



Effect of endotoxemia on heart rate dynamics in rat isolated perfused hearts

Mohammad Karim Azadbakht¹, Roham Mazloom¹, Shahram Shahabi², Ali Reza Mani^{1*}

1. Dept. of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran,
2. Dept. of Immunology, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Received: 12 Dec 2012

Accepted: 19 Jan 2013

Abstract

Introduction: Beat-to-beat variation in heart rate shows a complex dynamics, and this complexity is changed during systemic inflammatory response syndrome (e.g. sepsis). It is not known whether or not cardiac pacemaker dynamical rhythm is affected by sepsis. The aim of this study was to investigate heart rate dynamics of isolated heart as well as expression of pacemaker channels (HCN) in a rat model of sepsis (endotoxemia) compared with normal rats.

Methods: Male rats weighing 250-300 g were used in this study. Bacterial lipopolysaccharide was injected intraperitoneally (1mg/kg) in the endotoxemia group, and sterile saline in the control group. Three hours after injection, cardiac tissues were isolated and studied using Langendorff apparatus. Heart rate dynamics was assessed by calculating the standard deviation of inter-beat intervals as well as detrended fluctuation analysis (DFA). Quantitative RT-PCR was used to assess HCN expression in atria.

Results: Hypoxia had a significantly different effect on heart rate variability in endotoxemic rats compared with controls ($P < 0.05$). DFA analysis showed a linear relationship between logarithm of variance and the logarithm of scale in both endotoxemic and control rats. Atrial expression of HCN1 and HCN2 at mRNA level were significantly higher in endotoxemic rats in comparison with controls ($P < 0.05$).

Conclusion: Spontaneous beatings of isolated hearts exhibit a fractal-like dynamics which did not change after global hypoxia and/or endotoxemia. Endotoxemia was associated with altered heart rate variability and increased expression of pacemaker channels that might play a role in pathophysiology of cardiac complications of sepsis.

Key words: Endotoxin, Fractal dynamics, Heart rate variability, Hypoxia

* Corresponding author e-mail: mani@modares.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

اثر اندوتوکسمی بر تغییرات دینامیکی ضربان قلب ایزوله در موش صحرایی

محمد کریم آزادبخت^۱، رهام مظلوم^۱، شهرام شهبابی^۲، علیرضا مانی^{۳*}

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه

پذیرش: ۳۰ دی ۹۱

دریافت: ۲۲ آذر ۹۱

چکیده

مقدمه: تغییرات لحظه به لحظه ضربان قلب الگوی پیچیده‌ای از خود نشان می‌دهد و این پیچیدگی در بیماری‌های همراه با التهاب سیستمیک از جمله سپسیس تغییر می‌کند. تغییرات دینامیکی ضربان قلب پیش‌بینی کننده میزان بقا بیماران مبتلا به سپسیس است. گزارش‌های قبلی نقش تنظیم عصبی اتونوم را در تغییر دینامیکی ضربان قلب در سپسیس مورد مطالعه قرار داده‌اند و نقش تغییرات دینامیکی ضربان ساز قلب در سپسیس کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. هدف از این مطالعه آن است که ساختار دینامیکی ضربانات قلب ایزوله و میزان بیان کانال‌های ضربان ساز (HCN) در حیوان اندوتوکسمیک با حیوانات سالم مقایسه شود.

روش‌ها: از موش‌های صحرایی نر با وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم در انجام آزمایش‌ها استفاده شد. در گروه اندوتوکسمیک لیپوپلی ساکارید با دوز 1mg/kg و در گروه شاهد نرمال سالین استریل به صورت داخل صفاقی تزریق شد. ۳ ساعت پس از تزریق، قلب ایزوله شد و در دستگاه لانگندورف قرار گرفت، برای آنالیز تغییرات دینامیکی ضربانات قلب از روش تحلیل نوسانات بی‌روند شده (DFA) و محاسبه انحراف معیار فواصل ضربانات استفاده شد. از روش RT-PCR کمی برای اندازه گیری بیان کانال‌های ضربان ساز (HCN) در دهلیز مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان داد که در پاسخ به هیپوکسی پراکندگی ضربانات در قلب‌های اندوتوکسمیک تغییر کمتری نسبت به گروه کنترل پیدا می‌کند ($P < 0.05$). تحلیل نوسانات بی‌روند شده نشان داد که در هر دو گروه شاهد و اندوتوکسمیک لگاریتم مقیاس با لگاریتم واریانس تغییرات رابطه خطی دارد. اندوتوکسمی بیان ژن کانال‌های ضربان ساز HCN1 و HCN2 را به طور چشم گیری در دهلیز افزایش داد ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: ساختار تغییرات ضربانات قلب ایزوله ساختاری فرکتالی دارد و این ساختار در اندوتوکسمی تغییر نمی‌کند. میزان پراکندگی ضربانات و بیان کانال‌های ضربان ساز در اندوتوکسمی تغییر می‌کند و این امر ممکن است در پاتوفیزیولوژی مشکلات ریتم قلب در سپسیس نقش ایفا کند.

واژه‌های کلیدی: اندوتوکسین، ساختار فرکتالی، تغییرات ضربان قلب، هیپوکسی

مقدمه

مثال تنظیم در سیستم قلبی عروقی به هدف برقراری خون رسانی به بافت‌ها منجر به تغییرات لحظه به لحظه ضربان قلب و فشار خون می‌شود. به مطالعه تغییرات لحظه به لحظه ضربان قلب (heart rate variability (HRV گفته می‌شود که بیانگر سیستم پیچیده کنترل کننده قلب می‌باشد [۱، ۹]. بسیاری از ریتم‌های بیولوژیک از جمله ضربان قلب در حالت سلامت دارای ساختار فرکتالی (fractal) هستند که یکی از ویژگی‌های سیستم‌های پیچیده می‌باشد [۱۰]. فرکتال‌ها ساختارهایی خود شبیه (self-similar) هستند که در

تنظیم در سیستم‌های فیزیولوژیک رفتاری پیچیده دارد و از سازکارهای با بازخورد مثبت و منفی تشکیل شده است که در مقیاس‌های زمانی مختلف با هم تداخل می‌کنند. به عنوان

مانی@modares.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

مقیاس‌های مختلف از نظر ساختاری یا دینامیکی شبیه به هم به نظر می‌رسند. نمونه فرکتال هندسی ساختار آناتومیک عروق و انشعاب آن به شریان‌های کوچک‌تر و در نهایت به مویرگ‌ها است. چنین ساختارهایی در طبیعت و در بدن انسان به وفور یافت می‌شود مانند ساختار درختچه برونشی و ساختارهای دندریت‌ها در سلسله اعصاب مرکزی. علاوه بر فرکتال‌های هندسی فرکتال‌های دینامیکی نیز وجود دارند. در فرکتال‌های دینامیکی میزان تغییرپذیری در یک پدیده در مقیاس‌های مختلف زمانی با هم ارتباط دارند [۷، ۱۷].

تعیین خصوصیات فرکتال‌های دینامیکی فیزیولوژیک به علت نامنظمی و تغییر خواص آماری آن‌ها در طول زمان و وجود عوامل خارجی موثر بر روی آن‌ها کاری دشوار است، در سال ۱۹۹۵ پنگ و همکارانش برای غلبه بر این مشکلات روش تحلیل نوسانات بی‌روند شده (DFA) را مطرح کردند [۲۰].

این محققان نشان دادند که با این روش می‌توان به وجود ساختار فرکتالی در نوسانات بیولوژیک پی برد و علاوه بر آن می‌توان بعد فرکتالی را محاسبه کرد. این تحقیقات نشان داد که ساختار فرکتالی ضربان قلب در بعضی از بیماری‌ها از جمله نارسایی احتقانی قلب دست خوش تغییر می‌شود و این تغییر با میزان بقای بیماران ارتباط دارد [۳، ۱۶].

سپسیس (sepsis) به پاسخ التهابی سیستمیک اطلاق می‌شود که در اثر حضور باکتری در خون ایجاد می‌شود [۲۱]. التهاب باعث فعال شدن سیستم ایمنی و به دنبال آن باعث ایجاد یکسری از واسطه‌های التهابی می‌شود. یکی از موادی که باعث ایجاد التهاب سیستمیک می‌شود اندوتوکسین (لیپوپلی ساکارید موجود در دیواره باکتری‌های گرم منفی) است. سپسیس یکی از عوامل اصلی مرگ و میر بیماران بستری در بخش‌های مراقبت ویژه بیمارستان می‌باشد. بیماران مبتلا به سپسیس می‌توانند دچار شوک سپتیک، کاهش پرفیوژن بافتی و نارسایی چندگانه اعضا از جمله ریه و به دنبال آن هیپوکسمی شوند [۱۱]. با وجود پیشرفت‌های اخیر در مورد پاتوفیزیولوژی سپسیس هنوز درمان موثری برای آن وجود ندارد [۲]. شاخص‌های فیزیولوژیکی وجود دارند که می‌توانند میزان بقا در بیماران مبتلا به سپسیس را پیش‌بینی کنند. از میان این شاخص‌ها مطالعات زیادی نشان داده است که

بررسی تغییرات دینامیکی ضربان قلب (HRV) اطلاعات ارزشمندی در مورد پیش‌آگهی بیماری می‌دهد [۲۴، ۲۵]. به نظر می‌رسد که در بیماران مبتلا به سپسیس و در مدل تجربی اندوتوکسمی میزان تغییرپذیری ضربان قلب کاهش می‌یابد و این کاهش به علت اثر سایتوکاین‌های التهابی بر گره سینوسی دهلیزی می‌باشد [۸، ۱۲، ۲۲]. از آنجا که عمده تغییرات ضربان قلب در فعالیت اثر سمپاتیک و پاراسمپاتیک بوجود می‌آید، به طور سنتی کاهش HRV به اشکال عملکرد سیستم اتونوم نسبت داده شده است، به عنوان مثال در نوروپاتی اتونوم حاصل از دیابت میزان HRV کاهش می‌یابد [۵]. ولی وجود کاهش HRV در یک حالت پاتولوژیک لزوماً به معنای اشکال در عملکرد سیستم اتونوم نیست. مطالعاتی - که مولر واردان و همکاران در سال‌های اخیر انجام داده‌اند نشان داده است که [۲۲، ۲۸].

الف) انکوباسیون سلول‌های قلبی در محیط کشت با اندوتوکسین باکتری‌ها می‌تواند منجر به کاهش تغییرات در ضربان‌های خود به خودی این سلول‌ها شود.

ب) انکوباسیون دهلیز انسان با اندوتوکسین میزان جریان پیس‌میکری (I_f) سلول‌های دهلیز را به طور نسبی مختل می‌کند. این جریان‌ها در تغییرات دینامیکی ضربان قلب اهمیت زیادی دارد و به نظر می‌رسد لیپوپلی ساکاریدها به طور مستقیم یا غیر مستقیم (از طریق سایتوکاین‌ها) بر روی این جریان‌ها موثرند.

با توجه به این که ساختار فرکتالی یکی از خصوصیات مهم تغییرات دینامیکی ضربانات قلب می‌باشد مطالعه‌ای که در آن ساختار فرکتالی ضربان قلب ایزوله در مدل تجربی سپسیس گزارش شده باشد وجود ندارد. هدف از این مطالعه آن است که ساختار دینامیکی ضربانات قلب ایزوله شده از حیوان اندوتوکسمیک با حیوانات سالم مقایسه شود. از آنجا که هیپوکسمی یکی از عوارض شایع سپسیس می‌باشد [۱۱]، پاسخ‌دهی تغییرات دینامیکی ضربانات قلب در مدل تجربی هیپوکسمی نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. با توجه به این که جریان پیس‌میکری توسط کانال‌های Hyperpolarization cyclic nucleotide activated channels (HCN) به وجود می‌آید [۲۳]، میزان بیان این کانال‌ها نیز به دنبال اندوتوکسمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

حیوانات مورد آزمایش: از موش های صحرایی نر نژاد

Sprague-Dawley با وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم (خریداری شده از موسسه تحقیقاتی رازی) در انجام آزمایش ها استفاده شد. در طول آزمایش حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. آزمایش ها بر روی دو گروه حیوانات اندوتوکسمیک و کنترل انجام شد. برای ایجاد مدل تجربی اندوتوکسمی لیپوپلی ساکارید (استخراج شده از سالمونلا تایفی) (LPS) با دوز 1mg/kg و در گروه شاهد نرمال سالیین استریل به صورت داخل صفاقی تزریق شد [۶].

آماده سازی قلب ایزوله: ۳ ساعت پس از تزریق

LPS، حیوان را با استفاده از داروی تیوپنتال سدیم با دوز 50mg/kg بیهوش نموده سپس به منظور ممانعت از انعقاد خون و ایجاد ترمبوز در شریان های کرونر قبل از شروع جراحی، 500 واحد هپارین به داخل ورید دمی تزریق شد. بعد از باز کردن قفسه سینه، قلب را جدا کرده و برای پرفیوژن قلب در بساط لانگندورف از محلول نمکی فیزیولوژیک (PSS) در دمای 37 درجه سانتی گراد استفاده شد. محتوای محلول شامل مواد زیر بر حسب میلی مولار در لیتر که محصول شرکت MERCK آلمان است: NaCl , 112; KCl , 5; CaCl_2 , 1.8; MgCl_2 , 1; NaH_2PO_4 , 0.5; KH_2PO_4 , 0.5; NaHCO_3 , 25; glucose, 10; and EDTA, 0.004 این محلول توسط گاز کربوژن (95% O_2 و 5% درصد CO_2) گازرسانی می شود و pH آن در حدود $7.35-7.45$ تنظیم می شود. پس از اتصال قلب به بساط لانگندورف به ضربان خود ادامه می دهد. در این وضعیت برای اطمینان از سالم بودن قلب 30 دقیقه به قلب اجازه می دهیم تا پایدار شود، برای آنالیز تغییرات دینامیکی ضربانات قلب (HRV)، به مدت 10 دقیقه به طور همزمان از دهلیز و بطن ثبت گرفته می شود و آزمایش در صورتی ادامه پیدا می کرد که شواهدی به نفع وجود آریتمی در دوره زمانی 10 دقیقه مشاهده نمی شد. برای ثبت فعالیت الکتریکی قلب ایزوله از چهار الکترود ثبات استفاده شد، دو الکترود برای ثبت از دهلیزها و دو الکترود برای ثبت از بطن ها استفاده می شود، الکترود مرجع به کل قلب متصل می گردد. سیگنال های حاصل از ضربان های دهلیز و بطن به

دستگاه power lab منتقل شده و با فرکانس 10 kHz سیگنال آنالوگ به دیجیتال تبدیل شده و توسط نرم افزار Chart ثبت می شد. قله های امواج ثبت شده با تعریف یک آستانه شناسایی می گردید و با نقاطی علامت گذاری می شدند. سپس فواصل این نقاط محاسبه شده و به صورت یک فایل ASCII ذخیره شد و محاسبات بعدی بر روی این فایل ها انجام می شد. برای ایجاد هیپوکسی گاز کربوژن قطع شد و گازرسانی با مخلوط گازی 95% N_2 و 5% درصد CO_2 انجام شد [۴]، و تا یک ساعت پس از شروع هیپوکسی ثبت گرفته شد. برای اندازه گیری میزان اکسیژن محلول از یک حسگر اکسیژن گالوانیک ساخت شرکت ADInstruments استفاده شد.

آنالیز HRV: برای محاسبه تغییرات ضربان قلب از

روش های زیر استفاده شد: (۱) محاسبه میزان پراکندگی ضربانات قلب (SDNN): ابتدا انحراف معیار فواصل PP محاسبه شد که به آن SDNN می گویند. SDNN میزان کل تغییرات ضربان قلب را بیان می کند ولی از ساختار این تغییرات اطلاعاتی نمی دهد [۱۴]. (۲) روش تحلیل نوسانات بی روند شده (Detrended Fluctuation Analysis; DFA): محاسبه تحلیل نوسانات بی روند شده که شاخصی از میزان فرکتال بودن (خود شبیه بودن) تغییرات ضربان قلب است که توسط نرم افزار تهیه شده در آزمایشگاه محاسبه شد. در این روش ابتدا داده ها در مقیاس های مختلف بی روند شده و میزان واریانس داده های بی روند شده محاسبه می شود. اگر بین لگاریتم مقیاس $\text{Log}(n)$ و لگاریتم واریانس $\text{LogF}(n)$ رابطه خطی وجود داشته باشد ساختار فرکتالی است و شیب خط بیانگر بعد فرکتال خواهد بود. شیب 0.5 به معنای آن است که فاصله ضربان های همسایه نسبت به هم از یک الگوی تصادفی (رندوم) تبعیت می کنند که به آن White noise گفته می شود. اگر شیب این خط بیش از 0.5 باشد تغییرات ضربان های همسایه در مقیاس های مختلف نسبت به هم یک حالت همبسته دارند، یعنی یک تغییر در یک ضربان قلب بر روی ضربان های همسایه موثر است و میزان این تغییرات در ضربان های همسایه با هم همبستگی دارد. در حالتی که شیب آن مساوی یک باشد حالت ویژه دینامیکی برقرار است که به آن $1/f$ noise اطلاق می شود در این حالت ضربان های

جدول ۱- امتیازدهی آریتمی‌ها

۰	PVC ۰-۵۰
۱	PVC ۵۰-۵۰۰
۲	بیشتر از PVC ۵۰۰ یا یک دوره VT و یا VF برگشت‌پذیر
۳	۲-۳۰ دوره VT و یا VF برگشت‌پذیر
۴	بیشتر از ۳۰ دوره VT و یا VF برگشت‌پذیر
۵	VF برگشت‌ناپذیر

همسایه نسبت به هم دارای همبستگی است. با بالاتر رفتن شیب خط ساختار دینامیکی به حالتی شبیه حرکات براونی نزدیک می‌شود و اگر شیب ۱/۵ باشد ساختار Brownian noise قابل مشاهده است. در حالتی که شیب کمتر از ۰/۵ باشد رابطه ضربان‌های همسایه نسبت به هم همبستگی دارد ولی این همبستگی منفی است. به طوری که با افزایش و کاهش فاصله یک ضربان با ضربان‌های همسایه به طور معکوس کم یا زیاد می‌شود [۲۰].

بررسی آریتمی‌ها: تعریف و دسته‌بندی آریتمی‌های زمان هیپوکسی از نظر شدت بر اساس مدل لمبس انجام شد [۱۳]. زمان وقوع آریتمی‌ها با استفاده از نمودار کاپلان-مایر بررسی شد. شدت آریتمی‌ها بر اساس یک سیستم امتیازدهی ۶ نمره‌ای بررسی شد که الکتروکاردیوگرام هر قلب بر این اساس مورد ارزیابی قرار گرفت و این امتیازها برای آنالیز و مقایسه شدت آریتمی‌ها بین گروه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. همچنین زمان وقوع بلوک گره دهلیزی-بطنی در دو گروه مقایسه شد. انقباض زودرس بطنی منفرد (Single PVC)، تاکیکاردی بطنی (VT)، فیبریلاسیون بطنی (VF)، امتیازدهی در جدول (۱)، شرح داده شده است:

مطالعه مولکولی: برای بررسی بیان ژن کانال‌های HCN1 و HCN2 دهلیزهای جدا شده در داخل نیتروژن مایع نگهداری شده و پس از آن استخراج RNA با استفاده از کیت کیاژن (QIAGEN) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای از بین بردن DNA ژنومیک از DNase استفاده شد. جهت تبدیل RNA استخراج شده به cDNA از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس و OligodT₁₆ استفاده شد. برای انجام PCR ابتدا دمای واکنش PCR را برای پرایمرهای HCN1 و HCN2 بهینه سازی کرده سپس با استفاده از sybr green و دستگاه real-time PCR (ساخت شرکت کیاژن) میزان بیان

ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. محاسبات به روش $\Delta\Delta CT$ انجام گرفت. از RNA ریبوزومی 18s به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی پرایمرها به شرح زیر است:

HCN1: F: 5'-CTCTCTTTGCTAACGCGGAT,
R: 5'-TTGAAATTGTCCACCGAA

HCN2: F: 5'-GGAATCGACTCCGAGGTCTAC,
R: 5'-GACTGAGGATCTTGGTGAACG

18s: F: 5'-ATCACCTTTTCGATGGTAGTCG, R:
5'-TCCTTGATGTGGTAGCC

آنالیز آماری: داده‌ها توسط نرم‌افزار prismGraphpad

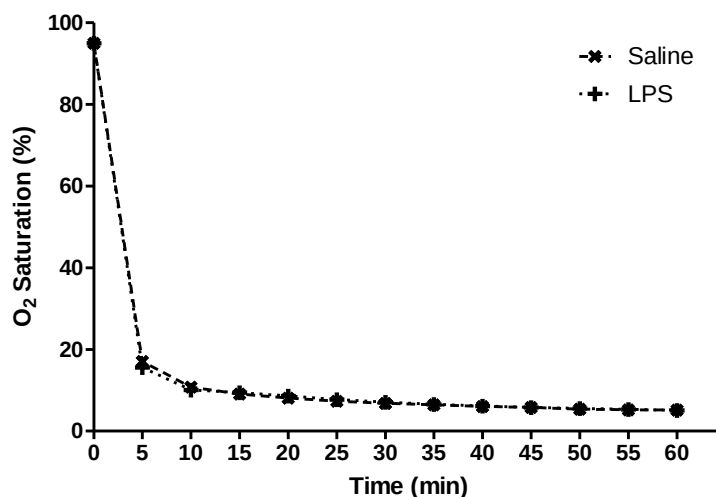
آنالیز شده و به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده‌اند. برای مقایسه دو گروه از t-test و یا معادل غیر پارامتریک آن (در صورتی که داده‌ها توزیع نرمال نداشته باشند) استفاده شد. برای مقایسه بیش از دو گروه از آنالیز واریانس دوطرفه و پس آزمون Bonferroni استفاده شد. برای آنالیز زمان وقوع آریتمی‌ها از نمودار کاپلان-مایر و پس آزمون Chi-square استفاده شد. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

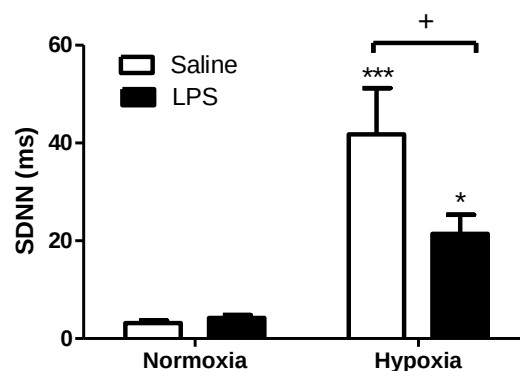
درصد اشباع اکسیژن در محلول فیزیولوژیک قبل و بعد از ایجاد هیپوکسی اندازه‌گیری شد. در هر دو گروه مورد آزمایش (گروهی که نرمال سالی‌ن دریافت کرده بود و گروهی که اندوتوکسین دریافت کرده بود) میزان اشباع اکسیژن به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت به طوری که بعد از ۲۰ دقیقه به میزان پایدار رسید (شکل ۱). نیم ساعت پس از القا هیپوکسی میزان درصد اشباع اکسیژن در گروه شاهد 6.8 ± 0.1 و در گروه اندوتوکسین گرفته 7.1 ± 0.2 اندازه‌گیری شد. اختلاف معناداری بین گروه‌های آزمایشی وجود نداشت.

برای بررسی و مقایسه تغییرات دینامیکی ضربان قلب ایزوله در دو گروه شاهد و اندوتوکسمیک، ضربانات در ۵ دقیقه ثبت پایه، ۳۰ دقیقه بعد از آغاز هیپوکسی انتخاب شده و به صورت فایل ASCII در آمده و شاخص‌های SDNN و DFA آن‌ها محاسبه شد و نتایج به دست آمده در شکل‌های (۲-۵) نشان داده شده است.

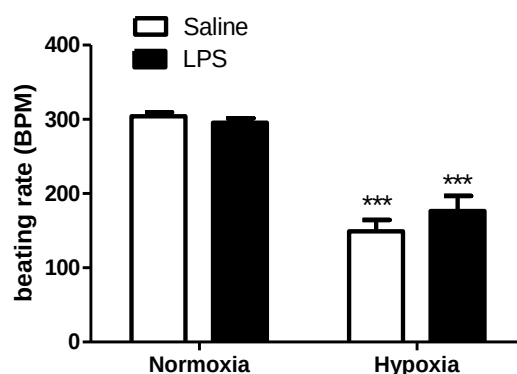
همانطور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود هیپوکسی منجر



شکل ۱- درصد اشباع اکسیژن در دو گروه اندوتوکسمیک و شاهد.



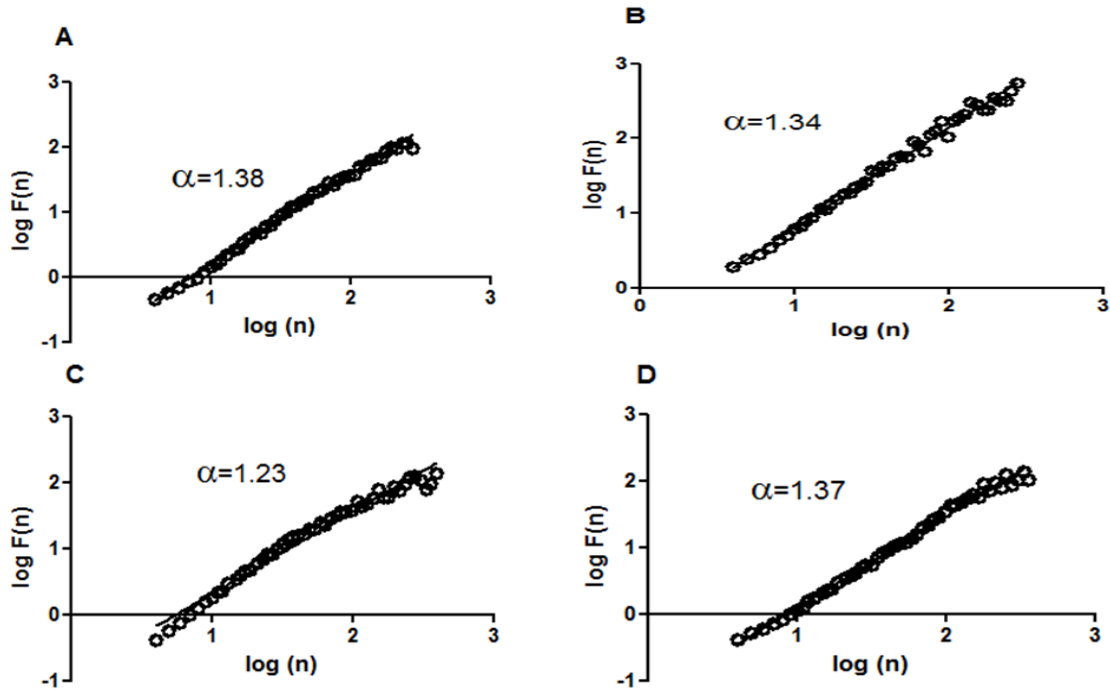
شکل ۲- اثر تزریق داخل صفاقی LPS با دوز 1mg/kg بر شاخص SDNN قلب ایزوله در حالت نرموکسی و ۳۰ دقیقه بعد از آغاز هیپوکسی در گروه‌های شاهد و اندوتوکسمیک که ۳ ساعت بعد از تزریق، قلب ایزوله شد. در هر گروه ۱۲ موش صحرایی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده است، از آنالیز واریانس دوطرفه و پس‌آزمون بون‌فرونی استفاده شد. $P < 0.001$ ***، $P < 0.05$ * در مقایسه گروه نرموکسی. $P < 0.05$ + در مقایسه گروه اندوتوکسمیک و گروه شاهد.



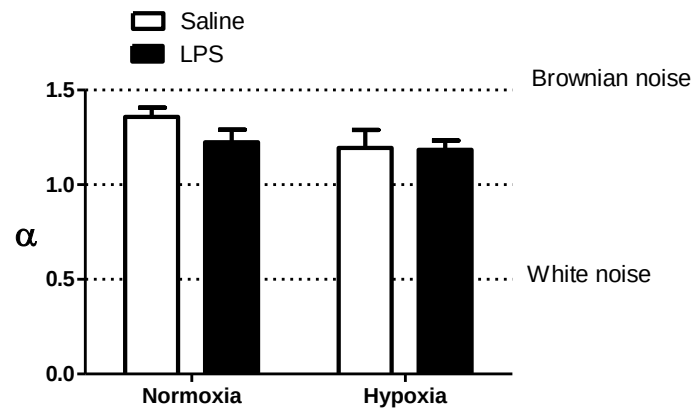
شکل ۳- اثر تزریق داخل صفاقی LPS با دوز 1mg/kg بر ضربانات قلب ایزوله در حالت نرموکسی و ۳۰ دقیقه بعد از آغاز هیپوکسی در گروه‌های شاهد و اندوتوکسمیک که ۳ ساعت بعد از تزریق، قلب ایزوله شد. در هر گروه ۱۲ موش صحرایی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده است، از آنالیز واریانس دوطرفه و پس‌آزمون بون‌فرونی استفاده شد. $P < 0.001$ *** در مقایسه گروه نرموکسی.

اثر LPS و هیپوکسی تداخل وجود دارد ($P < 0.05$)، و این بدان مفهوم است که هیپوکسی در گروه شاهد و اندوتوکسمیک اثر متفاوتی بر SDNN می‌گذارد. همانطور که

به افزایش پراکندگی ضربانات قلب شد. تحلیل آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که هیپوکسی اثر معناداری بر SDNN می‌گذارد ($P < 0.0001$). این تحلیل همچنان نشان داد که بین



شکل ۴- اثر تزریق داخل صفاقی LPS با دوز 1mg/kg بر شیب خط (α) در قلب ایزوله در حالت نرموکسی و ۳۰ دقیقه بعد از آغاز هیپوکسی در گروه شاهد و گروه اندوتوکسمیک که ۳ ساعت بعد از تزریق، قلب ایزوله شد. A: شیب خط (α) در گروه کنترل در حالت نرموکسی. B: شیب خط (α) در گروه کنترل در حالت هیپوکسی. C: شیب خط (α) در گروه اندوتوکسمیک در حالت نرموکسی. D: شیب خط (α) در گروه اندوتوکسمیک در حالت هیپوکسی. تفاوت معناداری بین شیب خط در دو گروه قبل و بعد از هیپوکسی مشاهده نشد.

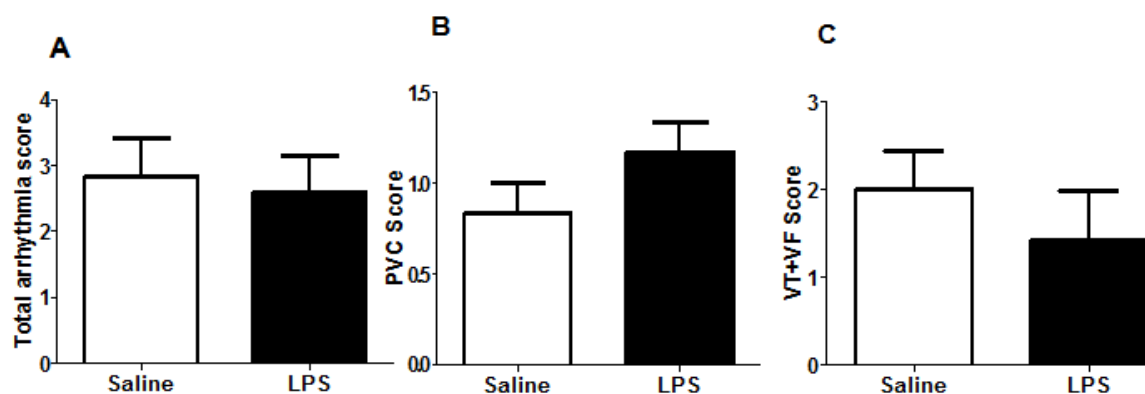


شکل ۵- اثر تزریق داخل صفاقی LPS با دوز 1mg/kg بر شیب خط (α) در قلب ایزوله در حالت نرموکسی و ۳۰ دقیقه بعد از آغاز هیپوکسی در گروه‌های شاهد و اندوتوکسمیک که ۳ ساعت بعد از تزریق، قلب ایزوله شد. در هر گروه ۱۲ موش صحرایی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده است.

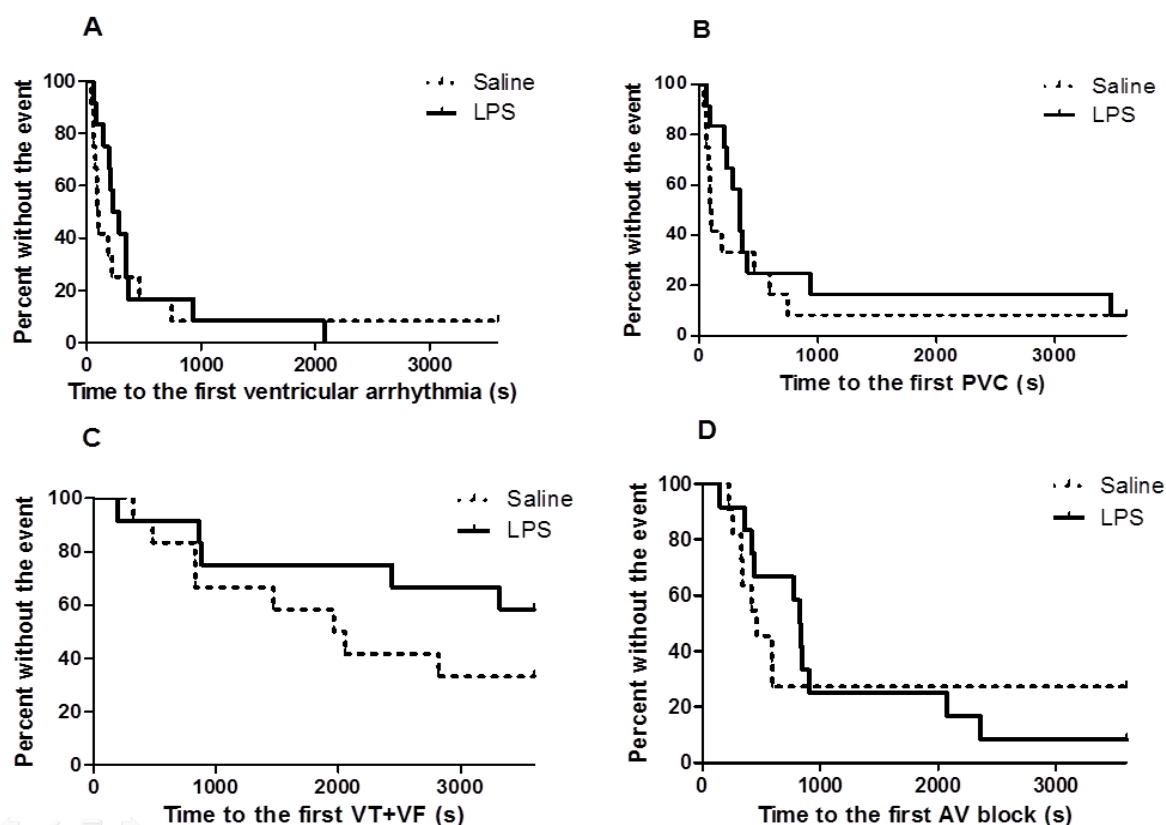
اندوتوکسمیک شده است. آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که این اختلاف معنادار است ($P < 0.0001$). ولی تداخلی بین اثر هیپوکسی و LPS در کاهش ضربان قلب وجود ندارد ($P = 0.19$). این بدان معناست که هیپوکسی در حیوانات گروه اندوتوکسمیک نسبت به حیوانات گروه شاهد ریت ضربان قلب را به طور متفاوت تغییر نمی‌دهد. پس آزمون آماری نشان داد که بین دو گروه در حالت‌های نرموکسی و هیپوکسی اختلاف معناداری در ضربان وجود ندارد.

در این شکل مشاهده می‌شود میزان افزایش SDNN در گروه اندوتوکسمیک به مراتب کمتر از گروه شاهد است. پس آزمون آماری نشان داد که در حالت نرموکسی بین گروه اندوتوکسمیک و شاهد اختلاف معناداری در SDNN وجود ندارد ولی به دنبال هیپوکسی اختلاف معناداری ($P < 0.05$) میان دو گروه وجود دارد.

همانطور که در شکل (۳) مشاهده می‌شود هیپوکسی منجر به کاهش ریت ضربان قلب ایزوله در هر دو گروه شاهد و



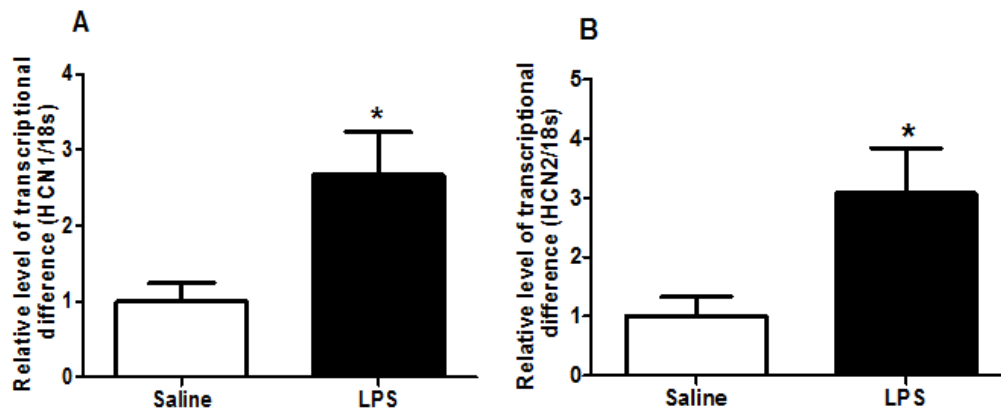
شکل ۶- اثر تزریق داخل صفاقی LPS با دوز 1mg/kg بر شدت آریتمی‌های بطنی حاصل از هیپوکسی در قلب ایزوله، A: مقایسه امتیاز کل آریتمی‌ها (total arrhythmia score). B: مقایسه امتیاز مجموع کل ضربان‌های زودرس بطنی (PVC Score). C: مقایسه امتیاز مجموع شدت تاکیکاردی و فیبریلاسیون بطنی (VT+VF Score). در هر گروه ۱۲ موش صحرایی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده است، برای مقایسه دو گروه از t-test استفاده شد.



شکل ۷- اثر تزریق داخل صفاقی LPS با دوز 1mg/kg بر زمان وقوع اولین آریتمی‌های بطنی حاصل از هیپوکسی در قلب ایزوله، A: مقایسه زمان وقوع اولین آریتمی بطنی (Time to the first ventricular arrhythmia). B: مقایسه زمان وقوع اولین کمپلکس زودرس بطنی منفرد (Time to the first PVC). C: مقایسه زمان وقوع اولین تاکیکاردی و فیبریلاسیون بطنی (Time to the first VT+VF). D: مقایسه زمان وقوع اولین بلوک گره دهلیزی بطنی (Time to the first AV block). در هر گروه ۱۲ موش صحرایی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده است.

برای مقایسه بعد فرکتالی شیب خط‌ها در گروه‌های مورد آزمایش اندازه‌گیری شد که در شکل (۵) آورده شده است. همانطور که در شکل (۵) مشاهده می‌شود شیب خط با تزریق LPS و چه با هیپوکسی تغییری نمی‌کند و در محدوده بین ۱ و ۱/۵ قرار دارد. آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که

ساختار فرکتالی ضربانات قلب ایزوله در حالت نورموکسی و هیپوکسی با روش DFA مورد مطالعه قرار گرفت، همانطور که در شکل (۴) مشاهده می‌شود در هر چهار گروه $\text{LogF}(n)$ به $\text{Log}(n)$ رابطه خطی نشان می‌دهد و بیانگر آن است که ساختار تغییرات ضربانات قلب ایزوله ساختاری فرکتالی است.



شکل ۸- اثر تزریق داخل صفاقی LPS با دوز 1mg/kg بر میزان بیان ژن HCN1 و HCN2، از 18SRNA ریبوزومی به عنوان ژن خانه دار استفاده شد. در هر گروه ۱۲ موش صحرایی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده است. برای مقایسه دو گروه از t-test استفاده شد. $P < 0.05$ * به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

اندوتوکسمیک در هر چهار نوع آریتمی مشاهده نشد.

اثر تزریق داخل صفاقی اندوتوکسین بر میزان بیان ژن HCN1 و HCN2: بیان ژن HCN1 و HCN2 با روش RT-PCR کمی در دهلیز حیوانات گروه شاهد و گروه اندوتوکسمیک بررسی شد. همانطور که در شکل (۸) مشاهده می شود، این مطالعه نشان داد که میزان بیان ژن HCN1 و HCN2 در گروه اندوتوکسمیک نسبت به گروه شاهد که سه ساعت پس از تزریق دهلیز ایزوله شده بود، به طور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش پیدا کرد.

بحث

تغییرات ضربان قلب در حالت فیزیولوژیک الگوی پیچیده ای را نشان می دهد. در بیماری های مختلف از جمله التهاب سیستمیک میزان این پیچیدگی تغییر می کند [۸، ۲۲]. التهاب سیستمیک می تواند به علت های مختلفی ایجاد شود که یکی از آنها ورود باکتری به داخل خون است که در این حالت به آن سپسیس گفته می شود. سالانه تعداد زیادی از افراد به دنبال سپسیس جانشان را از دست می دهند که یکی از علت های آن نارسایی تنفسی و هیپوکسمی حاصل از آنهاست [۱۱، ۱۹]. در میان عواملی که با میزان بقا بیماران مبتلا به سپسیس در ارتباط هستند به تغییرات دینامیک ضربان قلب بر می خوریم که بر پیچیدگی مکانیسم های تنظیمی در بدن دلالت دارد، به طوریکه در مطالعاتی نشان داده شده است که میزان تغییرات ضربان قلب (HRV) به طور معناداری در

بین دو گروه اندوتوکسمیک و شاهد اختلاف معناداری وجود ندارد.

بررسی شدت آریتمی ها در زمان هیپوکسی بر اساس مدل لمبس، شکل (۶): در بررسی شدت، آریتمی های ایجاد شده در دوره زمانی ۱ ساعت هیپوکسی از نظر مجموع تعداد کمپلکس های زودرس بطنی منفرد، بای ژمینی و سالووس (مجموع کل ضربان های زودرس بطنی)، طول مدت VT و VF و همچنین تعداد دوره های VT (Episode) و VF مورد بررسی قرار گرفتند و آریتمی ها از نظر امتیاز مقایسه شدند. اثر تزریق داخل صفاقی LPS با دوز 1mg/kg بر میزان کل آریتمی های حاصل از هیپوکسی (شکل ۳A)، مجموع کل ضربان های زودرس بطنی حاصل از هیپوکسی (شکل ۳B)، مجموع شدت تکی کاردی و فیبریلاسیون بطنی حاصل از هیپوکسی (شکل ۳C)، در قلب ایزوله در گروه شاهد و گروه اندوتوکسمیک را نشان می دهد که ۳ ساعت بعد از تزریق، قلب ایزوله شد. تفاوت معناداری بین دو گروه در شدت انواع آریتمی های ذکر شده وجود ندارد.

بررسی زمان وقوع اولین آریتمی با استفاده از نمودار کاپلان-مایر: اولین آریتمی بطنی از هر نوع، اولین کمپلکس زودرس بطنی منفرد، اولین VF+VT و اولین بلوک گره دهلیزی بطنی مورد بررسی قرار گرفتند. شکل (۷) اثر تزریق داخل صفاقی اندوتوکسین بر زمان وقوع اولین آریتمی های بطنی حاصل از هیپوکسی در قلب ایزوله در گروه شاهد و گروه اندوتوکسمیک را نشان می دهد که ۳ ساعت بعد از تزریق، قلب ایزوله شد. تفاوت معناداری بین گروه شاهد و گروه

افزایش یافت که می‌تواند پیشنهاد کننده‌ی یک مکانیسم جبرانی برای کاهش جریان این کانال‌ها در التهاب سیستمیک باشد. این یافته‌ها بیانگر آن است که علاوه بر تنظیم اتونوم ممکن است مطالعه تغییرات عملکردی ضربان‌ساز قلب در پاتوفیزیولوژی مشکلات ریتم قلب در سپسیس نقش ایفا کند.

در سال ۱۹۹۵ پنگ و همکارانش برای نشان دادن ساختار فرکتالی از روش تحلیل نوسانات بی‌روند شده (DFA) استفاده کردند [۲۰]. زیلولت و همکاران با روش‌های دینامیک غیر خطی نشان داده‌اند که تغییرات ضربانات قلب ایزوله دارای ساختار فرکتالی با دینامیک $1/f$ است [۲۷] اما تاکنون مطالعه‌ای که نشان دهنده وجود ساختار فرکتالی با روش تحلیل نوسانات بی‌روند شده در قلب ایزوله باشد وجود نداشته است. در بررسی ساختار فرکتالی ضربان قلب اولاً رابطه لگاریتم پراکندگی و لگاریتم مقیاس در گروه‌های آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این رابطه در هر دو گروه خطی است که بیانگر آن است که سری زمانی دارای ساختار فرکتالی است. ثانیاً شیب خط در هر دو گروه بین ۱ و $1/5$ است یعنی ساختار دینامیکی بینابین $1/f$ noise و Brownian noise است، که نشان دهنده این است تغییرات ضربانات قلب در مقیاس‌های مختلف در هر دو گروه دارای یک همبستگی نسبی هستند. این یافته با مطالعات اخیر غلامی و همکاران که بر روی ضربانات قلب حیوان هوشیار انجام شده هم‌خوانی دارد [۶]. این محققان نشان دادند که ساختار فرکتالی ضربان قلب بسیار پایدار است و با تزریق اندوتوکسین باکتری‌های گرم منفی دچار تغییر نمی‌شود. یافته جدید مطالعه ما آن است ساختار فرکتالی حتی پس از قطع شدن تنظیم اتونوم نیز وجود دارد و این ساختار دینامیکی نیم ساعت پس از هیپوکسی شدید نیز حفظ می‌شود. اهمیت این ساختار در فیزیولوژی ضربان قلب به درستی مشخص نیست و مطالعات بیشتری در آینده ممکن است پرده از حفظ این ساختار در هنگام سلامت و بیماری بر دارد.

در قسمت دوم مطالعه میزان حساسیت به فیبریلاسیون دهلیزی و آریتمی‌های مختلف بطنی مورد مطالعه قرار گرفت. قبل از ایجاد هیپوکسی هیچ گونه آریتمی دهلیزی و یا بطنی در قلب‌های ایزوله بر گرفته شده از حیوانات اندوتوکسمیک مشاهده نشد و میزان آریتمی‌های پس از هیپوکسی در دو

التهاب سیستمیک کاهش می‌یابد [۲۲]. و در مطالعه‌ای که توسط مورمن و همکارانش بر روی نوزادان مبتلا به سپسیس انجام شد دیده شد که این کاهش HRV همبستگی قابل ملاحظه‌ای با میزان بقا و پیش‌آگهی بیماری دارد. به طوری که در بیماران مبتلا به سپسیس با کاهش HRV میزان مرگ و میر افزایش می‌یابد [۱۸]. از آنجا که بیماران مبتلا به سپسیس می‌توانند دچار شوک سپتیک و کاهش پرفیوژن بافتی و نارسایی چندگانه اعضا از جمله ریه و به دنبال آن هیپوکسی شوند، می‌توان این سؤال را مطرح کرد که آیا در بیمار مبتلا به سپسیس استعداد تغییرات ریتم قلب به آسیب ناشی از هیپوکسی بیشتر است یا خیر [۱۱].

در قسمت اول مطالعه اثر اندوتوکسمی بر تغییرات دینامیکی ضربان قلب ایزوله بررسی شد. ابتدا میزان انحراف معیار فواصل ضربانات متوالی (SDNN) در قلب ایزوله بررسی شد که این شاخص نشان دهنده میزان کل پراکندگی در ضربانات قلب است. در ضربانات قلب ایزوله در حالت نوروموکسی میزان پراکندگی ضربانات بین گروه شاهد و گروه اندوتوکسمیک اختلاف معناداری وجود ندارد ولی پس از نیم ساعت استرس (کاهش درصد اشباع اکسیژن) میزان پراکندگی ضربانات (SDNN) به طور معناداری در گروه اندوتوکسمیک کمتر از گروه شاهد است. این بدان معنا است که قلب ایزوله حیوان اندوتوکسمیک از نظر دینامیکی پاسخ‌دهی متفاوتی نسبت به حیوانات گروه شاهد دارند. نکته قابل توجه آن است که قلب ایزوله تنظیم اتونوم وجود ندارد و این بدان معنا است که تنظیم اتونوم تنها عامل موثر در افت تغییرپذیری دینامیکی ضربان قلب در هنگام التهاب سیستمیک نیست. این یافته با مطالعات پیشین هم‌خوانی دارد که نشان داد انکوباسیون سلول‌های دهلیزی با اندوتوکسین بر پراکندگی ضربانات خود به خودی قلب موثر است. مطالعات اخیر پیشنهاد داده است که ممکن است اندوتوکسین بر جریانات یونی وابسته به کانال‌های HCN موثر بوده و این امر ممکن است نقشی در کاهش HRV در سپسیس داشته باشد [۱۵]. یافته این پژوهش نشان داد که التهاب سیستمیک می‌تواند بیان ژن کانال‌های HCN1 و HCN2 را به طور چشم‌گیری تغییر دهد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که میزان جریان این کانال‌ها کاهش می‌یابد [۱۵]. اما در این تحقیق میزان بیان ژن این کانال‌ها

حفره دهلیز وجود ندارد و بافت دهلیز به حد فیزیولوژیک دچار کشیدگی نمی‌شود. مطالعات قبلی ما نشان داده است که میزان بیان سایتوکاین‌های التهابی در دهلیز موش صحرایی ۳ ساعت بعد از تزریق اندوتوکسین به طور معناداری افزایش پیدا می‌کند [۶]. مطالعات آینده با استفاده از روش‌های تجربی که به حالت فیزیولوژیک نزدیکتر باشند ممکن است شواهدی به نفع یا ضرر نقش مدیاتورهای التهابی در آریتمی‌های دهلیزی فراهم کند.

در این تحقیق ساختار دینامیکی ضربانات قلب ایزوله و میزان بیان کانال‌های ضربان‌ساز در حیوان اندوتوکسمیک با حیوانات سالم مقایسه شد. نتایج نشان داد که ساختار تغییرات ضربانات قلب ایزوله ساختاری فرکتالی دارد و این ساختار در اندوتوکسمی تغییر نمی‌کند. میزان پراکندگی ضربانات و بیان کانال‌های ضربان‌ساز در اندوتوکسمی تغییر می‌کند و این امر ممکن است در پاتوفیزیولوژی مشکلات ریتم قلب در سپسیس نقش ایفا کند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

گروه آزمایشی اختلاف معناداری یافت نشد. آریتمی‌های مشاهده شده شامل بلوک دهلیزی بطنی و ضربانات ناب‌جای بطنی و فیبریلاسیون بطنی بود. پاسخ قلب‌های ایزوله به هیپوکسی به صورت برادیکاردی دهلیزی در دو گروه تفاوت معناداری نداشت به نظر می‌رسد برادیکاردی دهلیزی یک پاسخ تطبیقی به هیپوکسی باشد و هم در حیوانات سالم و هم در حیوانات اندوتوکسمیک به طور یکسان وجود دارد. هیچ گونه فیبریلاسیون یا تاکیکاردی دهلیزی به دنبال هیپوکسی مشاهده نشد. به نظر می‌رسد هیپوکسی حاد عامل اصلی فیبریلاسیون دهلیزی نباشد مطالعات بالینی نیز نشان داده است که عامل اصلی مستعد کننده فیبریلاسیون دهلیزی کشیده شدن (strain) طولانی مدت دهلیز می‌باشد [۲۶]. به نظر می‌رسد بر اساس یافته سایر محققان مدیاتورهای التهابی ممکن است در پاتوژنز آریتمی‌های دهلیزی نقش داشته باشند [۱۲]. هر چند در مطالعه حاضر یافته‌ای به نفع این ادعا پیدا نشد. مدل تجربی استفاده شده در مطالعه حاضر ممکن است پیچیدگی لازم جهت مطالعه اثر التهاب سیستمیک بر آریتمی دهلیزی (فیبریلاسیون) را نداشته باشد. به عنوان مثال در روش لانگندورف از آنجایی که بافت فقط قلب از طریق عروق کرونر مورد تغذیه قرار می‌گیرد جریان فیزیولوژیک مایع در

References

- [1] Altimiras J, Understanding autonomic sympathovagal balance from short-term heart rate variations. Are we analyzing noise? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 124 (1999) 447-460.
- [2] Andreoli, Thomas E., Charles C.J., Carpenter, and Russell L. Cecil. *Andreoli and Carpenter's Cecil Essentials of Medicine*. Philadelphia: Saunders, 2007.
- [3] Beckers F, Verheyden B, Couckuyt K, Aubert AE, Fractal dimension in health and heart failure. *Biomed Tech (Berl)* 51 (2006) 194-197.
- [4] Butler IB, Schoonen MA, Rickard DT, Removal of dissolved oxygen from water: A comparison of four common techniques. *Talanta* 41 (1994) 211-215.
- [5] Ewing DJ, Martin CN, Young JR, Clarke BF, The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 year experience in diabetes. *Diabetic care* 8 (1985) 491-498.
- [6] Gholami M, Mazaheri P, Mohamadi A, Dehpour T, Safari F, Hajizadeh S, Moore KP, Mani AR, Endotoxemia is associated with partial uncoupling of cardiac pacemaker from cholinergic neural control in rats. *Shock* 37 (2012) 219-227.
- [7] Gisigeir T, Scale invariance in biology: Coincidence or footprint of a universal mechanism? *Biol Rev Camb Philos Soc* 76 (2001) 161-209.
- [8] Godin PJ, Fleisher LA, Eidsath A, Vandivier RW, Preas HL, Banks SM, Buchman TG, Suffredini AF, Experimental human endotoxemia increases cardiac regularity: results from a prospective, randomized, crossover trial. *Crit Care Med* 24 (1996) 1117-1124.
- [9] Goldberger AL, Amaral LA, Hausdorff JM, Ivanov PCh, Peng CK, Stanley HE, Fractal dynamics in physiology: alterations with disease and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 2466-2472.
- [10] Goldberger AL, Nonlinear dynamics, fractals and chaos:

- Applications to cardiac electrophysiology. *Ann Biomed Eng* 18 (1990) 195-198.
- [11] Goodman S, Weiss Y, Weissman C, Update on cardiac arrhythmias in the ICU. *Curr Opin Crit Care* 14 (2008) 549-54.
- [12] Hadi HA, Alsheikh-Ali AA, Mahmeed WA, Suwaidi JM, Inflammatory cytokines and Atrial fibrillation: current and prospective views. *J Inflamm Res* 3 (2010) 75-97.
- [13] Imani A, Faghihi M, Sadr SS, Keshavarz M, Niaraki SS, Noradrenaline Reduces Ischemia Induced Arrhythmia in Anesthetized Rats: Involvement of $\alpha 1$ Adrenoceptors and Mitochondrial KATP Channels. *J Cardiovasc Electrophysiol* 19 (2008) 309-315.
- [14] Kleiger RE, Stein PK, Bigger JT Jr, Heart Rate Variability: measurement and clinical utility. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 10 (2005) 88-101.
- [15] Klöckner U, Rueckschloss U, Grossmann C, Ebelt H, Müller-Werdan U, Loppnow H, Werdan K, Gekle M. Differential reduction of HCN channel activity by various types of lipopolysaccharide. *J Mol Cell Cardiol* 51 (2011) 226-235.
- [16] Mäkilä TH, Huikuri HV, Hintze U, Videbaek J, Mitrani RD, Castellanos A, Myerburg RJ, Møller M; DIAMOND Study Group (Danish Investigations of Arrhythmia and Mortality ON Dofetilide). Fractal analysis and time- and frequency-domain measures of heart rate variability as predictors of mortality in patients with heart failure. *Am J Cardiol* 87 (2001) 178-182.
- [17] Mandelbrot B. *The Fractal Geometry of Nature*. New York: W.H. Freeman and Company 1982.
- [18] Moorman JR, Lake DE, Griffin MP, Heart rate characteristics monitoring for neonatal sepsis. *IEEE Trans Biomed Eng* 53 (2006) 126-32.
- [19] Muller-Werdan U, Buerke M, Ebelt H, Heinroth KM, Herklotz A, Loppnow H, Ruß M, Schlegel F, Schlitt A, Schmidt HB, Söffker G, Werdan K, Septic cardiomyopathy—A not yet discovered cardiomyopathy?. *Exp Clin Cardiol* 11 (2006) 226-233.
- [20] Peng CK, Havlin S, Stanley HE, Goldberger AL, Quantification of scaling exponents and crossover phenomenon in nonstationary heart beat time series. *Chaos* 5 (1995) 82-87.
- [21] Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA, Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8 (2008) 776-787.
- [22] Schmidt H, Saworski J, Werdan K, Müller-Werdan U: Decreased beating rate variability of spontaneously contracting cardiomyocytes after co-incubation with endotoxin. *J Endotoxin Res* 13 (2007) 339-342.
- [23] Scicchitano P, Carbonara S, Ricci G, Mandurino C, Locorotondo M, Bulzis G, Gesualdo M, Zito A, Carbonara R, Dentamaro I, Riccioni G, Ciccone MM. HCN channels and heart rate. *Molecules* 17 (2012) 4225-4235.
- [24] Tateishi Y, Oda S, Nakamura M, Watanabe K, Kuwaki T, Moriguchi T, Hirasawa H, Depressed heart rate variability is associated with high IL-6 blood level and decline in the blood pressure in septic patients. *Shock* 28 (2007) 549-553.
- [25] Werdan K, Schmidt H, Ebelt H, Zorn-Paully K, Koidl B, Hoke RS, Heinroth K, Muller-Werdan U, Impaired regulation of cardiac function in sepsis, SIRS, and MODS. *Can J Physiol Pharmacol* 87 (2009) 266-274.
- [26] Yoon YE, Kim HJ, Kim SA, Kim SH, Park JH, Park KH, Choi S, Kim MK, Kim HS, Cho GY, Left atrial mechanical function and stiffness in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *J Cardiovasc Ultrasound* 20 (2012) 140-145.
- [27] Zbilut JP, Mayer-Kress G, Sobotka PA, O'Toole M, Thomas JX Jr, Bifurcations and intrinsic chaotic and 1/f dynamics in an isolated perfused rat heart. *Biol Cybern* 61 (1989) 371-378.
- [28] Zorn-Paully K, Pelzmann B, Lang P, Mächler H, Schmidt H, Ebelt H, Werdan K, Koidl B, Müller-Werdan U: Endotoxin impairs the human pacemaker current If. *Shock* 28 (2007) 655-661.