



A novel isolated dual perfusion/superfusion heart model for physiological and pharmacological evaluation of mammalian heart preparations

Mohsen Naseri¹, Ali Mohammad Alizadeh^{2*}, Vahid Khor³, Sohrab Hajizadeh⁴, Saeed Khodayari⁵

1. Dept. of Pharmacology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

2. Cancer Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Golestan Cardiovascular Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

4. Dept. of Physiology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

5. Islamic Azad University, Tehran medical Branch, Tehran, Iran

Received: 29 May 2012

Accepted: 21 Sept 2012

Abstract

Introduction: Isolated perfused heart models such as perfusion and superfusion are commonly used for mammalian heart research. However, there are several fundamental limitations in the current techniques. In perfusion model, a suitable cannula is connected to the aorta and the perfusion is retrogradely performed. But, electrode displacement is a potential unwanted event resulted from heart contractions. In superfusion model, atrioventricular node (AV) node area is completely visible and fixed in the tissue bath after appropriate preparation, but tissue ischemia is inevitable due to the absence of cell to cell nutrition. The aim of the present study was to create a novel isolated dual perfusion/superfusion model to be used in heart physiological and pharmacological studies.

Methods: The rabbit hearts (n=10) were excised. After preparation of proper sections, the electrodes were attached till the steady state appeared. The stimulation protocols consisting Wenckebach and recovery were then carried out during the isolated dual perfusion/superfusion as well as perfusion and superfusion models.

Results: The AV node conduction time was increased from 33 ± 4 ms in the isolated dual perfusion/superfusion heart model to 43 ± 5 and 52 ± 5 ms in perfusion and superfusion models, respectively ($P < 0.05$). In addition, Wenckebach cycle length, effective and functional refractory periods were increased in perfusion and superfusion models compared to the isolated dual perfusion/superfusion model ($P < 0.05$).

Conclusion: This study shows the superiority of the isolated dual perfusion/superfusion heart model in tissue nutrition compared to the other common methods of mammalian heart studies.

Key words: Heart, atrioventricular node, perfusion, superfusion

* Corresponding author e-mail: aalizadeh@razi.tums.ac.ir

Available online at: www.phypha.ir/ppj

مدل دوگانه پرفیوژن/سوپرفیوژن قلب ایزوله، روش جدید برای مطالعات فیزیولوژیک و فارماکولوژیک گستره قلب پستانداران

محسن ناصری^۱، علی محمد علیزاده^{۲*}، وحید خوری^۳، سهراب حاجی زاده^۴، سعید خدایاری^۵

۱. گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران

۲. مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

۳. مرکز تحقیقات قلب و عروق گلستان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان

۴. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۵. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران، تهران

پذیرش: ۳۱ شهریور ۹۱

دریافت: ۹ خرداد ۹۱

چکیده

مقدمه: روش‌های قلب ایزوله نظیر پرفیوژن و سوپرفیوژن، بطور معمول جهت مطالعات فیزیولوژیک و فارماکولوژیک قلب پستانداران استفاده می‌گردد. در روش پرفیوژن، با جاگذاری کاتول مناسب در آئورت، قلب از طریق پرفیوژن رتروگرا تغذیه می‌گردد اما امکان آسیب بافتی، با جابجایی الکترودها در نتیجه انقباضات قلبی وجود دارد. در سوپرفیوژن، با ایجاد برش‌های مناسب، گره دهلیزی- بطنی بصورت گستره در حمام بافتی قرار گرفته و الکتروگذاری در نهایت دقت صورت می‌گیرد اما در نتیجه تغذیه بافت از طریق انتشار سلول به سلول، امکان ایسکمی بافتی وجود دارد. هدف مطالعه حاضر، ایجاد روش جدید پرفیوژن/سوپرفیوژن قلب ایزوله، برای مطالعات فیزیولوژیک و فارماکولوژیک گستره قلب پستانداران می‌باشد.

روش‌ها: قلب ۱۰ سر خرگوش سفید نر پس از خارج کردن با انجام برشهای مناسب در حمام بافتی قرار داده شدند. پس از پایداری بافت و الکتروگذاری، پروتکل‌های ونکه باخ و ریکاوری با روش‌های تغذیه دوگانه، پرفیوژن و سوپرفیوژن اجرا گردیدند.

یافته‌ها: زمان هدایت در گره دهلیزی- بطنی در روش تغذیه دوگانه از 33 ± 4 میلی ثانیه به 43 ± 5 و 52 ± 5 میلی ثانیه به ترتیب در پرفیوژن و سوپرفیوژن افزایش یافت ($P < 0.05$). به علاوه طول موج ونکه باخ، دوره تحریک ناپذیری موثر و کارکردی در روش‌های پرفیوژن و سوپرفیوژن نسبت به روش تغذیه دوگانه افزایش یافته بود ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر بیانگر برتری روش جدید تغذیه دوگانه از نظر تغذیه و اکسیژن رسانی نسبت به سایر روش‌های موجود در مطالعات گره دهلیزی- بطنی قلب خرگوش می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: قلب، گره دهلیزی- بطنی، پرفیوژن، سوپرفیوژن

مقدمه

قلب است که تحریک الکتریکی را بطور طبیعی از دهلیز به بطن عبور می‌دهد. کسر بزرگی از تأخیر ایмпالس بین دهلیز و بطن در گره دهلیزی- بطنی اتفاق می‌افتد. این تأخیر فرصت کافی جهت پرشدگی بطن‌ها را فراهم می‌کند. دوره تحریک ناپذیری نسبتاً طولانی گره دهلیزی- بطنی، از پاسخدهی بطن‌ها به تحریک‌های اضافی دهلیز جلوگیری می‌کند.

گره دهلیزی - بطنی یک جزء کلیدی در فعالیت الکتریکی

aalizadeh@razi.tums.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

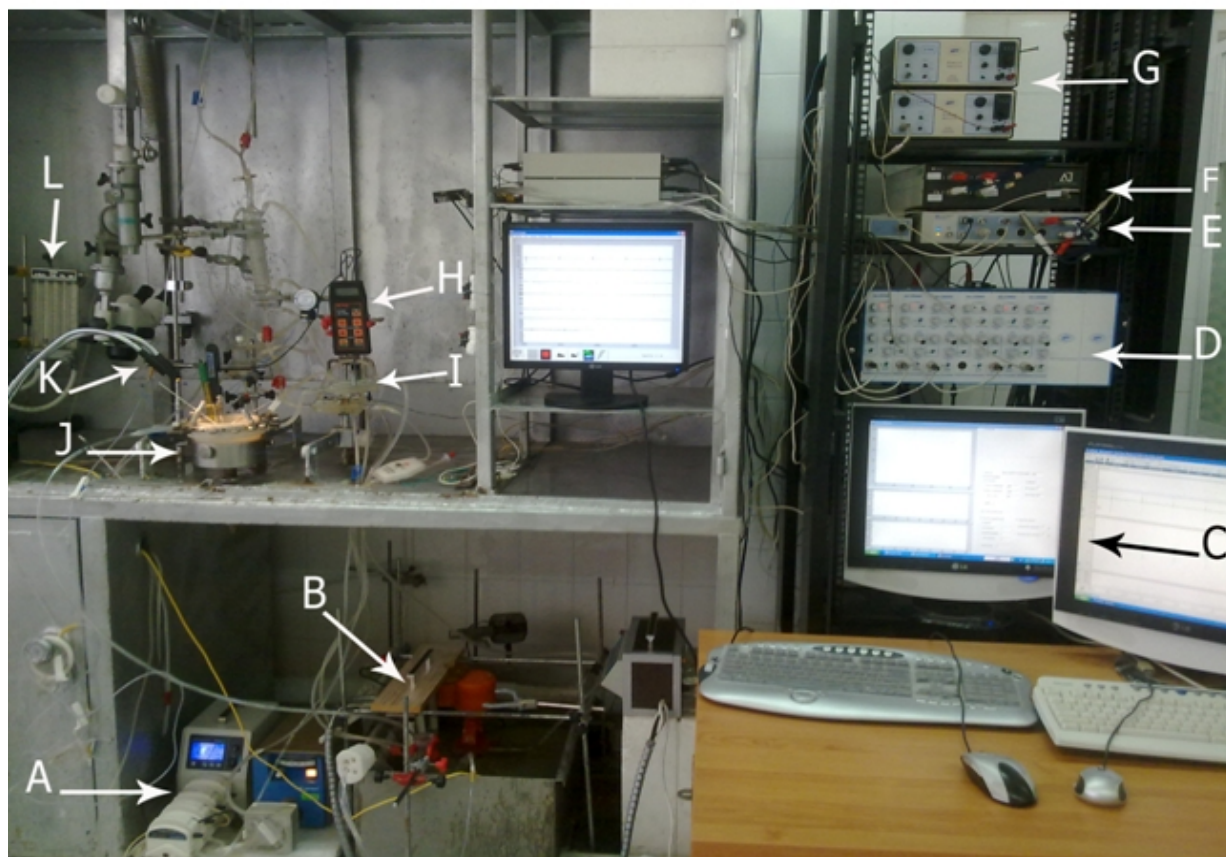
بطنی، جهت ابداع روش جدید پرفیوژن/سوپرفیوژن قلب ایزوله، برای مطالعات فیزیولوژیک و فارماکولوژیک در گستره قلب پستانداران می‌باشد.

مواد و روش ها

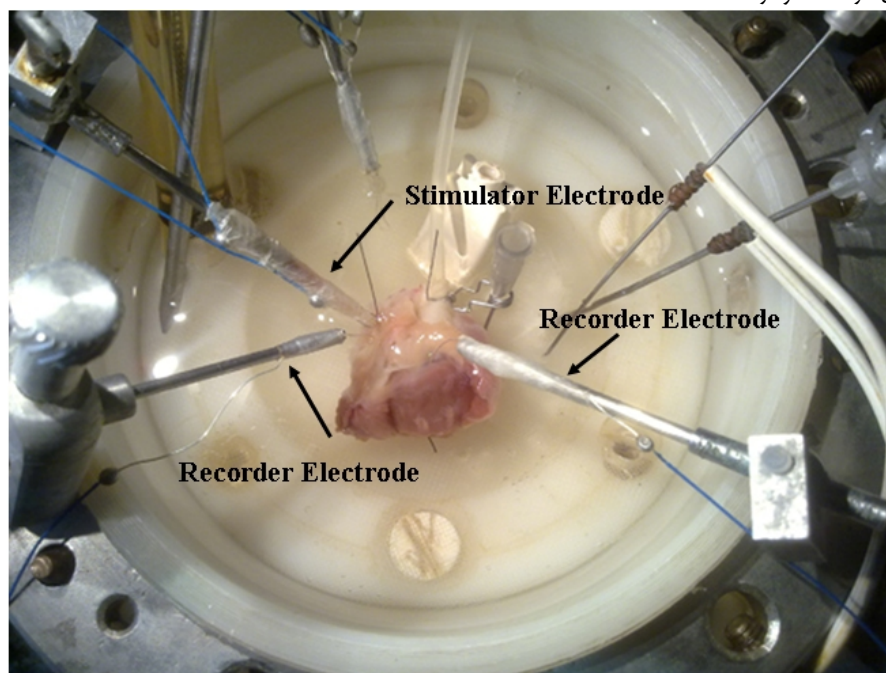
مطالعه حاضر بر روی قلب ۱۰ سر خرگوش سفید نر (تهیه شده از موسسه تحقیقات پاستور) با وزن ۱/۵ تا ۲ کیلوگرم و نگره‌داری در دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۰ درصد و با ۱۲ ساعت سیکل روشنایی- تاریکی انجام شد. کلیه اصول اخلاقی مطالعه مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی و مطالعات انسانی مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. نگهداری حیوانات، بیهوشی، جراحی، قرار دادن نمونه در محفظه گستره بافتی مطابق مطالعات گذشته انجام گرفته است [۱۹، ۱۴]. کلیه حیوانات پنتوباریتال سدیم به مقدار ۳۵ میلی گرم بر کیلوگرم از طریق ورید گوش جهت بیهوشی و هپارین به عنوان ضد انعقاد ۲۰۰ واحد بر هر کیلوگرم دریافت نمودند. پس از بیهوشی، قفسه سینه حیوان را از دو طرف باز و قلب حیوان جدا کرده و در محلول تیروید ۴ درجه قرار می‌گرفت. سپس قلب را از ناحیه آئورت با کانول مناسب به منظور جلوگیری از پیچ خوردن آئورت و ثابت نمودن بافت بصورت افقی، وصل کرده و تغذیه بافت از طریق کانول قرار داده شده در آئورت و با محلول تیروید و گاز کربوژن (۹۵ درصد اکسیژن و ۵ درصد دی اکسید کربن) انجام می‌گردید. برشهای لازم جهت جدا کردن قسمتهای اضافی داده شده و نمونه نهایی شامل آئورت، دهلیزهای راست و چپ، ناحیه گره دهلیزی - بطنی و قسمت تحتانی سپتوم بین بطنی می‌باشند. سپس برش مناسب در ناحیه دهلیز راست، جهت در معرض دید قرار دادن ناحیه گره دهلیزی- بطنی برای الکتروگذاری ایجاد و در نهایت بافت در گستره حمام بافتی با استفاده از پین‌های مناسب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، فشار ۵۵-۶۵ میلی‌متر جیوه و $PH = 7.35 - 7.45$ ثابت می‌گردید. همچنین بافت علاوه بر پرفیوژن، از طریق سوپرفیوژن با سرعت ۲۰۰ میلی لیتر بر دقیقه و حجم ۶ لیتر در یک مدار بسته تغذیه می‌گردید (شکل ۱). ترکیب تیروید بر حسب میلی مولار شامل: $NaCl(128)$, $KCl(4/7)$, $CaCl_2(2)$, $MgCl_2(1)$.

انگیزه و اقدام برای پرفیوژن ارگانهای ایزوله اولین بار در سال ۱۸۴۷ توسط Call Luding صورت گرفت [۲۰]. در ادامه نگهداری بافت قلب (Frog) بدون شریانهای کرونری برای مدت طولانی در سال ۱۸۶۶ توسط Elias Cyon انجام شد [۵]. سپس پرفیوژن ارگانهای قلب و ریه ایزوله پستانداران، توسط Neely [۲۶] در سال ۱۸۶۷، Bowditch [۳] در سال ۱۸۷۱ و Martin [۲۱] در سال ۱۸۸۳ توسعه پیدا نمود و سرانجام پرفیوژن قلب ایزوله رت توسط لانگندورف بین سالهای ۱۸۹۵ تا ۱۹۰۳ تکمیل گردید [۱۸، ۱۹].

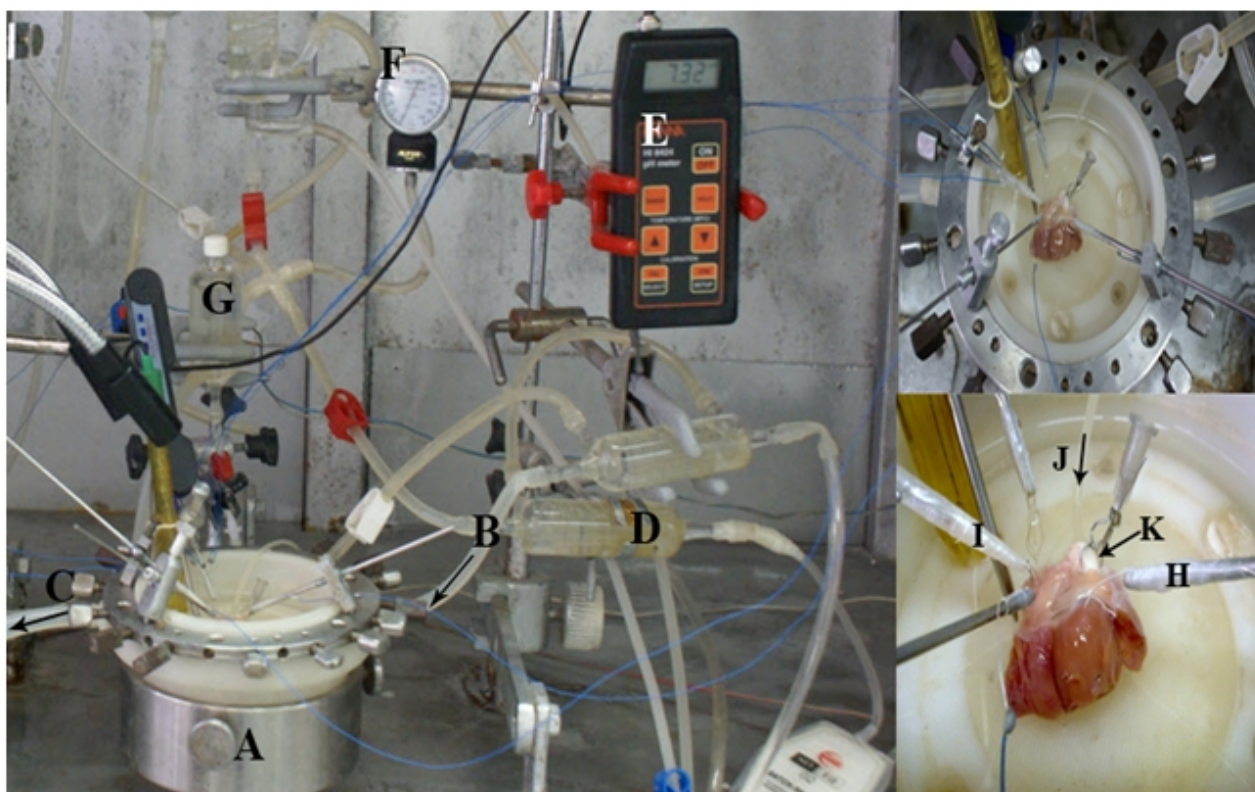
روشهای مختلفی مانند پرفیوژن (لانگندورف) و سوپرفیوژن (گره دهلیزی- بطنی ایزوله)، جهت مطالعه گره دهلیزی- بطنی قلب وجود دارد که هر یک دارای مزایا و معایبی می‌باشند. در روش پرفیوژن با جاگذاری کانول مناسب در آئورت، قلب از طریق شریانهای کرونری، با پرفیوژن رتروگراژ تغذیه می‌گردد. این روش برای اولین بار جهت اندازه گیری قدرت انقباضی قلب بکار گرفته شد [۱۹] و بعداً توسط Gottlieb و Heymans تکمیل گردید [۹، ۶]. با توجه به اینکه قلب در این روش از طریق پرفیوژن رتروگراژ شریانهای کرونری تغذیه می‌گردد، بافت مورد نظر از ایسکمی مصون می‌ماند. اما ایراد عمده این روش اینکه، الکتروگذاری از سطح خارجی قلب بر اساس مختصات تشریحی صورت گرفته و احتمال جابه‌جایی الکترودها در نتیجه انقباضات قلبی وجود دارد. روش سوپرفیوژن در مطالعه گره دهلیزی بطنی اولین بار توسط Hoffman طراحی شده است [۱۰] و سپس توسط Janse و Billette تکمیل گردید [۲، ۱۱]. مزیت این روش اینکه، مختصات گره دهلیزی- بطنی با توجه به برشهای ایجاد شده در معرض دید کامل قرار گرفته و الکتروگذاری در نهایت دقت صورت می‌گیرد [۴، ۷، ۱۲، ۲۳، ۲۴]. اما از ایرادهای وارد بر آن، اینکه با توجه به شیوه تغذیه بافتی از طریق انتشار سلول به سلول، احتمال ایسکمی بافت و تضعیف آن در طول مطالعه وجود دارد. همچنین از مشکلات دیگر این روش استفاده از حجم بالای محلول و داروها می‌باشد که در پاره ای از موارد از نظر اقتصادی به صرفه نبوده و از محدودیت‌های مطالعه در این روش می‌باشد. هدف مطالعه حاضر تلفیق دو روش پرفیوژن و سوپرفیوژن با تغییرات مناسب در روش لانگندورف و ایجاد برش‌های مناسب در بافت قلب در مختصات گره دهلیزی-



شکل ۱- نمایی از بساط تغذیه دوگانه قلب ایزوله در قلب خرگوش، A: پمپ پرستالتیک، B: سیستم گرمایشی شامل ترموستات و بن ماری، C: سیستم مانیتورینگ، D: دستگاه آمپلی فایر، E: برد پاورلب، F: برد A/D، G: دستگاه استیمولاتور، H: دستگاه پورتابل پی اچ متر و ترمومتر، I: کویل های شیشه ای جهت حفظ دمای محلول تیروید، J: محفظه داخلی، K: منبع نوری سرد، L: مانومتر.



شکل ۲- نمایی از مکانهای الکترودگذاری در بافت ایزوله قلب خرگوش، الکترود تحریکی در کریستاترمینالیس نزدیک گره سینوسی- دهلیزی و الکترودهای ثابت در سپتوم بین دهلیزی و محل عضلات هیس قرار گرفتند.



شکل ۳- نمایی از قرارگیری بافت قلبی در حمام بافتی و مدل‌های پرفیوژن و تغذیه دوگانه در قلب، A: محفظه داخلی، B: ورودی تیروید به حمام بافتی، C: خروجی تیروید از حمام بافتی محفظه، D: کویل‌های شیشه‌ای جهت حفظ دمای تیروید، E: دستگاه پرتابل PH متر و ترمومتر، F: فشارسنج، G: محفظه حباب گیر، H: الکترودهای ثبات جهت ثبت سیگنال، I: الکترود تحرکی جهت تحریک بافت، J: کانول آنورت، K: آنورت

(ISODAM 8 amplifiers, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) سرعت ضربانات پایه قلب ثبت گردید. سپس به کمک الکترود تحریکی دو قطبی پلاتینیوم- ایریدیوم (AMI Company, Lexington, KY, USA) با قطر ۱۰۰ میکرون که در حاشیه گره سینوسی- دهلیزی در دهلیز راست قرار می‌گرفت، بافت تحریک می‌گردید. پروتکل‌های تحریکی به کمک نرم افزار AHIS₂ (ساخته شده با همکاری دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه شهید بهشتی) و ایزولاتور (Nihhon Kohden, SS-202J) انجام شد. سیگنال‌های دریافتی فیلتر (محدوده ۳-۳۰ کیلو هرتز)، سپس توسط میکروآمپلی فایر ساخت داخل (طراحی شده توسط دانشگاه شهید بهشتی و شرکت رایان طب توان) تقویت و جهت ثبت به کامپیوتر هدایت و مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گرفت. گروه‌های مورد مطالعه: پس از پایداری بافت با روش تغذیه دوگانه (۳۰ دقیقه)، پروتکل‌های ونکه باخ و ریکاوری اجرا و داده‌ها به عنوان گروه تغذیه دوگانه در نظر گرفته می‌شد (زمانی

NaHCO₃(25), NaH₂PO₄(0.7), Dextrose(11) می‌باشند. بافتها قبل از الکترودگذاری بمدت ۳۰ دقیقه جهت تطابق با محیط جدید باقی می‌ماندند. سپس الکترودگذاری انجام شده، قبل و بعد از اجرای هر پروتکل، جهت اطمینان از پایداری بافت، طول موج ونکه باخ اندازه گیری می‌گردید. در این مدل از ۳ الکترود دو قطبی، یکی به عنوان تحریک کننده و دو تای دیگر به عنوان الکترود ثبات استفاده می‌گردید. الکترود تحریکی در کریستاترمیناليس نزدیک گره سینوسی-دهلیزی و الکترودهای ثبات در سیتوم بین دهلیزی و محل عضلات هیس قرار می‌گرفتند (شکل ۲).

الکترودها بر روی پایه‌های نگهدارنده الکترودها ثابت شده به طوری که فاصله دو سر الکترود به حداقل ۵ میلی متر می‌رسید. بطور خلاصه ثبت خارج سلولی تک قطبی پتانسیل میدانی با استفاده از الکترود تک قطبی نقره پوشش دار تفلونی با قطر ۱۰۰ میکرون (AMI Company, Lexington, KY, USA) و با فیلترهای گذر بالا و پایین (۱/۰-۱۰۰ کیلوهرتز) و تقویت تا حد ۱۰ هزار برابر با استفاده از آمپلی‌فایر

جدول ۱- اثر روش‌های مختلف بر روی خواص تونیک گره دهلیزی - بطنی قلب خرگوش

Methods	CL (ms)	SA (ms)	AVCT (ms)	WBCL (ms)	ERP (ms)	FRP (ms)
D	۳۵۱ ± ۱۳	۱۰ ± ۱	۳۳ ± ۴ ^{ab}	۱۳۱ ± ۷ ^{ab}	۹۰ ± ۶ ^{ab}	۱۴۷ ± ۱۱ ^{ab}
P	۳۶۱ ± ۱۵	۱۱ ± ۲	۴۳ ± ۵ ^b	۱۴۲ ± ۸ ^b	۹۹ ± ۵ ^b	۱۵۸ ± ۱۳ ^b
S	۳۷۹ ± ۱۷	۱۳ ± ۲	۵۲ ± ۵	۱۵۴ ± ۸	۱۰۹ ± ۷	۱۶۸ ± ۱۵

کلیه داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش گردید و $p < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. تعداد نمونه: ۱۰ سر. D: تغذیه دوگانه، P: پرفیوژن، S: سوپرفیوژن، α : تفاوت معنی‌دار با گروه P، b: تفاوت معنی‌دار با گروه S.

CL: Cycle length, WBCL: Wenckebach cycle length, SA: Intra-atrial conduction time, AVCT: Atrioventricular conduction time, ERP: Effective refractory period, FRP: Functional refractory period, ms: millisecond.

Recovery

جدول ۲- مقایسه پارامترهای ریکاوری در روش‌های مختلف در قلب خرگوش

AH _∞ (ms)			β			τ (ms)		
D	P	S	D	P	S	D	P	S
۳۴ ± ۵ ^{ab}	۴۵ ± ۵ ^b	۵۴ ± ۶	۵۱ ± ۲	۵۳ ± ۳	۵۵ ± ۲	۱۷۲ ± ۱۳ ^b	۱۸۸ ± ۳۰	۲۱۰ ± ۲۰

کلیه داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش گردید و $p < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. تعداد نمونه: ۱۰ سر. D: تغذیه دوگانه، P: پرفیوژن، S: سوپرفیوژن، α : تفاوت معنی‌دار با گروه P، b: تفاوت معنی‌دار با گروه S. AH_∞: بیانگر هدایت در گره دهلیزی - بطنی بعد از ریکاوری کامل در ضربانات پایه می‌باشد.

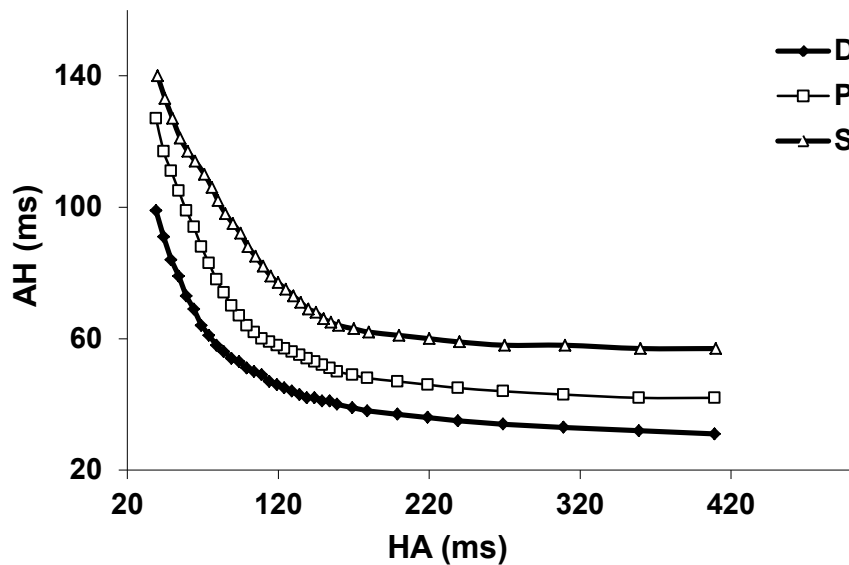
α : تفاوت معنی‌دار با گروه P، b: تفاوت معنی‌دار با گروه S. τ : ثابت زمانی ریکاوری، β : مقدار ثابت. AH: Atrial-His, ms: millisecond.

حدود ۲۰ دقیقه پروتکل ونکه باخ اجرا و نتایج آن به عنوان فاکتور پایداری در نظر گرفته می‌شد و نتایج آن نباید بیشتر از ۵ میلی ثانیه با نتایج ابتدای آزمایشات متفاوت باشد و در صورت افزایش ونکه باخ بیش از ۵ میلی ثانیه، آن نمونه از مطالعه حذف می‌گردید [۱۵].

پروتکل‌های تحریکی: پروتکل ونکه باخ، عبارت است از کاهش فواصل بین تحریک‌ها پس از هر ده تحریک با فاصله یکسان تا آن که در گره دهلیزی - بطنی بلوک درجه دوم اتفاق افتد (یعنی به ازاء هر دو ضربان دهلیزی فقط یک ضربان در دسته هیس ثبت شود). جهت اجرای پروتکل ریکاوری، بعد از ده تحریک پایه، یک تحریک تأخیری به بافت اعمال شده و پاسخ آخرین تحریک پایه نسبت به تحریک تأخیری به صورت فاصله زمان هدایت (دهلیز تا هیس)، در مقابل زمان ریکاوری (هیس تا دهلیز) رسم می‌شود [۲۵]. شاخص‌های دوره تحریک ناپذیری موثر و کارکردی از اجرای پروتکل ریکاوری استخراج می‌گردید. دوره تحریک ناپذیری موثر عبارتند از طولانی‌ترین فاصله دو ثبت متوالی از دهلیزها، قبل از آنکه بلوک دهلیزی - گره‌ای اتفاق بیفتد. دوره تحریک ناپذیری کارکردی عبارتند از

که بافت توسط هر دو سیستم پرفیوژن و سوپرفیوژن تغذیه می‌گردید (شکل ۳). سپس مسیر سوپرفیوژن را قطع کرده تا بافت فقط با روش پرفیوژن به مدت ۳۰ دقیقه تغذیه می‌گردید. پس از پایداری بافت، مجدداً پروتکل‌های تحریکی ونکه باخ و ریکاوری اجرا و داده‌ها به عنوان گروه پرفیوژن در نظر گرفته می‌شد (شکل ۳). در ادامه مسیر سوپرفیوژن را به مدت نیم ساعت باز کرده تا بافت مجدداً با تغذیه از طریق هر دو مسیر پایداری آن حفظ گردد سپس پروتکل ونکه باخ را اجرا تا از پایداری بافت اطمینان حاصل گردد. در ادامه، مسیر پرفیوژن را به مدت ۳۰ دقیقه قطع کرده تا بافت فقط با روش سوپرفیوژن به مدت ۳۰ دقیقه تغذیه می‌گردید (شکل ۳). سپس پروتکل‌های ونکه باخ و ریکاوری اجرا و داده‌ها به عنوان گروه سوپرفیوژن در نظر گرفته می‌شد.

لازم به ذکر است که پروتکل ونکه باخ یکی از فاکتورهای اساسی در پایداری بافت می‌باشد بنابراین در انتهای هر روش جهت اطمینان از پایداری بافتها و حذف تأثیر زمان و خستگی، در کلیه گروه‌ها پرفیوژن بافتی با استفاده از روش تغذیه دوگانه مجدداً برقرار تا پایداری بافت حفظ می‌گردید و پس از گذشت



شکل ۴- نمایی از منحنی پایه ریکاوری در روشهای مختلف قلب ایزوله، روش های سوپرفیوژن و پرفیوژن نسبت به روش تغذیه دوگانه، موجب انحراف به سمت بالای منحنی ریکاوری گردیده است. D: تغذیه دوگانه، P: پرفیوژن، S: سوپرفیوژن. HA: His-Atrium, AH: Atrial-His, ms: millisecond.

بطور معنی داری افزایش یافته بود ($P < 0.05$). افزایش دوره تحریک ناپذیری موثر گره دهلیزی- بطنی در روش سوپرفیوژن نسبت به روش پرفیوژن معنی دار بوده است ($P < 0.05$) (جدول ۱).

دوره تحریک ناپذیری کارکردی گره دهلیزی- بطنی: دوره تحریک ناپذیری کارکردی گره دهلیزی- بطنی در روش پرفیوژن (158 ± 13 میلی ثانیه) و سوپرفیوژن (168 ± 15 میلی ثانیه) نسبت به روش تغذیه دوگانه (147 ± 11 میلی ثانیه) افزایش معنی داری داشت ($P < 0.05$). افزایش دوره تحریک ناپذیری کارکردی گره دهلیزی- بطنی در روش سوپرفیوژن نسبت به روش پرفیوژن معنی دار نبوده است (جدول ۱).

طول موج ونکه باخ: طول موج ونکه باخ در روش تغذیه دوگانه (131 ± 7 میلی ثانیه) نسبت به روش پرفیوژن (142 ± 8 میلی ثانیه) و سوپرفیوژن (154 ± 8 میلی ثانیه) بطور معنی داری کاهش یافته بود ($P < 0.05$). افزایش طول موج ونکه باخ در روش سوپرفیوژن نسبت به روش پرفیوژن معنی دار بوده است ($P < 0.05$) (جدول ۱). اثرات تغذیه دوگانه، پرفیوژن و سوپرفیوژن بر منحنی ریکاوری: شکل ۴ منحنی پایه ریکاوری یکی از قلب ها را در مطالعه حاضر نشان می دهد. سوپرفیوژن و پرفیوژن نسبت به تغذیه دوگانه، موجب انحراف به سمت بالای منحنی ریکاوری گردیده است (شکل ۴). ثابت زمانی ریکاوری

کوتاه ترین فاصله دو ثبت متوالی از هیس، که در طی یک پروتکل تحریکی بدست می آید.

آنالیز آماری: برای مقایسه بین گروه ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه استفاده گردید. کلیه داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد گزارش شد و $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. آنالیز منحنی های تک توانی غیر خطی با استفاده از نرم افزار Graph pad prism 5 و روش Marquardt انجام شد.

یافته ها

زمان هدایت در گره دهلیزی - بطنی: روش تغذیه دوگانه موجب کاهش معنی دار در زمان هدایت گره دهلیزی - بطنی شده است ($P < 0.05$) (33 ± 4 میلی ثانیه در مقابل 43 ± 5 و 52 ± 5 میلی ثانیه به ترتیب در روش پرفیوژن و سوپرفیوژن). همچنین افزایش زمان هدایت در گره دهلیزی- بطنی در روش سوپرفیوژن نسبت به روش پرفیوژن معنی دار بوده است ($P < 0.05$) (جدول ۱). دوره تحریک ناپذیری موثر گره دهلیزی - بطنی: دوره تحریک ناپذیری موثر گره دهلیزی- بطنی در روش های پرفیوژن (99 ± 5 میلی ثانیه) و سوپرفیوژن (109 ± 7 میلی ثانیه) نسبت به روش تغذیه دوگانه (90 ± 6 میلی ثانیه) به

(T_{rec}) در روش تغذیه دوگانه از 51 ± 2 میلی ثانیه به 53 ± 3 میلی ثانیه در روش پرفیوژن و 55 ± 2 میلی ثانیه در سوپرفیوژن بدون تغییر معنی داری افزایش یافت (جدول ۲). همچنین ثابت زمانی β از 172 ± 15 میلی ثانیه در تغذیه دوگانه به 188 ± 30 میلی ثانیه در روش پرفیوژن و 210 ± 20 میلی ثانیه در سوپرفیوژن افزایش یافت (جدول ۲).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که طول موج ونکه باخ، زمان هدایت در گره دهلیزی- بطنی، دوره تحریک ناپذیری موثر و کارکردی در گره دهلیزی- بطنی قلب خرگوش در روش تغذیه دوگانه نسبت به روش‌های سیستم پرفیوژن و سوپرفیوژن کاهش یافته است. نتایج مطالعه حاضر بیانگر برتری روش جدید تغذیه دوگانه از نظر تغذیه و اکسیژن رسانی نسبت به سایر روش‌های موجود در مطالعات گره دهلیزی- بطنی قلب خرگوش می‌باشد و نشان دهنده نزدیک بودن روش جدید به تغذیه گره دهلیزی- بطنی در حالت فیزیولوژیک می‌باشد و احتمالاً کارایی بافت را در مطالعات الکتروفیزیولوژی گره دهلیزی- بطنی افزایش می‌دهد. مطالعات گذشته نشان داده است که، زمان هدایت در سلولهای گره دهلیزی- بطنی در قلب خرگوش با روش سوپرفیوژن در آزمایش‌های Billette و همکاران [۱] ($n=6$) تقریباً 55 ± 9 میلی ثانیه، در آزمایش‌های نایب پور و همکاران [۲۵] ($n=10$) نزدیک به 44 ± 2 میلی ثانیه، در آزمایش‌های Heon-Seok Han و همکاران [۸] ($n=14$) تغذیه با محلول کربس) نزدیک به 51 ± 11 میلی ثانیه و در آزمایش‌های Mazgalev و همکاران [۲۲] ($n=12$) 68 ± 7 میلی ثانیه گزارش گردیده است. همچنین زمان هدایت در سلولهای گره دهلیزی- بطنی با روش پرفیوژن در قلب خرگوش، در آزمایشات Miyazaki و همکاران [۲۳] در سال ۱۹۹۶ ($n=6$) تقریباً $48/6 \pm 5$ میلی ثانیه و در مطالعات قبلی ما تقریباً ۴۰ میلی ثانیه گزارش گردیده است [۱۷، ۱۶، ۱۳]. ولی زمان هدایت در گره دهلیزی- بطنی در آزمایش حاضر با روش تغذیه دوگانه به 33 ± 4 میلی ثانیه کاهش یافته است. از طرف دیگر، نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که دوره تحریک ناپذیری موثر سلولهای گره دهلیزی- بطنی از

$90/8 \pm 2/2$ میلی ثانیه در روش تغذیه دوگانه، به $99/6 \pm 1/6$ میلی ثانیه در روش پرفیوژن و $109/4 \pm 2$ میلی ثانیه در روش سوپرفیوژن افزایش یافته است. روشهای سوپرفیوژن و پرفیوژن نسبت به روش تغذیه دوگانه، موجب افزایش دوره تحریک ناپذیری موثر سلولهای گره دهلیزی- بطنی شده است. مطالعات گذشته نشان داده است که دوره تحریک ناپذیری موثر سلولهای گره دهلیزی- بطنی قلب خرگوش با روش سوپرفیوژن در آزمایش Billette و همکاران [۱] ($n=6$)، تقریباً 101 ± 10 میلی ثانیه، در آزمایش نایب پور و همکاران [۲۵] ($n=10$) نزدیک به 103 ± 3 میلی ثانیه، در آزمایش‌های Heon-Seok Han و همکاران [۸] ($n=14$) و تغذیه با محلول کربس) نزدیک به 129 ± 23 میلی ثانیه و در آزمایش‌های Mazgalev و همکاران [۲۲] ($n=12$) 99 ± 9 میلی ثانیه گزارش گردیده است. همچنین دوره تحریک ناپذیری موثر سلولهای گره دهلیزی- بطنی قلب خرگوش با روش پرفیوژن، در آزمایش Miyazaki و همکاران [۲۳] در سال ۱۹۹۵ ($n=6$) تقریباً 115 ± 6 میلی ثانیه، در آزمایش‌های Chorro و همکاران [۴] ($n=10$) حدود 110 ± 19 میلی ثانیه و در مطالعات قبلی ما تقریباً ۱۰۲ میلی ثانیه گزارش گردیده است [۱۷، ۱۶، ۱۳]. ولی دوره تحریک ناپذیری موثر سلولهای گره دهلیزی- بطنی در مطالعه حاضر با روش تغذیه دوگانه تقریباً ۹۱ میلی ثانیه می‌باشد.

یافته‌های فوق نشان می‌دهد که هر دو روش پرفیوژن و سوپرفیوژن نسبت به تغذیه دوگانه، موجب افزایش دوره تحریک ناپذیری موثر سلولهای گره دهلیزی- بطنی شده است که نشان دهنده کارایی بهتر گره دهلیزی- بطنی با روش جدید می‌باشد. زمان هدایت در سلولهای گره دهلیزی- بطنی یکی از شاخص‌های مهم کارکرد قلب می‌باشد. افزایش و کاهش آن نشانه وجود یا عدم وجود ایسکمی در بافتهای گره‌ای است. در مطالعه حاضر روش‌های سوپرفیوژن و پرفیوژن نسبت به روش تغذیه دوگانه، به طریقی باعث طولانی‌تر شدن هدایت در سلولهای گره دهلیزی- بطنی گردیدند و روش تغذیه دوگانه نسبت به دو روش دیگر موجب هدایت بهتر ایمپالس‌ها گردیده است. با توجه به اینکه تغذیه سلولهای گره دهلیزی- بطنی در روش سوپرفیوژن از طریق انتشار سلول به سلول صورت می‌گیرد، امکان ایسکمی باقی با این روش وجود دارد و این با

ایسکمی بافتی ناشی از روش سوپرفیوژن و امکان خطا در الکتروگذاری و آسیب ناشی از روش پرفیوژن به بافت را به حداقل می‌رساند و احتمالاً کارایی بافت را در مطالعات الکتروفیزیولوژی گره دهلیزی- بطنی افزایش می‌دهد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، این ادعا وجود دارد که برای اولین بار نکات مثبت دو روش فوق در یکجا جمع و ایرادهای احتمالی آنها برطرف گردیده است. نتایج مطالعه حاضر بیانگر برتری روش جدید تغذیه دوگانه از نظر تغذیه و اکسیژن رسانی نسبت به سایر روش‌های موجود در مطالعات گره دهلیزی- بطنی قلب خرگوش می‌باشد.

سپاسگزاری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر، حاصل پایان نامه دکتر علی محمد علیزاده جهت اخذ مدرک دکتری تخصصی از دانشگاه علوم پزشکی تهران می‌باشد.

یافته‌های ما در مطالعه حاضر مطابقت دارد. از طرفی دیگر، زمان هدایت در سلولهای گره دهلیزی- بطنی با روش پرفیوژن نسبت به سوپرفیوژن از افزایش کمتری برخوردار بوده است چرا اینکه، سلولهای گره دهلیزی- بطنی در روش پرفیوژن، از طریق پرفیوژن رتروگرا (شاخه‌های عروق کرونری) تغذیه می‌گردد و این شیوه احتمال ایسکمی بافت را کاهش می‌دهد اما امکان آسیب بافتی و خطا در الکتروگذاری با توجه به وجود ضربانات بطنی وجود دارد. ولی در روش تغذیه دوگانه، با الگو گرفتن از روش فیزیولوژیک، تغذیه بافتی گره دهلیزی- بطنی هم از طریق عروق کرونر و هم از طریق انتشار سلول به سلول انجام می‌گیرد و با توجه به برشهای انجام شده الکتروگذاری با نهایت دقت صورت گرفته است و نیز با توجه به داشتن حداقل انقباضات بطنی در روش جدید، امکان جابجایی الکترودها به حداقل ممکن خواهد رسید. نتایج مطالعه حاضر، نشان دهنده نزدیک بودن روش جدید به تغذیه گره دهلیزی- بطنی در حالت فیزیولوژیک می‌باشد و این روش احتمال

References

- [1] Billette J, Amellal F, Effects of atrial pacing site on rate-dependent AV nodal function in rabbit hearts. *Am J Physiol* 269 (1995) 934-942.
- [2] Billette J, Preceding His-atrial interval as a determinant of atrioventricular nodal conduction time in the human and rabbit heart. *Am J Cardiol* 38 (1976) 889-896.
- [3] Bowditch HP, Ober die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. Berichte über die Verhandlungen der Königlich-Sächsischen Gesellschaft zu Leipzig. *Mathematisch Physische Classe* 24 (1871) 652-689.
- [4] Chorro FG, Kirchhof J, Brugada A, Ventricular response during irregular atrial pacing and atrial fibrillation. *Am J Physiol* 259 (1990) 1015-1021.
- [5] Cyon E, Ober den Einfluss der Temperaturänderungen auf Zahl, Dauer und Stärke der Herzschläge. Berichte über die Verhandlungen der Königlich Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig. *Mathematisch Physische Classe* 18 (1866) 256-306.
- [6] Gottlieb R, Magnus R, Digitalis and Herzarbeit. *Natch versuchen am überlebenden warmbluterherzen. Arch Exper Path Und Pharmacol* 51 (1904) 30-63.
- [7] Henelt K, Le FK, Martin KL, Brasington CK, Piecuch S, Case CL, Changes in atrioventricular conduction properties with refractory-period modulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 28 (1996) 824-832.
- [8] Heon-Seok H, Kyung HY, Cellular electrophysiology of fast pathway ablation of rabbit atrioventricular node. *J Korean Med Sci* 15 (2000) 494-500.
- [9] Heymans JF, Kochmann M, Une nouvelle methode de circulation artificielle a travers le coeur isole de mammifere. *Arch Int Pharmacodyn Therap* 13 (1904) 531-538.
- [10] Hoffman BF, Pase DE, Carvalhl A, Mello WC, Electrical activity of single fibers of the atrioventricular node. *Circ Res* 7 (1959) 11-18.
- [11] Janse M, Influence of the direction of the atrial wave front on A V nodal transmission in isolated hearts of rabbits. *Circ Res* 25 (1969) 439-449.
- [12] Janse MJ, Jensen JT, Kléber AG, Vancapelle JL, Techniques problems in correlating cellular electrophysiology and morphology in cardiac nodal

- tissues. *The Sinus Node* (1978) 183-194.
- [13] Khor V, Alizadeh AM, Niknam M, Moheimani HR, Yazdi HR, pourabouk M, Badaghabadi F, Changizi S, Rajaei M, Nayeypour M, Dynamic age-related changes of extracellular field potential of isolated AV-node of rabbit. *Physiol Pharmacol* 15 (2011) 173-181.
- [14] Khor V, Alizadeh AM, Yazdi H, Rakhshan E, Mirabbasi A, Changizi S, Frequency-dependent Electrophysiological Remodeling of the AV Node by Hydroalcohol Extract of *Crocus sativus* L. (Saffron) During Experimental Atrial Fibrillation: The Role of Endogenous Nitric Oxide. *Phytother Res* 26 (2011) 826-32.
- [15] Khor V, Aminolsharieh Najafi S, Alizadeh AM, Moehmani HR, Shakiba D, Alizadeh F, Nayeypour M, Protective role of simvastatin on isolated rabbit atrioventricular node during experimental atrial fibrillation model: Role in rate control of ventricular beats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 385 (2012) 697-706.
- [16] Khor V, Azadbakht M, Nayeypour M, Alizadeh AM, Pourabouk M, Badaghabadi F, Changizi SH, Moheimani HR, Rate-dependent electrophysiological effects of *Crocus sativus* on extracellular field potential of isolated rabbit heart in-vitro. *J Med Plants* 36 (2010) 48-56.
- [17] Khor V, Azadbakht M, Nayeypour M, Jamshidi AH, Pourabouk M, Alizadeh AM, Badaghabadi F, Changizi S, Rajaei M, Frequency-dependent anti-arrhythmic effects of *Crataegus monogyna* on the extracellular field potential recordings in the rabbit atrioventricular node, an experimental model of AF. *Physiol Pharmacol* 15 (2011) 36-46.
- [18] Langendorff O, Geschichtliche Betrachtungen zur Methode des uberlebenden Warmbluterherzens. *Muench Med Wochenschr* 50 (1903) 506-509.
- [19] Langendorff O, Untersuchungen am uberlebenden Säugethierherzen. *Pflugers Arch* 61 (1895) 291-332.
- [20] Ludwig C. Beiträge zur Kenntnis des Einflusses der Respirationsbewegungen auf den Blutlauf im Aortensysteme. *Arch Anat Physiol wiss Med (Müller Arch)* (1847) 242-302.
- [21] Martin HN, The direct influence of gradual variations of temperature upon the rate of beat of the dog's heart. *Phil Trans R Soc Lond* 174 (1883) 663-688.
- [22] Mazgalev TN, Zhang Y, The dual pathway electrophysiology of the atrioventricular conduction. A new look at an old phenomenon. *Minerva Cardioangiol* 51 (2003) 1-14.
- [23] Miyazaki K, Adaniya H, Sawanobori T, Hiraoka M, Electrophysiological effects of clentiazem, a new Ca^{2+} antagonist, on rabbit hearts. *J Cardiac Pharma* 27 (1996) 615-621.
- [24] Nayeypour M, Billette J, Amellal F, Nattel S, Effects of adenosine on rate-dependent atrioventricular nodal function. *Circulation* 88 (1993) 2632-2645.
- [25] Nayeypour M, Naseri M, Khor V, Effects of ajmaline on rate-dependent atrioventricular node properties potential role in experimental atrioventricular re-entrant tachycardia. *Eur J Pharmacol* 412 (2001) 77-89.
- [26] Neely JR, Liebermeister H, Battersby EJ, Morgan HE, Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am J Physiol* 212 (1967) 804-814.