardioprotective role of sex hormones such as estrogens.

Keywords: cardiac function, ischemia/reperfusion injury, polycystic ovary syndrome, rat

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (184): 73-85 (Persian).

* **Corresponding Author:** Fahimeh Ramezani Tehrani - Reproductive Endocrinology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: ramezani@endocrine.ac.ir)

بررسی پارامترهای همودینامیک قلب به دنبال آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن در مدل موش صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک

مهسا نوروززاده¹ناهد سراحیان²راضیه بیدهندی یارندی^{3,4}فهیمه رمضانی تهرانی⁵

چکیده

سابقه و هدف: سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS)، یکی از شایع ترین اختلالات غدد درون ریز زنان در سنین تولیدمثل می باشد که با تغییرات در سطوح هورمون های جنسی همراه است. مطالعات نشان داده اند، تحمل قلب به آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن می تواند تحت تاثیر هورمون های جنسی قرار گیرد. در مطالعه حاضر، میزان تحمل قلب در برابر آسیب ناشی از ایسکمی - ریپرفیوژن در مدل موش صحرایی مبتلا به PCOS در مقایسه با موش های صحرایی سالم (کنترل) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: موش های صحرایی به طور تصادفی به دو گروه آزمایشی و کنترل تقسیم شدند (8 سر حیوان در هر گروه). قلب حیوانات در هر دو گروه (مدل مبتلا به PCOS و کنترل)، جدا شد و در دستگاه قلب ایزوله (لانگندورف) قرار گرفت. سپس در یک جریان رتروگرید در آئورت، با فشار ثابت (75 mmHg) توسط بافر کربس - هنسلیت، پرفیوژن قلب صورت گرفت. با استفاده از بالون داخل بطنی، یک فشار برای اندازه گیری پارامترهای همودینامیکی قلب، به بطن چپ وارد شد و از طریق کاتتر، سیگنال های قلبی به سیستم پاورلب فرستاده و ثبت شدند. سپس داده ها تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: قبل از ایسکمی - ریپرفیوژن، مقادیر پارامترهای همودینامیک قلب شامل $\pm dp/dt$, HR, LVDP, RPP حیوانات مدل PCOS در مقایسه با حیوانات کنترل افزایش داشت، اما از نظر آماری معنی دار نبود. بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن، این پارامترها در مقایسه با گروه کنترل روند کاهشی داشتند، اگرچه این تفاوت ها از نظر آماری معنی دار نبودند.

استنتاج: مقاومت قلب در برابر آسیب ناشی از ایسکمی - ریپرفیوژن در مدل موش صحرایی PCOS و کنترل یکسان بود. این نتیجه می تواند به علت نقش محافظت کننده قلبی هورمون های جنسی از جمله استروژن ها باشد.

واژه های کلیدی: عملکرد قلبی، آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن، سندرم تخمدان پلی کیستیک، موش صحرایی

مقدمه

سندرم تخمدان پلی کیستیک، یکی از شایع ترین اختلالات غدد درون ریز در زنان در سنین تولیدمثل، با شیوع 2/2-26/7 درصد در سرتاسر جهان و 7-15 درصد در ایران می باشد (1-4). بر اساس طبقه بندی روتردام وجود

مؤلف مسئول: فهیمه رمضانی تهرانی - تهران: بزرگراه شهید چمران، خیابان یمن، خیابان شهید اعرابی، جنب بیمارستان آیت الله طالقانی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
E-mail: ramezani@endocrine.ac.ir

1. کارشناسی ارشد زیست شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات آندوکرینولوژی تولیدمثل، پژوهشکده ی علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
2. کارشناسی ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات آندوکرینولوژی تولیدمثل، پژوهشکده ی علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
3. مرکز تحقیقات آندوکرینولوژی تولیدمثل، پژوهشکده ی علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
4. دکترای آمار زیستی، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
5. استاد، مرکز تحقیقات آندوکرینولوژی تولیدمثل، پژوهشکده ی علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1398/10/9 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/10/15 تاریخ تصویب: 1398/12/11

حداقل دو ویژگی از سه ویژگی شامل افزایش سطوح آندروژن‌ها (هیپرآندروژنیا)، کاهش یا عدم تخمک‌گذاری و مشاهده کیست‌های تخمدانی، برای تأیید ابتلای زنان به این سندرم ضروری می‌باشد (5). علاوه بر اختلالات هورمونی از جمله تغییر در سطوح آندروژن‌ها، استروژن‌ها، پروژسترون‌ها و گنادوتروپین‌ها، این سندرم با اختلالات متابولیکی از جمله چاقی، افزایش سطوح انسولین، افزایش مقاومت به انسولین و اختلال در سطوح لیپیدی نیز همراه می‌باشد و این‌ها مواردی هستند که خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی - عروقی و دیابت نوع 2 را در این گروه از زنان افزایش می‌دهند (6). پاتوژنز PCOS معمولاً شامل مقاومت به انسولین است که منجر به چندین ناهنجاری کاردیومتابولیک (به عنوان مثال، دیس لیپیدی، فشارخون بالا، عدم تحمل گلوکز، دیابت و سندرم متابولیک) می‌شود، بنابراین ممکن است مقاومت به انسولین اصلی‌ترین عامل خطر در بروز بیماری‌های قلبی عروقی در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک باشد (7،8). یکی از مهم‌ترین بیماری‌های کشنده در سرتاسر جهان طی دهه‌های گذشته، بیماری‌های ایسکمیک قلب است که اغلب به علت انسداد عروق کرونر قلب می‌باشند و ریپرفیوژن یکی از درمان‌های اولیه و فوری برای نجات جان افرادی است که دچار ایسکمی قلبی شده‌اند (9،10). ریپرفیوژن میوکارد، پس از گردش مجدد خون به وجود می‌آید و اکسیژن و مواد غذایی را به سلول‌هایی که قبلاً در معرض ایسکمی قرار داشته‌اند می‌رساند. جریان مجدد گردش خون به قلب می‌تواند با آزاد شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، بروز اضافه بار کلسیم داخل سلولی و تغییر متابولیسم سلولی همراه باشد که منجر به آسیب عملکردی و ساختاری میوکارد خواهد شد. ایسکمی در قلب، موجب کاهش جریان خون و ایجاد تغییرات پاتولوژیکی و در نتیجه آسیب به بافت قلب می‌شود. از سویی دیگر ریپرفیوژن خود نیز موجب آسیب بیش‌تری نسبت به ایسکمی، به قلب می‌شود (11) که این آسیب به عنوان آسیب ایسکمی -

ریپرفیوژن شناخته می‌شود. آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن ممکن است به انفارکتوس میوکارد، آریتمی قلبی و اختلال در انقباض منجر شود (12). مقاومت قلب به آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله جنسیت (هورمون‌های جنسی)، محدودیت رشد داخل رحمی و عوامل ژنتیکی قرار می‌گیرد (13).

برخی از مطالعات تأثیرات منفی آندروژن‌ها را بر روی وضعیت کاردیومتابولیک و تحمل قلب در برابر آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن را گزارش کرده‌اند (14). از سوی دیگر برخی از مطالعات، نقش موثر آندروژن‌ها را در بهبود عملکرد اندوتلیال و کاهش عوامل خطر آترواسکلروز و همچنین اثرات محافظتی آندروژن‌ها را در برابر آسیب وارد شده به قلب، به دنبال ایسکمی - ریپرفیوژن را گزارش کرده‌اند (14). علاوه بر این، در مطالعات دیگر تأثیر مثبت استروژن‌ها بر روی عملکرد قلب و مقاومتش در مواجهه با آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن نیز مطرح شده است (15). با توجه به تغییرات هورمونی از جمله تغییرات در سطوح هورمون‌های آندروژن و استروژن در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک و نقش موثر این هورمون‌ها در محافظت قلبی و تحمل قلب در برابر آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن، بررسی عملکرد قلب و میزان تحمل آن در برابر آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن در سندرم تخمدان پلی کیستیک مورد اهمیت قرار می‌گیرد. با توجه به محدودیت‌های اخلاقی و عدم امکان انجام برخی از آزمایش‌ها بر روی انسان از جمله زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک، استفاده از مدل‌های حیوانی مناسب از این سندرم، جهت کسب اطلاعات بیش‌تر در رابطه با اختلالات همراه شده با این سندرم می‌تواند کمک کننده باشند. در طول سال‌های گذشته گروه تحقیقاتی ما، یک مدل موش صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک تولید کرده است که اختلالات تولیدمثلی و متابولیکی از جمله سطوح بالای تستوسترون، تشکیل کیست‌های تخمدانی، کاهش تخمک‌گذاری، افزایش مقاومت به انسولین و افزایش

وزن بدن را مشابه آن چه که در زنان مبتلا به این سندرم مشاهده می شود را نشان داده است (16). هدف ما از انجام مطالعه حاضر، مقایسه میزان تحمل قلب در برابر آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن در مدل موش های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک و موش های صحرایی سالم (گروه کنترل) است.

مواد و روش ها

تأییدیه اخلاق

در مطالعه حاضر، مراقبت و نگهداری از حیوانات مطابق با اصول و استانداردهای نگهداری حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت. انجام این طرح تحقیقاتی توسط کمیته اخلاق پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با شماره RIES;10ECRIES93/10/23 مورد تأیید قرار گرفت و تمام اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شدند.

حیوانات و شرایط نگهداری

16 سر موش صحرایی ماده (در محدوده وزنی 170-190 گرم و محدوده سنی 95-75 روز) از مرکز حیوانات پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (تهران، ایران) تهیه شدند. هر یک جفت موش صحرایی نر و ماده به صورت جداگانه در یک قفس پلی اتیلن به مدت یک شبانه روز در شرایط استاندارد و مناسب برای نگهداری حیوانات آزمایشگاهی (چرخه نوری، 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی، دمای کنترل شده 22 ± 3 درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی 45-55 درصد) نگهداری شدند.

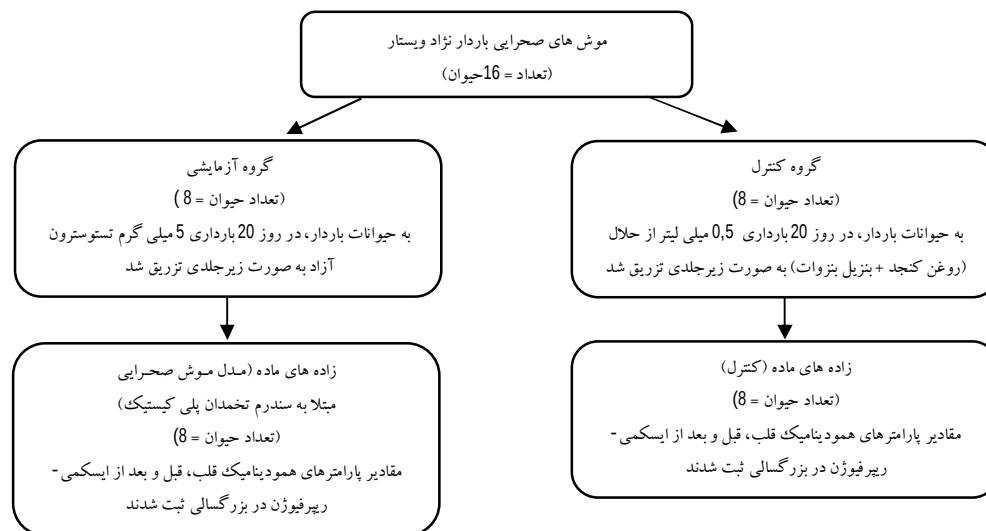
مشاهده پلاگ واژنی (واژینال پلاگ) پس از جفت گیری، به عنوان اولین روز حاملگی در نظر گرفته شد. موش های صحرایی باردار به طور تصادفی به دو گروه آزمایشی و کنترل تقسیم شدند (8 سر حیوان در هر گروه).

تولید مدل موش صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک

به منظور تولید مدل موش صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک، همان طور که در مطالعه قبلی مان گزارش شده است (16)، در گروه آزمایشی به موش های صحرایی باردار در روز 20 بارداری، 5 میلی گرم تستوسترون آزاد (T1500; Sigma, Germany) که در 500 میکرولیتر روغن کنجد (S3547; Sigma, Steinheim, Germany) و بنزیل بنزوات (B6630; Sigma, Germany) به نسبت 4 به 1 به عنوان حلال حل شده بود، به صورت زیر جلدی تزریق شد. در گروه کنترل به موش های صحرایی باردار فقط 500 میکرولیتر از حلال (روغن کنجد و بنزیل بنزوات با همان نسبت) (17) تزریق شد. پس از اتمام دوره شیرخوارگی، زاده های ماده جدا شده و در گروه های چهار تایی در هر قفس با دسترسی آزاد به آب و غذای کافی قرار گرفتند. زاده های ماده شامل، مدل موش صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک (زاده هایی که در دوره پیش از تولدشان در معرض تستوسترون قرار گرفته بودند) ($n=8$) و موش های صحرایی کنترل ($n=8$) بین 110 تا 120 روزگی (حیوانات بالغ) برای بررسی عملکرد قلب (اندازه گیری پارامترهای همودینامیکی قلب)، قبل و بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن به منظور مقایسه مقاومت قلب در برابر آسیب ناشی از ایسکمی - ریپرفیوژن مورد آزمایش قرار گرفتند (تصویر شماره 1).

جدا سازی سرم خون و سنجش سطوح هورمون تستوسترون

وزن بدن موش های صحرایی بالغ در هر دو گروه شامل مدل حیوانی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک و حیوانات کنترل اندازه گیری شد که محدوده وزن بدن آن ها 180-200 گرم بود.



تصویر شماره 1: نمودار مطالعه. پارامترهای همودینامیک قلب شامل: فشار سیستولی بطن چپ (LVSP: Left ventricular systolic pressure)، ضربان قلب (HR: Heart rate)، حداکثر میزان افزایش فشار بطن چپ در طول سیستول (dp/dt: Maximum rate of rise in the left ventricular pressure during systole)، حداکثر میزان کاهش فشار بطن چپ در طول دیاستول (dp/dt: Maximum rate of reduction in pressure during diastole)، فشار تکاملی یا توسعه ای در بطن چپ (LVDP: Left ventricular developed pressure).

اندازه گیری پارامترهای همودینامیکی قلب، قبل و بعد از القاء ایسکمی - ریپرفیوژن

پس از جمع آوری نمونه خون، قلب هر حیوان به سرعت جدا شده و در محلول کربس - هنسلیت سرد و خنثی (pH=7/4) به منظور جلوگیری از هر آسیبی قرار گرفت. سپس هر قلب در دستگاه لانگندورف (ADInstruments, Australia) قرار گرفت و در یک جریان رتروگرید (برگشت دهنده) در آنورت، با فشار ثابت (75 mmHg) توسط بافر کربس - هنسلیت، پرفیوژن قلب صورت گرفت (18). محلول پرفیوژن با مخلوطی از 95 درصد O₂ و 5 درصد CO₂ با pH=7/4 در دمای 37 درجه سانتی گراد تغذیه شد و یک بالن از جنس لاتکس که با آب مقطر پر شده بود به مبدل فشار متصل شد. از طرف دیگر از طریق یک برش کوچک که در دهلیز چپ ایجاد شد، بالن در داخل بطن چپ قرار گرفت تا یک فشار در محدوده 10-5 میلی متر جیوه (LVEDP¹) برای اندازه گیری فشار بطن چپ (LVP²)، فشار سیستولی

حیوانات با استفاده از تزریق داخل صفاقی پنتوباریتال سدیم (60 میلی گرم به ازاء 1 کیلوگرم وزن بدن)، (P3761; 5 g; Sigma, St Louis, MO, USA) بیهوش شدند، 15 دقیقه قبل از تزریق داروی بیهوشی نیز سدیم هپارین (500 واحد به ازای 1 کیلوگرم وزن بدن) به صورت داخل صفاقی به حیوانات در هر دو گروه تزریق شد. پس از بیهوشی کامل حیوان و باز کردن شکم، نمونه خون هر حیوان به منظور سنجش سطوح تستوسترون از آنورت شکمی جمع آوری گردید. نمونه خون در دور چرخشی 6000 g، به مدت 5 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد و جداسازی سرم خون انجام شد و تا زمان مناسب برای سنجش هورمون تستوسترون در فریزر -80 درجه سانتی گراد نگهداری شد. سطوح سرمی تستوسترون توسط کیت الایزا (Testosterone, ELISA, Diagnostics Biochem Canada) (Inc., Ontario, Canada, Sensitivity: 0/022 ng/ml) اندازه گیری شد. ضریب درون آزمونی تغییرات برای هورمون تستوسترون کم تر از 10 درصد بود.

1. LVEDP: Left ventricular end-diastolic pressure
2. LVP: Left ventricular pressure

بطن چپ ($LVSP^3$)، ضربان قلب (HR)، حداکثر میزان افزایش فشار بطن چپ در طول سیستول ($+dp/dt^4$)، حداکثر میزان کاهش فشار بطن چپ در طول دیاستول ($-dp/dt^5$)، و برای محاسبه تکامل یا توسعه فشار در بطن چپ ($LVDP^6$) را ایجاد کند و همچنین بتوانیم میزان محصول فشار ($RPP^7 = HR \times LVDP$) را محاسبه نماییم (19، 20).

پس از تثبیت فعالیت قلب در دستگاه لانگندورف و ثبت پارامترهای همودینامیکی قلب توسط سیستم پاورلب، سطوح پایه این پارامترهای همودینامیکی شامل ($LVEDP$, $LVSP$, $LVDP$, $\pm dp/dt$, HR and RPP) ثبت شدند و محلول پرفیوژن به منظور ایجاد ایسکمی گلوبال (ایسکمی در کل قلب) برای 30 دقیقه قطع شد و پس از آن ریپرفیوژن آغاز شد و به مدت 60 دقیقه ثبت پارامترهای همودینامیک بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن انجام شد. در طول مدت ریپرفیوژن تمام پارامترهای همودینامیکی هر 15 دقیقه توسط سیستم پاورلب ثبت شدند (Power Lab, AD instrument, Australia).

درجه حرارت (37 ± 0.5 سانتی گراد) و رطوبت محیط اطراف قلب، توسط یک محفظه شیشه‌ای در طول انجام آزمایش ثابت نگه داشته شد.

محلول کربس - هنسلیت با غلظت میلی مولار طبق فرمول زیر تهیه شد:

115 NaCl; 4/6 KCl; 2/5 CaCl₂; 1/6 MgSO₄; 1/2KH₂PO₄; 25 NaHCO₃; 11/1glucose

(شرکت مرک، آلمان)، متعادل شده با 5% O₂ 95% CO₂ (pH=7/4).

در زمان جراحی (خونگیری و جداسازی قلب)، موش‌های صحرایی در هر دو گروه در فاز استروس بودند که تعیین فاز سیکل جنسی توسط اسمیر تهیه شده از ترشحات واژن تأیید شد. جمع‌آوری ترشحات واژن توسط

یک سواب استریل انجام شد به این صورت که سواب به آرامی دو یا سه مرتبه در داخل واژن چرخانده شد و سپس سر سواب بر روی یک لام شیشه‌ای تمیز کشیده شد و در معرض هوا خشک گردید. لام‌ها با استفاده از رنگ گیمسا به مدت 45 دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و با میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی 100) مورد بررسی قرار گرفتند. فازهای سیکل استروس بر اساس نسبت سه نوع سلول (سلول‌های اپی‌تلیال (پوششی) هسته دار، سلول‌های اپی‌تلیال بدون هسته (شاخی شده) و لوکوسیت‌ها) مشاهده شده در اسمیر واژنی، مشخص شدند (21).

آسیب سلول‌های عضله قلب

به منظور بررسی آسیب عضله قلب، مایعات خارج شده از کروئور، قبل از ایسکمی و پس از القاء ایسکمی (10 دقیقه اول از ریپرفیوژن) جمع‌آوری شدند و سطوح لاکتات دهیدروژناز (LDH: Lactate dehydrogenase) به روش اسپکتروفوتومتری با استفاده از کیت LDH (شرکت پارس آزمون - ایران) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. برای نشان دادن روند تغییرات برای هر متغیر، پلات میانگین‌ها برای هر متغیر بر اساس مبتلا بودن به سندرم تخمدان پلی کیستیک یا عدم ابتلا به آن (حیوانات گروه کنترل) و مرحله مطالعه (قبل از ایسکمی و 15، 30، 45 و 60 دقیقه بعد از ایسکمی) رسم شدند. در ابتدا برای ارزیابی کردن اثر ابتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک بودن یا نبودن بر روی پارامترهای همودینامیک قلب، قبل از ایسکمی، مدل رگرسیون خطی تعمیم یافته (GLM) بکار برده شد. سپس از آن جایی که پس از ایسکمی 4 نقطه زمانی 15، 30، 45 و 60 دقیقه وجود دارند برای ارزیابی کردن اثر ابتلا به سندرم یا عدم ابتلا به آن، قبل و بعد از القاء ایسکمی از مدل معادلات برآورد تعمیم یافته (GEE) استفاده شد. برای مقایسه نتایج سطوح تستوسترون و لاکتات دهیدروژناز بین دو گروه از آزمون t-student استفاده شد.

1. LVSP: Left ventricular systolic pressure

2. $+dp/dt$: Maximum rate of rise in the left ventricular pressure during systole

3. dp/dt : Maximum rate of reduction in pressure during diastole

4. LVDP: Left ventricular developed pressure

5. RPP: Rate pressureproduct

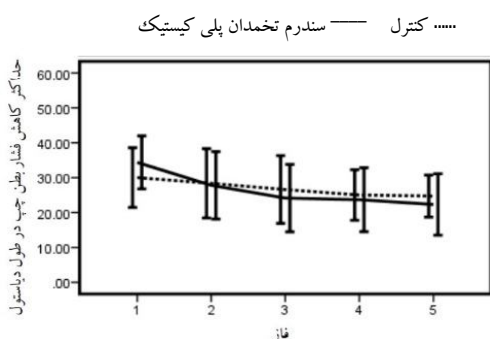
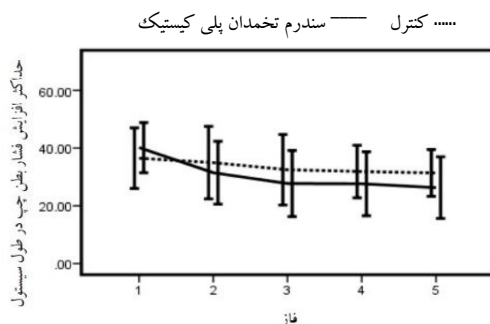
یافته ها

سطوح تستوسترون

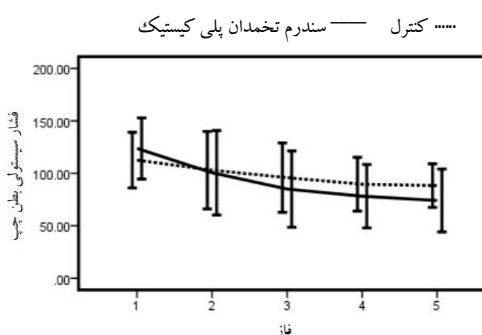
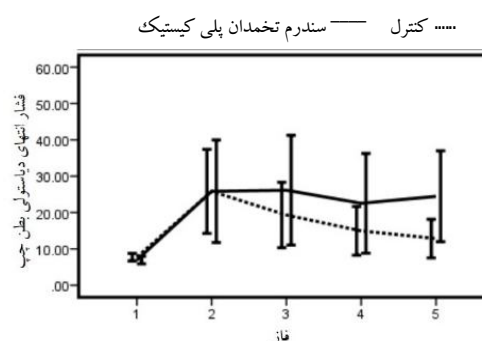
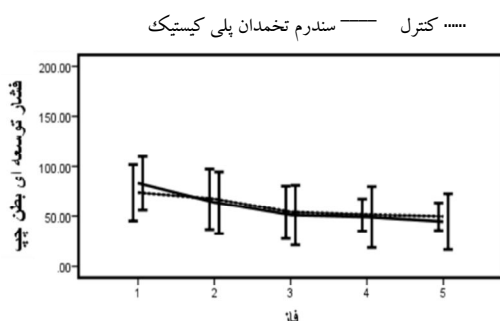
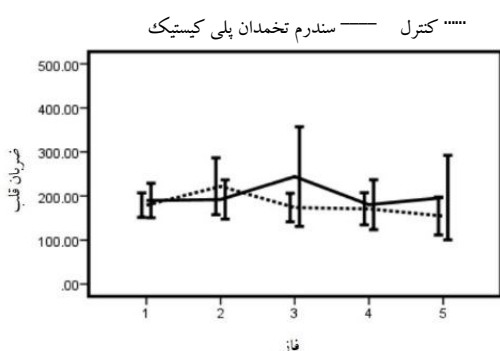
سطوح تستوسترون در سرم خون مدل موش های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک در مقایسه با موش های صحرایی گروه کنترل (سالم) افزایش یافته بود ($1/02 \pm 0/09$ در گروه کنترل و $1/26 \pm 0/08$ در گروه PCOS)، اگرچه این افزایش از نظر آماری معنی دار نبود.

شاخص های قلبی

تصاویر شماره 2-4 روند میانگین ها و 95 درصد فاصله اطمینان برای شاخص های قلبی را با توجه به مرحله مطالعه (قبل از ایسکمی و 15، 30، 45 و 60 دقیقه بعد از ایسکمی) و مبتلا بودن به سندرم تخمدان پلی کیستیک یا عدم ابتلا به آن را نشان می دهند.



تصویر شماره 3: حداکثر افزایش فشار بطن چپ در طول سیستمول ($+dp/dt$) و حداکثر کاهش فشار بطن چپ در طول دیاستول ($-dp/dt$)، در مراحل مختلف مطالعه در وضعیت PCOS در زیرگروه ها (در هر گروه $n=8$). از آنالیز مدل معادلات برآورد تعمیم یافته (GEE) به منظور بررسی تفاوت بین PCOS (ابتلا یا عدم ابتلا به این سندرم) و مراحل قبل از ایسکمی و 15، 30، 45 و 60 دقیقه پس از ایسکمی) استفاده شد.



تصویر شماره 2: فشار سیستمولی بطن چپ (LVSP) و فشار انتهای دیاستولی بطن چپ (LVEDP) در مراحل مختلف مطالعه در وضعیت PCOS در زیرگروه ها (در هر گروه $n=8$). برای تعیین تفاوت بین مراحل (قبل از ایسکمی و 15، 30، 45 و 60 دقیقه پس از ایسکمی) از آنالیز مدل معادلات برآورد تعمیم یافته (GEE) استفاده شد.

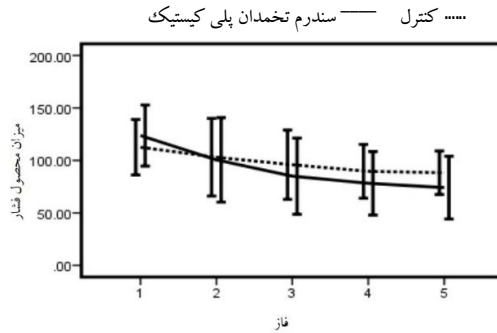
حداکثر میزان افزایش فشار بطن چپ در طول سیستول و حداکثر میزان کاهش فشار بطن چپ در طول دیاستول افزایش نشان دادند. اگرچه این افزایش‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود.

شاخص‌های قلبی پس از ایسکمی - ریپرفیوژن

جدول شماره 2، مقایسه نتایج پس از ایسکمی - ریپرفیوژن (در چهار نقطه زمانی 15، 30، 45 و 60 دقیقه پس از ایسکمی - ریپرفیوژن) را با قبل از ایسکمی - ریپرفیوژن را که از آنالیز GEE بدست آمده را نشان می‌دهد. روند کاهشی در پارامترهای همودینامیک قلب در مدل موش صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد، اگرچه این اختلاف از نظر آماری معنی‌داری نبود.

آسیب عضله قلب

در مطالعه حاضر به منظور بررسی آسیب سلول‌های عضله قلب، سطوح LDH قبل از ایسکمی و پس از ایسکمی - ریپرفیوژن در مایعات خارج شده کرونری اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در جدول شماره 3 مشاهده می‌شود، سطوح LDH در موش‌های صحرایی در هر دو گروه پس از ایسکمی - ریپرفیوژن در مقایسه با قبل از ایسکمی افزایش پیدا کرد، اگرچه سطوح این آنزیم در مدل موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و موش‌های صحرایی گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. به‌طوری‌که قبل از آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن میزان آن در گروه کنترل $115/54 \pm 13/50$ و در موش‌های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک به $118/02 \pm 12/87$ افزایش یافت. پس از آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن نیز میزان آن در گروه کنترل $279/48 \pm 26/42$ و در موش‌های صحرایی مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک نیز به $334/73 \pm 25/57$ افزایش یافت (جدول شماره 3).



تصویر شماره 4: تکامل یا توسعه فشار در بطن چپ (LVDP)، ضربان قلب (HR)، و میزان محصول فشار در مراحل مختلف مطالعه براساس وضعیت PCOS (در هر گروه $n=8$). برای تعیین تفاوت‌های بین وضعیت PCOS (ابتلا یا عدم ابتلا به این سندرم) و مراحل (قبل از ایسکمی و 15، 30، 45 و 60 دقیقه پس از ایسکمی) از آنالیز مدل معادلات برآورد تعمیم یافته استفاده شد.

شاخص‌های قلبی در حالت پایه (قبل از ایسکمی - ریپرفیوژن) در مدل موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با گروه کنترل، تکامل یا توسعه فشار در بطن چپ، ضربان قلب، میزان محصول فشار، حداکثر میزان افزایش فشار بطن چپ در طول سیستول و حداکثر میزان کاهش فشار بطن چپ در طول دیاستول افزایش نشان دادند. اگرچه این افزایش‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبودند (جدول شماره 1).

جدول شماره 1: مقایسه مقادیر پارامترهای همودینامیک قلب، قبل از I/R (در حالت پایه) در مدل موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و کنترل: نتایج حاصل از مدل GLM

Sqit (-dp/dt)	Sqit (+dp/dt)	Sqit (RPP)	HR	LVDP	LVEDP	Sqit (LVSP)
4 (-4, 12)	4 (-6, 13)	11 (-21, 44)	11 (-30, 51)	9 (-22, 41)	-08 (-20, 6)	04 (-1, 2)

نتایج از مدل رگرسیون خطی تعمیم یافته:

LVSP: فشار سیستولی بطن چپ، LVEDP: فشار بطن چپ در انتهای دیاستول، LVDP: تکامل یا توسعه فشار در بطن چپ، HR: ضربان قلب، RPP: میزان محصول فشار بطن چپ، $+dp/dt$: حداکثر میزان افزایش فشار بطن چپ در طول سیستول، $-dp/dt$: حداکثر میزان کاهش فشار بطن چپ در طول دیاستول (تعداد حیوان در هر گروه 8 سر).

در مدل موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با گروه کنترل، تکامل یا توسعه فشار در بطن چپ، ضربان قلب، میزان محصول فشار،

بحث

مطالعه حاضر نشان داد، علی‌رغم آسیب بیش‌تر و اختلال در عملکرد قلب (پارامترهای همودینامیکی قلب) به دنبال ایسکمی - ریپرفیوژن در قلب مدل موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با موش‌های صحرایی سالم (کنترل)، این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود و تفاوت معنی‌داری بین دو گروه از حیوانات مشاهده نشد. به عبارت دیگر، مقاومت قلب در برابر آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن در مدل موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و موش‌های صحرایی کنترل، تقریباً مشابه بوده است.

آندروژن‌ها نقش مهمی را در سیستم قلبی - عروقی بازی می‌کنند و به عنوان هورمون‌های تنظیم‌کننده قلب در نظر گرفته می‌شوند که اثرات زیستی‌شان را از طریق گیرنده‌هایی که بر روی سلول‌های قلبی دارند اعمال می‌کنند (22). هیپراندرونیسم از نظر بیوشیمیایی در PCOS با افزایش غلظت تستوسترون سرم و افزایش نسبت تستوسترون به (SHBG (Sex Hormone Binding Globulin، شناخته شده و به عنوان شاخص آندروژن آزاد (FAI: free androgen index) مشخص می‌شود (23). در مطالعه حاضر نیز سطوح تستوسترون در سرم خون مدل موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با موش‌های صحرایی گروه کنترل افزایش نشان داد (اگرچه به لحاظ آماری معنی‌دار نبود) و از طرف دیگر میزان آسیب قلبی بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن در این مدل حیوانی PCOS در مقایسه با حیوانات گروه کنترل بیش‌تر بود اگرچه این تفاوت نیز معنی‌دار نبوده است. با این‌که در برخی از مطالعات اثرات مثبت آندروژن‌ها بر روی سیستم قلبی - عروقی گزارش شده است، اما در برخی از مطالعات دیگر اثرات مخرب و زیانبار این هورمون‌ها بر روی سیستم قلبی - عروقی نیز گزارش شده است (14). برخی از مطالعات قلبی نشان داده‌اند که تستوسترون می‌تواند به‌طور منفی عملکرد قلب را در مدل انفارکتوس میوکارد یا در قلبی که در

جدول شماره 2: مقایسه مقادیر پارامترهای همودینامیک قلب بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن) را با قبل از ایسکمی - ریپرفیوژن (حالت پای) در مدل موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و موش‌های صحرایی سالم (کنترل)

پارامتر	فاز معادله	مدل موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک در مقایسه با موش‌های صحرایی کنترل
Sqrt (LVSP)	15 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-0.6 (-25, 14)
	30 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-0.1 (-16, 13)
	45 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-0.2 (-18, 15)
	60 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-0.1 (-16, 14)
LVDP	قبل از ایسکمی - ریپرفیوژن	دفرانس
	15 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-13 (-57, 32)
	30 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-12 (-52, 28)
	45 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-11 (-51, 28)
Sqrt (RPP)	60 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-14 (-52, 24)
	قبل از ایسکمی - ریپرفیوژن	دفرانس
	15 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-14 (-63, 36)
	30 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-22 (-65, 21)
Sqrt (+dp/dt)	45 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-23 (-59, 14)
	60 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-25 (-61, 10)
	قبل از ایسکمی - ریپرفیوژن	دفرانس
	15 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-7 (-22, 8)
Sqrt (-dp/dt)	30 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-9 (-23, 6)
	45 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-8 (-21, 5)
	60 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-9 (-22, 4)
	قبل از ایسکمی - ریپرفیوژن	دفرانس
HR	15 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-5 (-18, 8)
	30 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-7 (-18, 5)
	45 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-6 (-16, 5)
	60 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-7 (-17, 4)
LVEDP	قبل از ایسکمی - ریپرفیوژن	دفرانس
	15 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-41 (-108, 27)
	30 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	60 (-31, 150)
	45 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	-1 (-56, 54)
LVDP	60 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	31 (-47, 110)
	قبل از ایسکمی - ریپرفیوژن	دفرانس
	15 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	1 (-14, 16)
	30 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	8 (-7, 22)
LVDP	45 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	8 (-4, 21)
	60 دقیقه بعد از ایسکمی - ریپرفیوژن	12 (1, 24)*
	قبل از ایسکمی - ریپرفیوژن	دفرانس

نتایج از مدل برآورد معادلات تعمیم یافته (GEE).

I/R: ایسکمی ریپرفیوژن، LVSP: فشار سیستولی بطن چپ، LVEDP: فشار بطن چپ در انتهای دیاستول، LVDP: تکامل یا توسعه فشار در بطن چپ، HR: ضربان قلب، RPP: میزان محصول فشار بطن چپ، dp/dt: حداکثر میزان افزایش فشار بطن چپ در طول سیستول، dp/dt: حداکثر میزان کاهش فشار بطن چپ در طول دیاستول (تعداد حیوان در هر گروه 8 سر). * سطوح معنی‌دار = $P < 0.05$

جدول شماره 3: سطوح LDH در مایعات خارج شده کرونری در مدل موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک و کنترل‌ها قبل (حالت پایه) و پس از ایسکمی - ریپرفیوژن

گروه‌ها	موش‌های صحرایی کنترل	مدل موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (تعداد=8 سر)
مغیر	قبل از ایسکمی ریپرفیوژن	بعد از ایسکمی ریپرفیوژن
LDH(U/L)	115/54 ± 13/50	279/4813 ± 26/42
	334/73 ± 25/67	18/02 ± 12/87

میانگین ± خطای استاندارد میانگین: t-student test

معرض ایسکمی - ریپرفیوژن قرار گرفته است را تحت تأثیر قرار دهد (14). نقش تستوسترون در اختلال عملکرد انقباضی قلب به دنبال آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن، ممکن است به چندین دلیل باشد که از جمله آن‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

کاهش پروتئین‌های مسیر محافظت‌کننده قلب مانند STAT-3⁸ و SOCS-3⁹ و همچنین کاهش فعال سازی Akt (Protein kinase B) در عضله قلب که منجر به کاهش فسفوریلاسیون BAD¹⁰ و کاهش سطوح Bcl-2 (anti-apoptosis) خواهد شد (14).

در مطالعه حاضر، برخی اثرات نامطلوب بر روی مقاومت قلب به دنبال آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن و مقدار آسیب قلبی بیش‌تر در مدل موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک در مقایسه با حیوانات گروه کنترل، می‌تواند به علت سطوح افزایش یافته آندروژن‌ها و برخی تأثیرات منفی این هورمون‌ها بر روی مقاومت قلب در این مدل حیوانی باشد. از سوی دیگر با توجه به این که جداسازی قلب حیوانات در هر دو گروه، در فاز استروس از سیکل جنسی انجام گرفته است، سطوح استروژن‌ها در این فاز در مقایسه با فازهای دیگر سیکل جنسی بالاتر است، این به نظر می‌رسد که تأثیرات مثبت استروژن‌ها در محافظت قلبی در برابر آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن در این گروه از حیوانات، غالب بوده است و تفاوت معنی‌داری در تحمل قلب در مقابل آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن بین دو گروه از حیوانات ایجاد نکرده است و به نظر می‌رسد که استروژن‌ها در این حیوانات قوی‌تر از آندروژن‌ها عمل کرده و تأثیرات مثبتی بر روی قلب و تحمل آن نسبت به آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن را اعمال کرده‌اند. اثرات محافظتی استروژن‌ها به واسطه گیرنده‌های استروژنی که در هسته سلول‌های قلبی وجود دارند اعمال می‌شود. استروژن‌ها می‌توانند باعث کاهش بار کلسیمی در طول ایسکمی - ریپرفیوژن

شوند که نتیجه آن کاهش آسیب بعد از ایسکمی می‌باشد که بخشی از آن ممکن است به علت افزایش بیان نیتریک اکساید سنتاز باشد (15). نیتریک اکساید که به واسطه نیتریک اکساید سنتاز تولید می‌شود می‌تواند تعدادی از ناقل‌های کلسیمی را تنظیم کند و کاهش ورود کلسیم به وسیله کانال‌های کلسیمی نوع L، منجر به کاهش بار کلسیم در طول ایسکمی می‌شود (15). به‌علاوه، استروژن‌ها می‌توانند نقش محافظتی‌شان را از طریق فعال‌سازی مسیر PI3AKT (phosphoinositide 3 kinase/Akt) و بسیاری از ژن‌های محافظت‌کننده قلب مانند پروتئین‌های شوک حرارتی، انجام دهند (۲۴، ۲۵). براساس مطالعات قبلی، تجویز استرادیول در حیوان‌های نر و ماده بالغی که غدد تولیدمثلی آن‌ها دست نخورده باقی مانده یا برداشته شده‌اند منجر به کاهش آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن شده است (26). به علاوه این نشان داده شده است که به دنبال انفارکتوس میوکارد، درصد بالاتری از زنانی که سنشان بزرگتر یا مساوی 40 سال بوده است در مقایسه با مردان همسن در طول یک سال پس از این ضایعه قلبی (انفارکتوس میوکارد) فوت شده‌اند، این یافته می‌تواند به علت کاهش سطوح استرادیول در زنان پس از یائسگی باشد که میزان تحمل قلبی آن‌ها در برابر آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن را کاهش داده است (27). استروژن موجب بهبود در عملکرد قلبی - عروقی، هموستاز کلسیم و مهار مسیر آپوپتوز میتوکندری می‌شود و اثرات مفیدی در ارتباط با بهبود آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن و همچنین کاهش انفارکتوس و ریکاوری پس از ایسکمی دارد. بر اساس مطالعات قبلی در آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن، استروژن‌ها موجب کاهش استرس اکسیداتیو، حفظ میتوکندری عضلات قلبی و کاهش انفارکتوس میوکارد می‌شوند (27). پاسخ وابسته به جنس به ایسکمی - ریپرفیوژن موجب تحمل استرس قلبی بالاتر، ریکاوری عملکرد بهتر قلبی و درصد بقا بالاتر در زنان، نسبت به مردان می‌شود (28). محرومیت از استروژن‌ها موجب حذف این اثرات محافظت‌کننده قلبی شده و بنابراین

1. STAT-3 : signal transducers and activators of transcription-3
2. SOCS-3 : suppression of the cytokine signaling 3
3. BAD : BCL2 associated agonist of cell death

محدودیت‌ها نیز وجود داشته‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به عدم سنجش برخی از عوامل التهابی، سطوح آنتی اکسیدان‌ها و سطوح استرادیول اشاره نمود. مطالعات کامل‌تری به منظور کشف مکانیسم‌های درگیر شده در عملکرد قلب به دنبال ایسکمی - ریپرفیوژن در سندرم تخمدان پلی کیستیک لازم می‌باشد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به‌طور خلاصه مطالعه حاضر نشان داد، عملکرد قلب به دنبال ایسکمی - ریپرفیوژن، در مدل موش‌های صحرایی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک در مقایسه با موش‌های صحرایی سالم (کنترل) ضعیف‌تر شده است، اگرچه این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود و تحمل قلب در مقابل آسیب ناشی از ایسکمی - ریپرفیوژن در هر دو گروه از حیوانات یکسان بود. این نتیجه ممکن است به علت اثرات محافظت‌کننده قلبی استروژن‌ها در این دو گروه از حیوانات ماده باشد، اگرچه تحقیقات بیش‌تر در این زمینه لازم می‌باشند.

استروژن‌ها نقش مهمی را در صدمات ناشی از ایسکمی - ریپرفیوژن بازی می‌کنند. یکی از شاخص‌های شناخته شده سمیت سلولی، LDH (یک نوع آنزیم سیتوزولی) است که به عنوان یکی از نشانگرهای تشخیص آسیب قلبی در نظر گرفته می‌شود. هنگامی که کاردیومیوسیت‌ها انواع مختلفی از آسیب‌ها، از جمله آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن که موجب اختلال عملکرد قلب می‌شود را متحمل می‌شوند، مقدار آن به میزان قابل توجهی افزایش پیدا می‌کند (12). در مطالعه ما نیز لاکتات دهیدروژناز افزایش یافت که این امر نشان‌دهنده ایجاد سمیت سلولی و در نتیجه آسیب قلبی است.

نقاط قوت و ضعف مطالعه

علی‌رغم این که مطالعه حاضر، یکی از اولین مطالعاتی است که تحمل قلب به دنبال آسیب ایسکمی - ریپرفیوژن را در مدل حیوانی مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک بررسی می‌کند، در این مطالعه برخی از

References

1. Chen X, Yang D, Mo Y, Li L, Chen Y, Huang Y. Prevalence of polycystic ovary syndrome in unselected women from southern China. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 139(1): 59-64.
2. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010; 25(2): 544-551.
3. Peppard HR, Marfori J, Iuorno MJ, Nestler JE. Prevalence of polycystic ovary syndrome among premenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24(6): 1050-1052.
4. Tehrani FR, Simbar M, Tohidi M, Hosseini F, Azizi F. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample of Iranian population: Iranian PCOS prevalence study. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 39.
5. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81(1): 19-25.
6. Escobar-Morreale HF. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14(5): 270-284.
7. Dunaif A, Book CB. Insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *Clinical research in diabetes and obesity. Contemporary Biomedicine book series (CB,15)*; 1997. p. 249-274.
8. Osibogun O, Ogunmoroti O, Michos ED. Polycystic ovary syndrome and cardiometabolic

- risk: Opportunities for cardiovascular disease prevention. *Trends Cardiovasc Med*. 2019.
9. Hausenloy DJ. Signalling pathways in ischaemic postconditioning. *Thromb Haemost* 2009; 101(4): 626-634.
 10. Silvestri P, Di Russo C, Rigattieri S, Fedele S, Todaro D, Ferraiuolo G, et al. MicroRNAs and ischemic heart disease: towards a better comprehension of pathogenesis, new diagnostic tools and new therapeutic targets. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2009; 4(2): 109-118.
 11. Gray C, Nukada H, Jackson DM, McMorran PD, Wu A, Ma F. Neuroprotective effects of nitron radical scavenger S-PBN on reperfusion nerve injury in rats. *Brain Res* 2003; 982(2): 179-185.
 12. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 2007; 59(4): 418-458.
 13. Thornburg KL. Foetal programming reveals the dark side of AT(2)R. *Cardiovasc Res* 2011; 89(2): 260-261.
 14. Pongkan W, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Roles of Testosterone Replacement in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2016; 21(1): 27-43.
 15. Murphy E, Steenbergen C. Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2007; 75(3): 478-486.
 16. Tehrani FR, Noroozadeh M, Zahediasl S, Piryaee A, Azizi F. Introducing a rat model of prenatal androgen-induced polycystic ovary syndrome in adulthood. *Exp Physiol* 2014; 99(5): 792-801.
 17. Salehi Jahromi M, Ramezani Tehrani F, Hill JW, Noroozadeh M, Zarkesh M, Ghasemi A, et al. Alteration in follistatin gene expression detected in prenatally androgenized rats. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 2017; 33(6): 433-437.
 18. Herr DJ, Aune SE, Menick DR. Induction and assessment of ischemia-reperfusion injury in langendorff-perfused rat hearts. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2015(101): e52908.
 19. Jeddi S, Zaman J, Ghasemi A. Effect of fetal hypothyroidism on tolerance to ischemia-reperfusion injury in aged male rats: Role of nitric oxide. *Nitric Oxide* 2016; 55-56:82-90.
 20. Ghanbari M, Jeddi S, Bagheripour F, Ghasemi A. The effect of maternal hypothyroidism on cardiac function and tolerance to ischemia-reperfusion injury in offspring male and female rats. *J Endocrinol Invest* 2015; 38(8): 915-922.
 21. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology* 2002; 62(4A): 609-614.
 22. Witayavanitkul N, Woranush W, Bupha-Intr T, Wattanapernpool J. Testosterone regulates cardiac contractile activation by modulating SERCA but not NCX activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 304(3): H465-472.
 23. Pinola P, Piltonen TT, Puurunen J, Vanky E, Sundstrom-Poromaa I, Stener-Victorin E, et al. Androgen Profile Through Life in Women With Polycystic Ovary Syndrome: A Nordic Multicenter Collaboration Study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2015; 100(9): 3400-3407.
 24. Fazal L, Azibani F, Vodovar N, Cohen Solal A, Delcayre C, Samuel JL. Effects of biological sex on the pathophysiology of the

- heart. British Journal of Pharmacology 2014; 171(3): 555-566.
25. Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, Baur J, Celestin F, Chen X, et al. 17 β -Estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling. Circulation Research 2004; 95(7): 692-699.
26. Korzick DH, Lancaster TS. Age-related differences in cardiac ischemia-reperfusion injury: effects of estrogen deficiency. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology 2013; 465(5): 669-685.
27. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, et al. Heart disease and stroke statistics—2011 update: a report from the American Heart Association. Circulation 2011; 123(4): e18-e209.
28. Fukumoto T, Yamashita N, Tawa M, Ohkita M, Matsumura Y. Sex Differences in Postischemic Cardiac Dysfunction and Norepinephrine Overflow in Rat Heart: The Role of Estrogen Against Myocardial Ischemia reperfusion Damage Via an NO-mediated Mechanism. Journal of Cardiovascular Pharmacology 2012; 60(3): 269-275.