



Protective role of cyclosporine on the model simulated the rotational nodal arrhythmia (AVNRT) by using extracellular field potential recordings of isolated atrioventricular-node of rabbit

Vahid Khor¹, Sepideh Shariat nejad², Ali-mohammad Alizadeh³, Hamid Reza Yazdi¹, Mona pourabouk¹, Fakhri Badaghabadi¹, Hamid Reza Moheimani², Shima Changizi¹, Maryam Rajaei¹, Mohsen Nayebpour^{4*}

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

2. Dept. Pharmacology, Golestan Cardiovascular Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

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

4. Dept. Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 22 Jun 2010

Accepted: 9 March 2011

Abstract

Introduction: Recent studies have shown acute cardioprotective effects of cyclosporine. The aim of the present study was to determine the protective role of cyclosporine on the model simulated the rotational nodal arrhythmia (AVNRT) by using extracellular field potential recordings of isolated atrioventricular-node (AV-node) of rabbit.

Methods: This study was performed on isolated double-perfused AV-node of male New Zealand rabbits (1.5-2.5 kg) in one group (n=7). Basic and rate-dependent stimulation protocols (recovery, facilitation, fatigue) and arrhythmia threshold (index of refractoriness) and % Gap incidence were measured for assessment of electrophysiological properties of the AV- node. All stimulation protocols were repeated in control step and in the presence of various cumulative concentrations of cyclosporine (0.5 - 10 μ M).

Results: Cyclosporine prolonged the effective refractory period from 114.3 \pm 7.9 to 142 \pm 7.3 msec at the concentration of 10 μ M. It also prolonged the functional refractory period from 162 \pm 3.3 to 178.6 \pm 5 msec and increased the time of Wenckebach at the concentrations of 5 - 10 μ M. Various concentrations of cyclosporine increased fatigue and reached a significant level at 10 μ M. Gap incidence was 82%, 16.6% and 20% in the control and treatments with 0.5 and 10 μ M of cyclosporine, respectively.

Conclusion: Block of MPTP by cyclosporine caused inhibition of basic and rate-dependent properties of atrioventricular node. Cyclosporine, by raising the threshold of arrhythmia, could be possibly considered as an anti-AVNRT drug.

Key words: Atrio-ventricular node, Cyclosporine, Supraventricular Arrhythmia

* Corresponding author e-mail: vaph99@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

نقش محافظتی سیکلوسپورین بر روی مدل شبیه سازی شده ی آریتمی چرخشی گرهی (AVNRT) با استفاده از ثبت پتانسیل خارج سلولی میدانی گره ی دهلیزی-بطنی جدا شده خرگوش

وحید خوری^۱، سپیده شریعت نژاد^۲، علی محمد علیزاده^۳، حمید رضا یزدی^۱، منا پورابوک^۱، فخری بداع آبادی^۱، حمید رضا مهیمنی^۲، شیمیا چنگیزی^۱،
مریم رجائی^۱، محسن نایب پور^{۴*}

۱. مرکز تحقیقات قلب و عروق گلستان، دانشکده پزشکی فلسفی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان

۲. گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات قلب و عروق گلستان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان

۳. مرکز تحقیقات کانسر، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

۴. گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

پذیرش: ۱۸ اسفند ۸۹

دریافت: ۱ تیر ۸۹

چکیده

مقدمه: هدف مطالعه حاضر تعیین نقش محافظتی سیکلوسپورین بر روی مدل شبیه سازی شده آریتمی چرخشی گرهی (AVNRT) با استفاده از ثبت پتانسیل خارج سلولی میدانی گره دهلیزی-بطنی جدا شده خرگوش می باشد.

روش ها: این مطالعه در مدل گره دهلیزی - بطنی جدا شده خرگوشهای نر نژاد نیوزیلندی (۱/۵-۲/۵ کیلوگرم) با پرفیوژن دوگانه در یک گروه انجام شد (n=7). پروتکل های پایه و وابسته به سرعت (ریکاوری، تسهیل، خستگی) و تعیین آستانه آریتمی (ایندکس تحریک پذیری) و درصد شکاف (Gap) جهت ارزیابی خواص الکتروفیزیولوژیک گره دهلیزی - بطنی اجرا شدند. تمامی پروتکل های تحریکی در مرحله کنترل و همچنین در حضور غلظت های مختلف تراکمی سیکلوسپورین (۰/۵-۱۰ میکرو مولار) تکرار شدند. تمام نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده است.

یافته ها: سیکلوسپورین در ۱۰ میکرومولار دوره تحریک ناپذیری موثر گره را از $114/3 \pm 7/9$ به $142 \pm 7/3$ میلی ثانیه و در غلظت های ۵ و ۱۰ میکرومولار دوره تحریک ناپذیری کارکردی را از $162 \pm 3/3$ به $178/6 \pm 5$ میلی ثانیه رسانید و همچنین سبب افزایش زمان و نکباز گردید. غلظت های مختلف سیکلوسپورین خستگی را افزایش داد و در ۱۰ میکرو مولار به سطح معنی داری رسید. درصد شکاف ۸۲٪، ۱۶/۶٪ و ۲۰٪ به ترتیب در کنترل، ۵ و ۱۰ میکرومولار محاسبه شد.

نتیجه گیری: بلاک MPTP توسط سیکلوسپورین سبب مهار خواص پایه و وابسته به سرعت گره ی دهلیزی بطنی شده و توسط افزایش آستانه آریتمی می تواند به عنوان یک داروی ضد آریتمی گرهی (AVNRT) مطرح شود.

واژه های کلیدی: گره دهلیزی -بطنی، سیکلوسپورین، آریتمی فوق بطنی

مقدمه

زنان بیشتر از مردان است، ولی شیوع آن در کودکان زیاد نیست [۱]. این آریتمی ها عمدتاً به علت ارتباط متقابل بین مسیر آهسته و سریع در گره دهلیزی - بطنی بوجود می آیند. مهمترین خواص الکتروفیزیولوژیک گره در ایجاد و کنترل آریتمی ارتباط بین هدایت گره ای، تحریک ناپذیری گره ای و هدایت پنهان است [۲]. مطالعات زیادی در ارتباط با مکانیسم

تاکی آریتمی های چرخشی (AVNRT) یکی از متداول ترین انواع تاکی کاردیهای حمله ای فوق بطنی است [۳] که در

vaph99@yahoo.com

* نویسنده مسئول مکاتبات:

www.phypha.ir/ppj

وبگاه مجله:

آریتمی، تحقیق فوق با هدف بررسی نقش محافظتی سیکلوسپورین بر روی مدل شبیه سازی شده ی آریتمی چرخشی گرهی (AVNRT) با استفاده از ثبت پتانسیل خارج سلولی میدانی گره ی دهلیزی-بطنی جدا شده خرگوش طراحی شده است.

مواد و روش ها

در آزمایش های انجام شده از خرگوش های نر نژاد نیوزلندی انیستیتو پاستور در محدوده وزنی ۱/۵ تا ۲/۵ کیلوگرم استفاده شد. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان رعایت گردید. نگهداری حیوانات، تغذیه، بیهوشی و جراحی و نحوه جدا کردن و قرار دادن نمونه در محفظه و پرفیوژن نمونه بافتی مطابق آزمایشات قبلی انجام داده شد [۱۶]. بطور خلاصه بعد از قرار دادن نمونه در محفظه توسط الکتروود تک قطبی از نواحی گره سینوسی-دهلیزی، کریستا ترمینالیس، سپتوم بین دهلیزی و دسته هیس ثبت خارج سلولی پتانسیل میدانی با استفاده از الکتروود نقره پوشش دار تقوونی با قطر ۱۰۰ میکرون و با فیلترهای گذر بالا و پایین (۱۰۰-۱ KHz) و تقویت تا حد ۱۰۰۰۰ برابر با استفاده از آمپلی فایر ISODAM6 (WPI.Co) و سرعت ضربانات پایه قلب مشخص می شد. سپس به کمک الکتروود تحریکی دوقطبی پلاتینیوم-ایریدیوم (AMI.Co) با قطر ۱۰۰ میکرون که در حاشیه گره سینوسی-دهلیزی در دهلیز راست قرار می گرفت، گستره ی بافتی با سرعتی بالاتر از سرعت پایه ضربانات قلب تحریک و پروتکل های تحریکی اجرا می گردید. سیکلوسپورین مورد استفاده در این طرح از شرکت داروسازی زهراوی تهران تهیه گردید. حلال مورد استفاده جهت حل کردن سیکلوسپورین محلول ۰/۰۱% دی متیل سولفواکساید (DMSO) (تهیه شده از شرکت نمونه واثق ایران) بود. اثرات حلال مورد نظر در آزمایشی جداگانه (N=3) بر روی پارامترهای پایه مانند هدایت، تحریک ناپذیری و ونکباخ بررسی شد و در غلظت مورد نظر هیچ تأثیری بر خواص گره ی دهلیزی-بطنی نداشت. دارو به صورت تازه در روز آزمایش تهیه و به صورت تجمعی به محلول اصلی کربس هنسلیت اضافه

سلولی ایجاد خواص فوق انجام شده است ولی مکانیسم دقیق هنوز مشخص نیست. نقش کانالهای یونی مانند کانال سدیم، کلسیم و پتاسیم در سلولای ترانزیشنال تشکیل دهنده مسیر سریع و آهسته و در سلولهای فشرده گره ای و همچنین نقش گپ جانکشنها یا کانکسینها (CX43,48) تاکنون مطرح شده است. ولی تاکنون مطالعه ای در مورد نقش منافذ MPTP در خواص محافظتی و وابسته به سرعت گره انجام نشده است.

سیکلوسپورین یک مولکول لیپوفیلیک بزرگ است که از باز شدن منافذ افزایش یافته میتوکندری جلوگیری می کند و نشان داده شده است که میوسیت قلب ایزوله شده را در برابر ریبریوژن حفظ می کند. تأثیر سرکوب کنندگی سیکلوسپورین بر ایمنی در مقابل جایگاه حفاظتی آن در جراحی های ریبریوژن-ایسکمی میوکارد ناچیز است و این اثر ممکن است در رابطه با اثر جلوگیری کنندگی آن بر منافذ بینابینی میتوکندری باشد [۱۷]. منافذ میتوکندری یا MPTP سبب می شوند میتوکندری علاوه بر نقش ضروری خود برای بقای سلولها به یک تنظیم کننده ی مرگ سلولی تبدیل شود. باز شدن این منافذ باعث تشدید ناحیه انفارکت ناشی از ایسکمی و ریبریوژن می شود. با وجود مطالعات متعدد در اثرات تنظیم منافذ میتوکندری در ایسکمی و آریتمی های بطنی در کمتر مطالعه ای به نقش این منافذ در تنظیم خواص الکتروفیزیولوژیک گره ی دهلیزی-بطنی اشاره شده است.

مدل ریاضی خواص وابسته به سرعت کارکردی گره از سال ۱۹۸۹ مطالعه و اهمیت آن در پیشگویی رفتار محافظتی گره در زمان آریتمی مشخص شده است [۱۲]. در این مدل مجموع اثرات سه پدیده ی ذاتی گره (ریکاوری، تسهیل، خستگی) می توانند در هر ضربه و در ضربانات مختلف در سرعت های سینوسی و در آریتمی مقادیر تأخیر در هدایت گرهی را پیش بینی کنند. تاکنون اثرات داروهای مختلف مانند آدنوزین، آجمالین و دیلتیازم بر روی خواص فوق مطالعه شده است. با وجود این، نقش منافذ MPTP در تغییر خواص کارکردی گرهی مشخص نیست.

با توجه به نامشخص بودن مکانیسم الکتروفیزیولوژیک سیکلوسپورین (مهار کننده ی MPTP) در گره ی دهلیزی بطنی و مشخص نبودن اثرات این دارو در خواص کارکردی گره و در افزایش یا کاهش مکانیسم دفاعی گره در زمان

می گردید. جزئیات مربوط به پروتکل های تحریکی پایه در مقالات قبلی به تفصیل شرح داده شده است [۱۵، ۱۶]. ولی به اختصار پروتکل های تحریکی پایه مورد استفاده شامل موارد زیر بود:

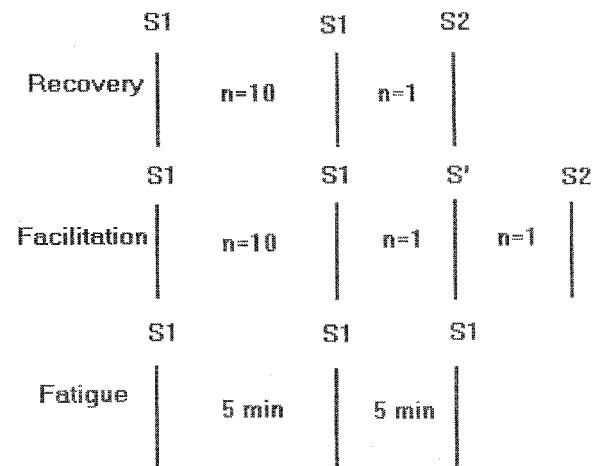
شاخص ونکباخ (WBCL): بلوک درجه سوم دهلیزی - گره ای ناشی از افزایش در سرعت تحریک دهلیزها اطلاق شده و شروع بلوک به عنوان زمان ونکباخ ثبت شد. زمان تحریک ناپذیری موثر (ERP): طولانی ترین فاصله دو ثبت متوالی از دهلیزها (A1A2) قبل از آن که به بلوک دهلیزی - گره ای برسد.

زمان تحریک ناپذیری کارکردی (FRP): کوتاه ترین فاصله دو ثبت متوالی از دسته هیس (H1H2) که در طی یک پروتکل تحریکی ریکاوری به دست می آمد.

پروتکل تحریکی وابسته به سرعت: جزئیات مربوط به پروتکلها در مقالات قبلی به تفصیل شرح داده شده است. (شکل ۱)

پروتکل ریکاوری (Recovery): افزایش هدایت گره ای در طی تحریکات متوالی و با سرعت زیاد تحریک دهلیزی. در طی این پروتکل بعد از ۱۰ تحریک پایه، یک تحریک نارس به بافت اعمال می شد و پاسخ آخرین تحریک پایه نسبت به تحریک تأخیری به صورت فاصله A2H2 (زمان هدایت) در برابر A1A2 (زمان ریکاوری) رسم شد.

تسهیل (Facilitation): از کاهش در زمان هدایت در منحنی ریکاوری پس از تحریک تست و بر مبنای تفاوت FRP



شکل ۱- پروتکل های تحریکی وابسته به سرعت

پروتکل ریکاوری و تسهیل گزارش شد.

خستگی (Fatigue): به طولانی شدن وابسته به زمان هدایت در طی تاکی کاردی های پیوسته با سرعت ثابت تحریکات دهلیزی اطلاق شد. ΔAH حداکثر مقدار خستگی که وابسته به زمان و سرعت تاکی کاردی بود.

پنجره تحریک پذیری (Excitable Gap): یا آستانه آرتمی و به صورت اختلاف بین زمان تحریک ناپذیری موثر گره تقسیم بر اختلاف بین زمان هدایت گره ای (ERP-AH) Δ قبل و بعد از تاثیر دارو محاسبه گردید.

قبل از شروع آزمایش، قلب های مورد نظر حداقل به مدت ۶۰ دقیقه از نظر جریان عروق کرونر، زمان انتقال دهلیزی - گره ای و شاخص ونکباخ پایدار می شد. طراحی آزمایش شامل مراحل کنترل و سیکلوسپورین بود:

(۱) کنترل: انجام پروتکل های تحریکی در حضور تیروید

(۲) سیکلوسپورین: اضافه کردن غلظت های مختلف ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰ میکرومولار به صورت تجمعی در مدار داخلی و سپری شدن ۳۰ دقیقه برای هر غلظت و تکرار پروتکل های تحریکی. تعداد کل نمونه های مورد بررسی و آنالیز ۷ نمونه بود.

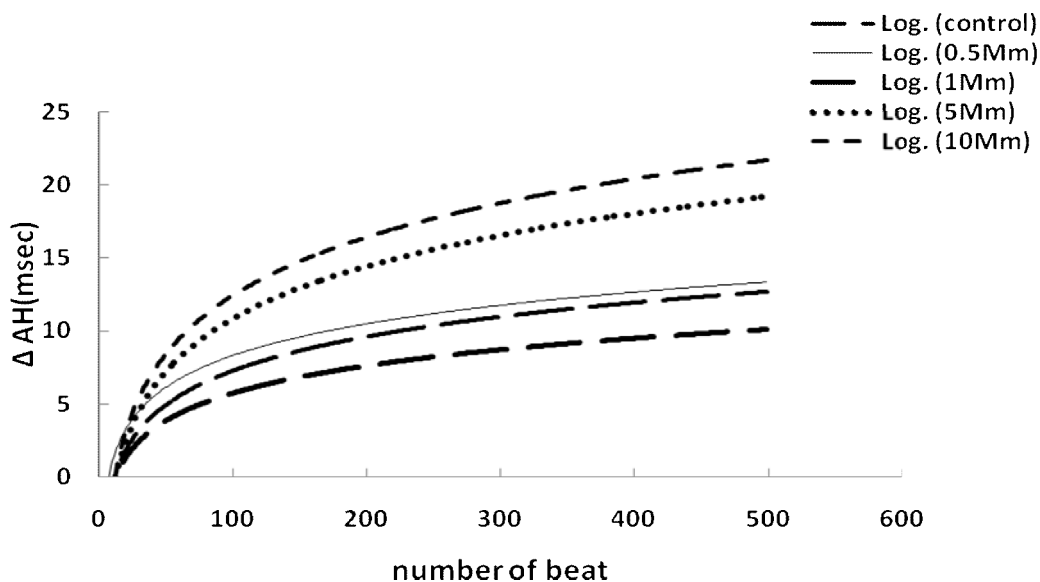
بعد از تعیین توزیع نرمال و غیر نرمال داده مقایسه بین میانگین دو گروه با توزیع نرمال با تست تی زوج (Paired t-test) و با توزیع غیر نرمال با تست انجام شد و به عنوان حد معنی دار و کلیه آزمون ها به صورت دو طرفه ارزیابی گردید. نرم افزار استفاده شده Graph pad prism 5 بود. آنالیز منحنی های تک توانی غیر خطی با استفاده از نرم افزار Graph pad prism 5 و روش Marquardt انجام شد. کلیه داده ها به صورت میانگین و خطای استاندارد (Mean \pm SE) گزارش شد. سطح معنادار در حد ($p < 0/05$) انتخاب گردید.

یافته ها

مطابق با آزمایشاتی که بر روی نمونه ها انجام شد داروی سیکلوسپورین، در یک مدل غیر وابسته به غلظت ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰ میکرومولار سبب افزایش پارامترهای پایه و وابسته به سرعت گره دهلیزی - بطنی گردید. بیشترین اثرات داروی سیکلوسپورین در غلظت های ۵ و ۱۰ میکرومولار مشاهده شد. بدین ترتیب که اثرات آن بعد از ۲۰ دقیقه ظاهر و بتدریج در

جدول ۱- اثرات غلظت های مختلف سیکلوسپورین بر روی پارامترهای الکتروفیزیولوژیک پایه گره دهلیزی -بطنی (n=۷). در مقایسه با کنترل $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ **.

پارامترها (msec)					
WBCL	FRP	ERP	AHmax	AHmin	سیکلوسپورین (میکرومولار)
143.8±3.5	162±3.3	114.3±7.9	106.1±6.1	57.25±3.4	کنترل
151.7±4	169.2±6.3	133±13.5	90.67±10.4	55±3.8	0.5 μmol سیکلوسپورین
153.3±5.5	170.2±5.1	128.2±11.7	103.7±10.8	57±2.7	1 μmol سیکلوسپورین
163.6±9.6*	178.1±6.8*	141±12	110.4±7.2	64.4±2.1	5 μmol سیکلوسپورین
169±7.6**	178.6±5**	142±7.3 *	112.4±6.7	68.6±3.2*	10 μmol سیکلوسپورین



شکل ۲- اثرات غلظت های مختلف سیکلوسپورین (0.5-10 μmol) بر روی خستگی گره ای که به صورت تابع نمائی لگاریتمی نشان داده شده است. Mm: میکرومولار، log: لگاریتم، AH: سرعت هدایت

۱/۷۹ میکرومولار و برای ونکباخ 10^{-6} ۲/۰۱ میکرو مولار محاسبه شد.

اثرات وابسته به غلظت های مختلف سیکلوسپورین بر روی پارامترهای وابسته به سرعت گره دهلیزی - بطنی نشان دهنده افزایش خستگی گره ای در تمام غلظت ها به غیر از ۱ میکرومولار بود که این افزایش در غلظت ۱۰ میکرومولار از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.04$). به صورتیکه از $1/5 \pm$ ۱۱/۸۵ به $19/67 \pm 3/7$ میلی ثانیه رسید. (شکل ۲)

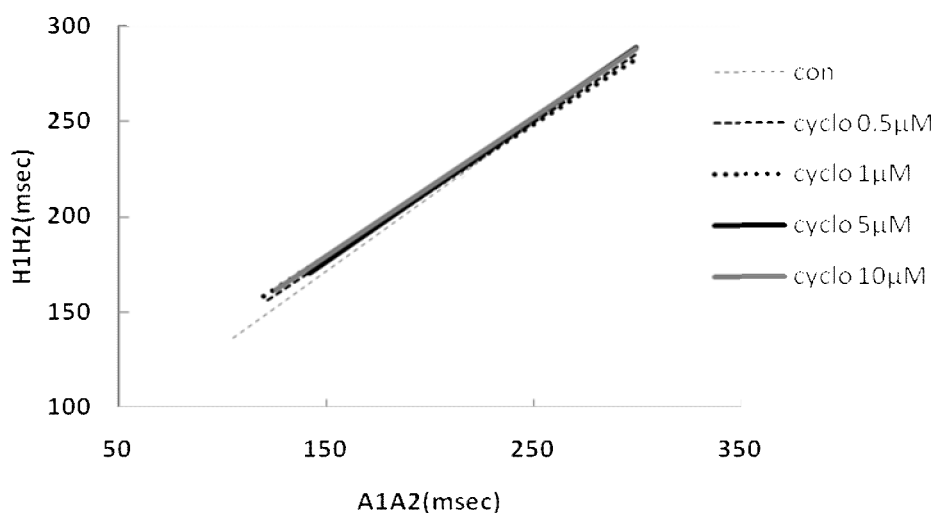
آنالیز ریاضی منحنی های خستگی از طریق همگرایی غیرخطی تک توانی با استفاده از فرمول $AH\tau = \alpha - (a-b)$.

یک محدوده زمانی ۳۰ دقیقه ای به میزان حداکثر خود رسید. سیکلوسپورین توانست در یک مدل غیر وابسته به غلظت سبب افزایش معنی دار زمان تحریک ناپذیری موثر و زمان تحریک ناپذیری کارکردی شود. زمان ونکباخ به عنوان شاخص تحریک ناپذیری کل گره، روند افزایشی را در تمام غلظت ها از خود نشان داد که این اثرات در غلظت ۱۰ میکرو مولار نسبت به سایر غلظت ها بیشتر بود. ($P < 0.01$) (جدول ۱)

EC50 که بیانگر غلظت مؤثر ۵۰٪ می باشد، برای تحریک ناپذیری مؤثر 10^{-7} ۴/۹ میکرو مولار، برای تحریک ناپذیری کارکردی 10^{-7} ۱/۰۲ میکرو مولار و برای هدایت 10^{-5} ×

جدول ۲- آنالیز ریاضی تک توانی صعودی (one phase association) منحنی های خستگی برای غلظت های مختلف سیکلوسپورین با استفاده از فرمول $\tau = \alpha - AH$ (n=7). EXP (-ns) (a-b) (10-11).

پارامترها (msec)	Y0	Plateau	k	ΔAH
کنترل	0.19±0.57	9.13±1.7	0.007	11.85±1.5
0.5 μmol سیکلوسپورین	1.45±0.47	11.23±1.9	0.004	14±2.3
1 μmol سیکلوسپورین	1.33±0.7	10.98±2.9	0.008	14.77±1.9
5 μmol سیکلوسپورین	1.72±0.52	13.23±3.1	0.006	15.56±2.6
10 μmol سیکلوسپورین	2.21±0.63	15.05±4.6	0.007	19.67±3.7



شکل ۳- نتایج به صورت $Mean \pm SE$ گزارش شده است. ΔAH : حداکثر مقدار خستگی اندازه گیری شده، k: شیب منحنی، Plateau: حداکثر میزان خستگی، Y0: حداقل میزان خستگی

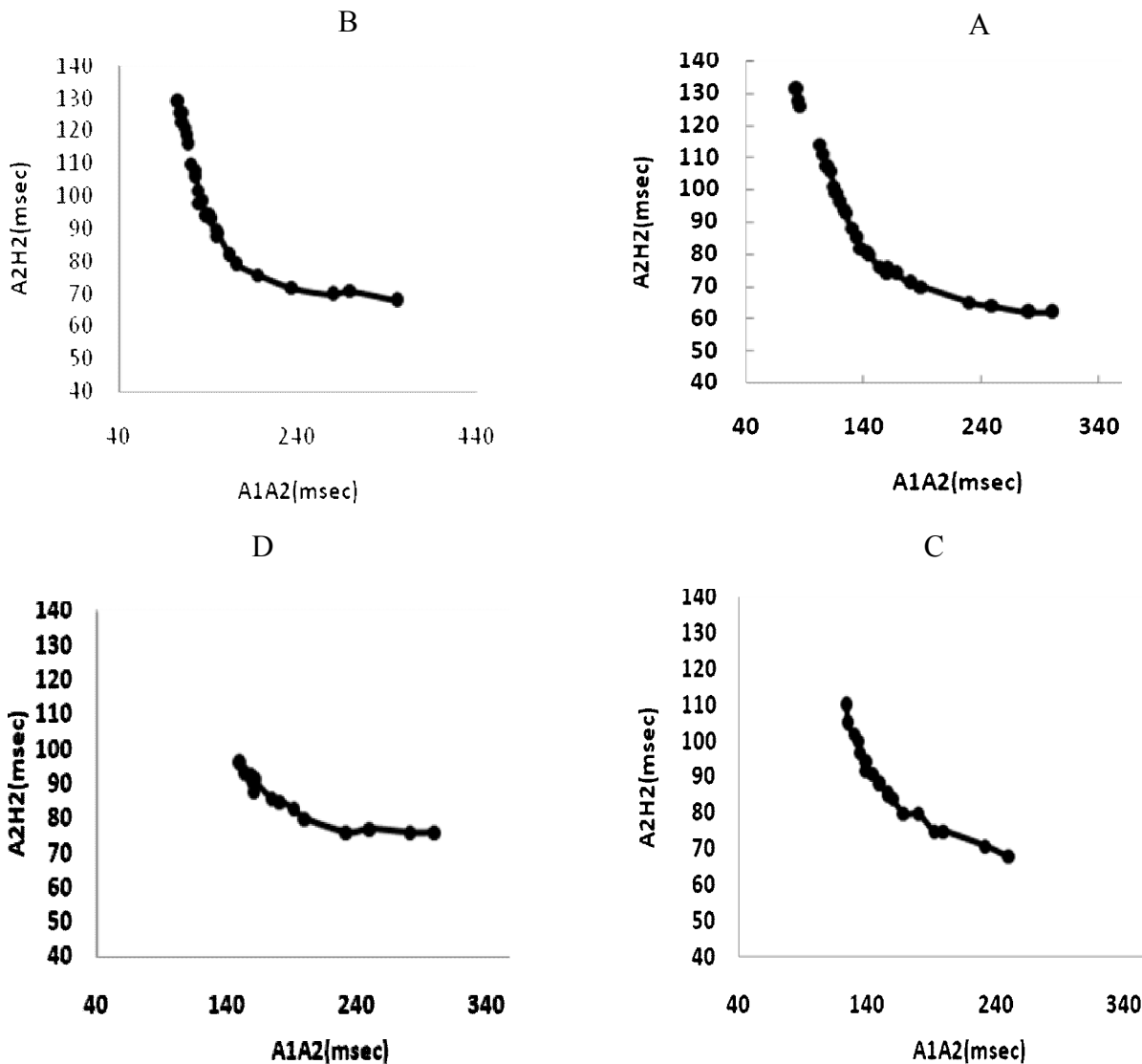
جدول ۳- آنالیز خطی ریاضی منحنی تحریک ناپذیری پروتکل ریکاوری با فرمول $y = ax + b$ (n=7).

سیکلوسپورین (μmol) Refractory	Slope	A	پارامترها (msec)
کنترل	0.78±0.03	54.23±8.08	
0.5 μmol سیکلوسپورین	0.77±0.03	56.22±8.5	
1 μmol سیکلوسپورین	0.66±0.08	77.99±18.22	
5 μmol سیکلوسپورین	0.72±0.05	67.69±13.13	
10 μmol سیکلوسپورین	0.73±0.02	68.44±6.5	

کلید ی اعداد به صورت $Mean \pm SE$ گزارش شده است. A: حداقل سرعت هدایت

نتایج به صورت جدول ۲ حاصل گردید. آنالیز ریاضی منحنی های ریکاوری از طریق همگرایی غیرخطی تک توانی با استفاده از فرمول $AH_t = AH_{\infty} + \beta * EXP(-HA/\tau)$ انجام شد (۱۰)

EXP(-ns) انجام گردید (۱۰)، که در این فرمول a: AH_{max} ، b: AH_{∞} و c: ۰/۰۱ می باشد و اثرات سیکلوسپورین بیانگر حداکثر میزان خستگی در یک روند غیر وابسته به غلظت است.



شکل ۴- رفتارهای مختلف منحنی ریکواری مربوط به اثرات داروی سیکلوسپورین در حالت کنترل (A) و غلظت های 0.5 μmol (B) و 1 μmol (C) و 5 μmol (D) این دارو. با افزایش غلظت، ضمن انتقال منحنی به سمت راست و پایین، فواصل بین شکاف موجود در منحنی ریکواری از بین می رود. A1A2: فاصله ی بین دو ثبت متوالی از دهلیز، A2H2: فاصله ی بین دو ثبت متوالی از دسته ی هیس.

سیکلوسپورین بود. (شکل ۳)

و نتایج زیر حاصل گردید:

آنالیز ریاضی خطی منحنی تحریک ناپذیری پروتکل ریکواری با استفاده از فرمول $y=ax+b$ نشان داد که میزان A که بیانگر حداقل میزان هدایت گرهی است، در یک روند غیر وابسته به غلظت افزایش پیدا کرد، که این افزایش با افزایش میزان AH min در جدول ۱ مطابقت دارد. (جدول ۳) همچنین اجرای پروتکل تسهیل نشان داد که میزان تسهیل (ΔFRP) در یک روند غیر وابسته به غلظت به صورت غیر معنی دار کاهش یافت و از مقدار $۱۲/۳۵ \pm ۲/۵$ میلی ثانیه در کنترل به $۹/۴ \pm ۲/۴$ میلی ثانیه در غلظت ۱۰ میکرو مولار رسید. (جدول ۴)

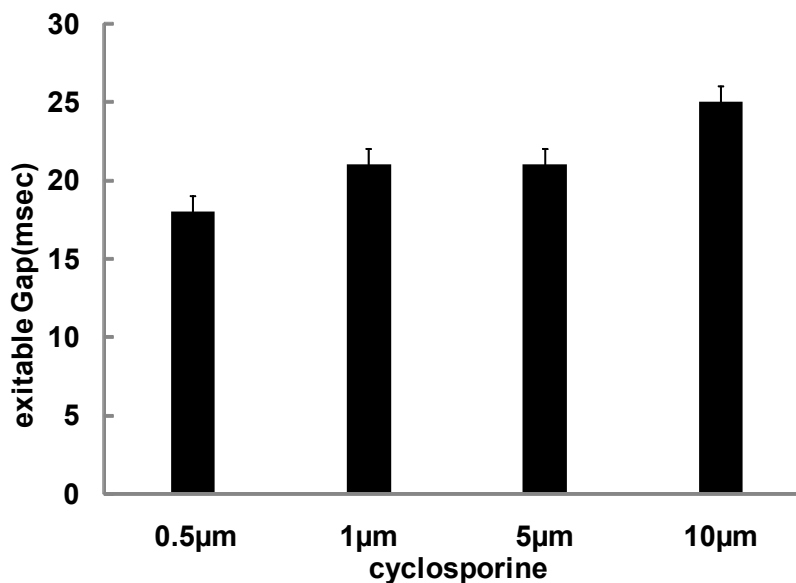
β که معرف حداکثر سرعت هدایت می باشد از $۲۵۸ \pm ۹۲۸/۱$ در کنترل به $۷۴۳/۷ \pm ۲۳۹۲$ میلی ثانیه در غلظت ۱۰ میکرو مولار و همچنین AH_{∞} از $۳/۱ \pm ۵۹/۳۶$ در کنترل به $۲/۶ \pm ۶۹$ میلی ثانیه در غلظت ۱۰ میکرومولار و τ که نمایانگر سرعت ثابت افزایش منحنی ریکواری می باشد از $۳/۶ \pm ۳۸/۴۹$ به $۴/۳ \pm ۳۸/۷۵$ میلی ثانیه تغییر یافت و اثرات وابسته به غلظتی را نشان نداد.

همچنین آنالیز منحنی رفرکتوری با استفاده از مدل تک توانی نزولی (Descending mono-exponential fitting) بیانگر افزایش ثابت زمانی رفرکتوری (FRP) با افزایش غلظت

جدول ۴- آنالیز ریاضی خطی پروتکل تسهیل با فرمول $y=ax+b$ (11-10)، $n=7$.

FCL	B	Slope	پارامترها (msec)	سیکلوسپورین (μmol)
12.35±2.5	147.7±5.6	-0.37±0.03		کنترل
12.38±3.2	143.4±5.8	-0.33±0.03		سیکلوسپورین 0.5 μmol
11±2.5	152.2±16.3	-0.36±0.07		سیکلوسپورین 1 μmol
8.7±1.8	151.8±14.9	-0.34±0.07		سیکلوسپورین 5 μmol
9.4±2.4	157.9±9.1	-0.33±0.04		سیکلوسپورین 10 μmol

کلیه ی اعداد به صورت $\text{mean} \pm \text{SE}$ گزارش شده است. B: ضریب ثابت نشان دهنده ی تحریک ناپذیری، FCL: مقداراندازه گیری شده ی تسهیل

شکل ۵- اثرات غلظت های مختلف سیکلوسپورین در آستانه ی آریتمی، Δ (ERP - AH) (μm : میکرومولار)

آهسته به سه صورت آشکار می شود. در صورتی که تحریک ناپذیری بین دو مسیر آهسته و سریع زیاد باشد در منحنی ریکآوری فاصله (Jump) و یا شکاف (Gap) آشکار می شود که بیانگر پتانسیل آریتمی های چرخشی گرهی است. در تحقیق حاضر درصد وقوع شکاف و یا فاصله در کنترل ۸۲٪ بود که بعد از اضافه کردن غلظت های ۵ میکرومولار به ۱۶/۶ درصد و در ۱۰ میکرومولار به ۲۰ درصد کاهش پیدا کرد (شکل ۴).

شاخص تحریک پذیری به صورت اختلاف بین اثرات دارو در طولانی کردن زمان هدایت و تحریک ناپذیری گرهی

در ارتباط با پروتکل تسهیل نتایج تحلیل ریاضی خطی منحنی تسهیل با استفاده از فرمول $y=ax+b$ که در آن B بیانگر تحریک ناپذیری گرهی است، در سرعت های مختلف تحریک دهلیزی نشان داد که با کاهش سرعت تحریک دهلیزی در یک روند وابسته به سرعت B کاهش یافته و میزان تسهیل زیاد می شود. همچنین با افزودن غلظت های مختلف سیکلوسپورین میزان B به عنوان ضریب ثابت نشان دهنده تحریک ناپذیری (FRP) در یک روند غیر وابسته به غلظت افزایش نشان داد، که در هیچ غلظتی معنی دار نشد (جدول ۴). در منحنی ریکآوری اختلاف بین هدایت در مسیر سریع و

مطالعات قبلی نشان داده اند که در منحنی ریکآوری گرهی، قسمت صاف منحنی بیانگر هدایت در مسیر سریع یا سلولهای ترانزیشنال قسمت فوقانی گره می باشد. در صورتی که در قسمت با شیب تند هدایت امواج از طریق مسیر آهسته انجام می شود [۱۴].

سیکلوپورین توانست سبب انتقال منحنی به سمت بالا و راست شود، که بیانگر اثرات آن در هر دو مسیر می باشد. ولی اثرات آن بر روی مسیر سریع بیشتر از آهسته بوده است. (جدول ۱)

مطالعات الکتروفیزیولوژیک اخیراً نشان داده اند که مسیر آهسته از سلولهایی با پتانسیل عمل نزدیک به سلولهای نودال تشکیل می شود که فواصل بین سلولی و کانالهای کلسیم در آن نقش اصلی را دارند [۵] و مسیر سریع از سلولهای ترانزیشنال با منشاء دهلیزی که پتانسیل عمل سریع مشابه به جریان های سدیم را دارند تشکیل شده است. با توجه به اثرات بیشتر سیکلوپورین در مسیر سریع می توان احتمال اثرات بیشتر آن را در کانالهای سدیم در غلظت های به کار برده شده مطرح کرد. مطالعات بیشتر در مورد مکانیسم سلولی اثرات سیکلوپورین نیاز است. همچنین زمان تحریک ناپذیری (ERP, FRP, WBCL) به عنوان یکی از مکانیسم های دفاعی گره افزایش غیر وابسته به دوز را نشان داد که در غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار معنی دار شد. مکانیسم سلولی تحریک ناپذیری گرهی همچنان ناشناخته باقی مانده است. ولی در ارتباط با مسیرهای داخل گرهی نقش مسیر آهسته در ایجاد تحریک ناپذیری مؤثر و نقش سلولهای فشرده ی گرهی (سلولهای نودال) در تحریک ناپذیری کارکردی، مشخص گردیده است. با توجه به افزایش تحریک ناپذیری توسط سیکلوپورین می توان نتیجه گرفت که این دارو می تواند سبب مهار سلولهای ترانزیشنال مسیر آهسته ی گرهی شود، که در نتیجه زمان هدایت حداکثر گرهی افزایش یافت. در مقایسه ی تأثیر دارو بر هدایت و تحریک ناپذیری گرهی (پنجره ی تحریک ناپذیری یا آستانه ی آریتمی)، سیکلوپورین توانست در یک رابطه ی غیر وابسته به غلظت سبب افزایش آستانه ی آریتمی شود، که نشان دهنده ی اثرات بیشتر آن بر روی تحریک ناپذیری گرهی است و می توان نتیجه گرفت که احتمالاً این دارو می تواند پتانسیل آهسته

اطلاق می شود. در تحقیق حاضر سیکلوپورین توانست هر دو پارامتر را طولانی کند ولی اثرات آن بر روی تحریک ناپذیری مؤثر بیشتر بود، بنابراین آستانه ی تحریک پذیری و یا آستانه آریتمی افزایش پیدا کرد که بیانگر کاهش سرعت آریتمی و احتمالاً توقف آن است. (شکل ۵)

بحث

نتایج کلی این تحقیق بیانگر آن است که سیکلوپورین می تواند در یک مدل غیر وابسته به غلظت در محدوده (۰/۵-۱۰ میکرومولار) سبب تغییر خواص الکتروفیزیولوژیک پایه و وابسته به سرعت گره شود و همچنین آستانه وقوع و ادامه آریتمی چرخشی گرهی را توسط اثرات افتراقی بیشتر بر روی زمان تحریک ناپذیری گره ای نسبت به زمان هدایت افزایش دهد. کاهش وقوع شکاف در منحنی ریکآوری در افزایش غلظت های سیکلوپورین بیانگر پتانسیل ضد آریتمی گردشی این دارو است.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سیکلوپورین در الگوی غیر وابسته به غلظت می تواند سبب افزایش تحریک ناپذیری کارکردی و مؤثر و نکباج شود. هدایت گرهی با مکانیسم های متفاوتی ایجاد می شود. مهمترین مکانیسم های محتمل در ایجاد آن عبارتند از: توزیع کانالهای یونی مخصوصاً جریان های I_{Ca} و I_K و نحوه قرار گرفتن تاروپود فیبرهای لایه های مختلف گره، وجود کانکسین ها (CX_{43} , CX_{45} , CX_{47})، هدایت آهسته ی پیشرونده در مسیرهای آهسته گره ی دهلیزی-بطنی، با وجود این مکانیسم های متعدد، هنوز مکانیسم اصلی تأخیر در گره ی دهلیزی-بطنی مشخص نیست [۶].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در غلظت بالای سیکلوپورین (۱۰ میکرومولار) زمان هدایت حداقل به صورت معنی دار افزایش پیدا کرد. با توجه به آنکه تا کنون هیچ مطالعه ای به بررسی نقش منافذ MPTP در گره ی دهلیزی-بطنی نپرداخته است، نتایج این تحقیق نشان می دهد که این دارو احتمالاً از طریق تأثیر بر روی منافذ یونی و یا کانکسین (فضاهای بین سلولی) سبب افزایش در هدایت گرهی می شود.

کردن سرعت و یا خاتمه ی آریتمی های چرخشی گرهی را داشته باشد.

در تأیید این نتایج اندازه گیری فاصله ی شکاف هدایتی در منحنی ریکاوری گرهی نشان داد که درصد وقوع این شکاف بعد از غلظت های ۵ و ۱۰ میکرومولار به صورت معنی داری کاهش پیدا کرد. در مطالعات متعددی در انسان و حیوانات نشان داده اند که وقوع این فاصله می تواند بیانگر رخداد بیشتر آریتمی های چرخشی گرهی باشد و از بین رفتن این فاصله توسط دارو های بتا بلاکر و کلسیم بلاکر و سوزاندن گرهی، می تواند سبب درمان آریتمی های چرخشی گرهی شود [۷]. بنابراین می توان نتیجه گرفت که سیکلوسپورین می تواند پتانسیل درمانی در آریتمی های چرخشی گرهی داشته باشد. مطالعات بعدی در انسان توانایی بالقوه ی این دارو را می تواند مشخص سازد.

اصول مدل فانکشنال یا وابسته به سرعت در سالهای ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۰ مشخص گردید. در این مدل سه پدیده ی ذاتی ریکاوری، تسهیل و خستگی گرهی، مکانیسم تأخیر هدایت در گره شناخته می شوند [۱]. داروهای زیادی مانند بتابلاکرها، آدنوزین، آجمالین می توانند با تغییر این خواص، پتانسیل ضد آریتمی یا آریتمی زایی خود را بر روی گره ی دهلیزی-بطنی نشان دهند [۹-۱۱].

در تحقیق حاضر آنالیز ریاضی خطی و غیر خطی پدیده های فوق نشان داد که سیکلوسپورین سبب کاهش غیر معنی دار تسهیل و افزایش معنی دار خستگی گرهی می شود. (جدول ۲، ۳، ۴ و شکل ۲)

مکانیسم سلولی پدیده های فوق شناخته شده نیست ولی در مقایسه با اثرات سایر دارو ها می توان نتیجه گیری کرد که احتمالاً داروی سیکلوسپورین با کاهش تسهیل و افزایش خستگی (اثرات مشابه آدنوزین) می تواند پتانسیل درمانی در آریتمی های فوق بطنی داشته باشد. در مطالعات اخیر نشان داده شده است که منافذ MPTP در پدیده های ایسکمی و ریپرفیوژن و آریتمی های بطنی نقش داشته و سیکلوسپورین می تواند با کاهش حجم ناحیه ی ایسکمی در آریتمی های بعد از قرار دادن فنر و آنژیوپلاستی مؤثر باشد [۴]. با وجود این مطالعات نقش این دارو و منافذ MPTP در آریتمی های بطنی و آریتمی های گره ی دهلیزی-بطنی تاکنون مطالعه نشده

است.

سیکلوسپورین اثرات مختلفی در سلول دارد. سبب کاهش تکثیر و تفرق لنفوسیت های B و T می شود. با مکانیسم های مختلف سبب مهار آنزیم کلسینورین فسفاتاز در لکوسیت ها می شود. همچنین سبب مهار آنژیوتنژ (از طریق مهار فاکتور هسته ای و خانواده ی پروتئین کینازهای میتوژن و فسفوانیزوتول کیناز) در عروق دستگاه گوارش می شود. سیکلوسپورین همچنین سبب مهار آنزیم سیکلواکسیژناز نوع II در سلولهای عروق می گردد [۱۳]. در تحقیق حاضر با غلظت های به کار رفته، با توجه به فقدان لکوسیت ها و سلولهای خونی نقش سیکلوسپورین در القای منافذ MPTP می تواند مشخص تر از سایر اثرات باشد. در هر حال تحقیقات بعدی جهت مشخص کردن مکانیسم دقیق سلولی سیکلوسپورین نیاز است.

نتیجه تحقیق حاضر برای اولین بار توانست اثرات مستقیم سیکلوسپورین را در افزایش آستانه ی آریتمی، تأثیر بر تحریک ناپذیری و هدایت گرهی و خواص وابسته به سرعت گره نشان دهد و پتانسیل ضد آریتمی های چرخشی را برای این دارو مطرح سازد. اینکه تأثیر سیکلوسپورین به دلیل عوارض جانبی آن بر روی کاهش سیستم ایمنی تا چه حد می تواند در درمان آریتمی های بطنی در انسان به کار گرفته شود و همچنین استفاده از آنالوگ های سیکلوسپورین که اثرات کاهنده ی سیستم ایمنی را ندارند، با تحقیقات بعدی مشخص خواهد شد. سیکلوسپورین احتمالاً با مکانیسم بستن منافذ MPTP می تواند خواص پایه و وابسته به سرعت گره را مهار کرده و با افزایش تحریک ناپذیری گرهی و هدایت گرهی و آستانه ی آریتمی و از بین بردن فواصل هدایتی در منحنی ریکاوری پتانسیل ضد آریتمی چرخشی گرهی داشته باشد. استفاده ی بالینی از آن در درمان آریتمی های چرخشی گرهی (AVNRT) در انسان نیاز به مطالعات بعدی دارد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی استان گلستان جهت تصویب و در اختیار قرار دادن اعتبار جهت انجام طرح تشکر و قدردانی می گردد.

References

- [1] Billette J, Amelie F: Functional properties of the AV node: characterization and role in cardiac rhythms. *In Mazgalev TN, Tchou PJ (eds): Atrial-AV Nodal Electrophysiology: A View from the Millennium*. Armonk: Futura Publishing Co., Inc.; 2000:155-175.
- [2] Billette J, Nattel S. Dynamic behavior of the atrioventricular node: a functional model of interaction between recovery, facilitation, and fatigue. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1994; 5 (1):90-102.
- [3] Blurton DJ, Dubin AM, Chiesa NA, Van Hare GF, Collins KK. Characterizing dual atrioventricular nodal physiology in pediatric patients with atrioventricular nodal reentrant tachycardia. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006; 17 (6):638-44.
- [4] Brown DA, O'Rourke B. Cardiac mitochondria and arrhythmias. *Cardiovasc Res*. 2010; 88 (2):241-9.
- [5] Greener ID, Tellez JO, Dobrzynski H, Yamamoto M, Graham GM, Billeter R, Boyett MR. Ion channel transcript expression at the rabbit atrioventricular conduction axis. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2009; 2 (3):305-15.
- [6] Hucker WJ, McCain ML, Laughner JI, Iaizzo PA, Efimov IR. Connexin 43 expression delineates two discrete pathways in the human atrioventricular junction. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008; 291 (2):204-15.
- [7] Lee PC, Chen SA, Hwang B. Atrioventricular node anatomy and physiology implications for ablation of atrioventricular nodal reentrant tachycardia. *Curr Opin Cardiol*. 2009; 24 (2):105-12.
- [8] McCanta AC, Collins KK, Schaffer MS. Incidental dual atrioventricular nodal physiology in children and adolescents: clinical follow-up and implications. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2010; 33 (12):1528-32.
- [9] Nayebpour M, Billette J, Amellal F, Nattel S. Effects of adenosine on rate-dependent atrioventricular nodal function. Potential roles in tachycardia termination and physiological regulation. *Circulation*. 1993; 88 (6):2632-45.
- [10] Nayebpour M, Naseri M, Khori V. Effects of ajmaline on rate-dependent atrioventricular node properties. Potential role in experimental atrioventricular re-entrant tachycardia. *Eur J Pharmacol*. 2001 19; 412 (1):77-89.
- [11] Nayebpour M, Talajic M, Nattel S. Effects of beta-adrenergic receptor stimulation and blockade on rate-dependent atrioventricular nodal properties. *Circ Res*. 1992; 70 (5):902-11.
- [12] Nayebpour M, Talajic M, Nattel S. Quantitation of dynamic AV nodal properties and application to predict rate-dependent AV conduction. *Am J Physiol*. 1991; 261 (2 Pt 2):H292-300.
- [13] Rafiee P, Heidemann J, Ogawa H, Johnson NA, Fisher PJ, Li MS, Otterson MF, Johnson CP, Binion DG. Cyclosporin A differentially inhibits multiple steps in VEGF induced angiogenesis in human microvascular endothelial cells through altered intracellular signaling. *Cell Commun Signal*. 2004; 2; 2 (1):3.
- [14] Reid MC, Billette J, Khalife K, Tadros R. Role of compact node and posterior extension in direction-dependent changes in atrioventricular nodal function in rabbit. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003; 14 (12):1342-50.
- [15] Talajic M, Lemery R, Roy D, Villemare C, Cartier R, Coutu B, Nattel S. Rate-dependent effects of diltiazem on human atrioventricular nodal properties. *Circulation*. 1992; 86 (3):870-7
- [16] Vahid Khori, Soroosh Aminosharihe Najafi, Fatemeh Alizadeh, Mona Pourabouk, Mohsen Nayebpour, Shima Changizi, Aref Salehi, Fakhri Badaghabadi, Ali Mohammad Alizadeh, Rate-dependent and antiarrhythmic reentrant tachycardia (AVNRT) effects of simvastatin in isolated rabbit atrioventricular nodal model. *J Mazand Univ Med Sci*. 2009; 20 (76):78-87.
- [17] Xie JR, Yu LN. Cardioprotective effects of cyclosporine A in an in vivo model of myocardial ischemia and reperfusion. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2007; 51 (7):909-13.