



دانشگاه پیام نور تهران

دانشکده علوم

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی جانوری

گروه زیست شناسی

عنوان:

بررسی تأثیر تجویز مزمن دیازپام در حضور استرس گرسنگی بر

صدمات ناشی از ایسکمی ری پرفیوژن در قلب مجزا شده رت

میترا آزادی میانکوهی

استاد راهنما:

دکتر داریوش شکیبایی

دکتر سیما نصری

استاد مشاور:

دکتر سهیلا ابراهیمی وستا کلایی

شهریور 1390



دانشگاه پیام نور تهران

دانشکده علوم

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی جانوری

گروه زیست شناسی

عنوان:

**بررسی تأثیر تجویز مزمن دیازپام در حضور استرس گرسنگی بر
صدمات ناشی از ایسکمی ری پرفیوژن در قلب مجزا شده رت**

میترا آزادی میانکوهی

استاد راهنما:

دکتر داریوش شکیبایی

دکتر سیما نصری

استاد مشاور:

دکتر سهیلا ابراهیمی وستا کلایی

شهریور 1390

• تقدیم به پدر و مادر مهربانم برای محبت‌های بی‌دریغشان.

تقدیم به خانواده‌ی عزیزم برای پشتیبانی‌های بی‌مثالشان.

تقدیم به خواهر خوبم طیبه جان برای همراهی صمیمانه‌اش.

تقدیم به روح نازنین صبا و ظهیر که بسیار دوستشان داشتم .

تقدیم به آنان که در مراحل آموختن از راهنمایی‌ها و دانش آنها

بهره بردم.

و

تقدیم به همه‌ی دستداران علم و دانش oe

تقدیر و تشکر:

منت خدای را عزوجل که طاعتش موجب قربت است و به شکر اندرش مزید نعمت، شکر و سپاس ایزد متعال را که در پیمودن طریق علم تواناییم کرامت فرمود .

و با تشکر و سپاس از استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر **داریوش شکیبایی** با سمت استاد راهنما که راهنمایی‌های ایشان در همه‌ی مراحل انجام پایان نامه چراغ راهم بود.

با سپاس از استاد فرزانه‌ام سرکار خانم دکتر **سیما نصری** با سمت استاد راهنمای همکار که از راهنمایی ایشان بهره فراوان بردم .

با تشکر از استاد عزیزم سرکار خانم دکتر **سهیلا ابراهیمی** با سمت استاد مشاور که راهنمایی ایشان توشه راهم بود.

و با قدردانی از جناب آقای دکتر **صفر محسنی** استاد محترم که در جلسه دفاع از پایان نامه با سمت داور شرکت نموده و سبب غنای علمی جلسه گردیدند ، از راهنمایی ایشان استفاده نمودم .

و تشکر و قدردانی از :

سرکار خانم مهوش حصاری مسئول محترم آزمایشگاه فیزیولوژی قلب که در انجام و اجرای پایان نامه نهایت همکاری و همراهی را داشتند.

سرکار خانم مینا ساکن شفت که در طول دوران تحصیل با سعه صدر در حل مشکلات آموزشی یاریم دادند.

و کلیه ی کارکنان عزیز و صدیق دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و علی الخصوص مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی آن دانشگاه که در طول اجرای پایان نامه هماهنگی و همکاری را داشتند.

چکیده

مصرف مزمن ديازپام در پزشكى مرسوم است، در مطالعه حاضر اثر استرس گرسنگى بر صدمات ناشى از ايسكمى - ريپرفيوژن به دنبال مصرف مكرر ديازپام بررسى شد.

موش‌هاى صحرايى نر ويستار (250-300g) به دو گروه كنترل (I و II) و چهار گروه تجربى (I-IV) تقسيم شدند. گروه‌هاى كنترل I و II (n=9) به مدت 5 روز تحت تجويز درون صفاقى (I.P) نرمال سالىن قرار گرفتند. گروه كنترل II علاوه بر پروتكلى فوق الذكر در پنجمين روز آزمون 24h از غذا محروم شدند. گروه‌هاى تجربى به مدت 5 روز، مورد تجويز I.P ديازپام قرار گرفتند [گروه I و II (1mg/kg)، گروه III و IV (5mg/kg)]. گروه تست II و IV علاوه بر پروتكلى ذكر شده در روز پنجم آزمون 24h از غذا محروم شدند. قلب‌هاى مجزا شده به روش لانگندورف تحت 25 دقيقه ايسكمى و 25 دقيقه ريپرفيوژن قرار گرفتند. پارامترهاى عملكردى قلب از جمله نوسانات بطن چپ، ضربانات قلب، و معيار عملكرد قلب RPP (نوسانات بطن چپ X ضربانات قلب) اندازه گيرى شدند. سايز انفاركتوس با استفاده از رنگ آميزى تترازوليوم سنجيده شد.

در گروه‌هاى دريافت كننده ديازپام با غلظت 1 و 5 mg/kg، ميانگين مقادير RPP در مقايسه با گروه كنترل II تفاوت معنى دارى داشت، كه بيانگر شدت بيشتر آسيب متعاقب ايسكمى - ري پرفيوژن در اين دو گروه است. اما در گروه‌هاى تجربى (II و IV) كه مورد تجويز ديازپام توأم با گرسنگى قرار گرفته بودند، اين تفاوت ديده نشد. مطالعه حاضر براى اولين بار تأثير حفاظتى گرسنگى را در حضور تجويز مزمن ديازپام نشان داد. مطالعات تكمىلى جهت روشن شدن نقش دانسيته گيرنده بنزوديازپين محيطى و منافذ ميتوكوندرى در اين رابطه پيشنهاده مى گردد.

كلمات كليدى: قلب مجزا، ايسكمى - ري پرفيوژن، گرسنگى، ديازپام، موش صحرايى نر.

فصل اول – مقدمه

- ا..... چکیده
- 1-1-1- گردش خون پستانداران 1
- 1-1-1-1- قلب 1
- 2-1-1- شریان های تغذیه کننده قلب 3
- 3-1-1- ورید های قلب 3
- 4-1-1- سینوس کرونری 4
- 5-1-1- تشریح فیزیولوژیک عضله قلب 5
- 5-1-1-1- عضله قلبی 5
- 2-5-1-1- پتانسیل های عمل در عضله قلبی 6
- 6-1-1- پاسخ انقباضی عضله قلبی 7
- 7-1-1-1- سیکل قلبی 7
- 8-1-1-1- کنترل عصبی ضربان قلب 7
- 1-8-1-1- اثر سرعت ضربان قلب در کنترل برون ده قلب 8
- 9-1-1-1- قلب و عروق خونی 9
- 10-1-1-1- اثر یون های پتاسیم و کلسیم بر روی عملکرد قلب 9
- 11-1-1-1- اثر دما بر قلب 9
- 12-1-1-1- تأثیر ایسکمی و ری پرفیوژن بر قلب 10

- 10.....1-1-12-1- ایسکمی کرونر
- 11.....1-1-12-2- انفارکتوس میوکارد
- 11.....1-1-13-1- تأثیر ایسکمی
- 12.....1-1-13-1- اثرات زودرس ایسکمی
- 13.....1-1-13-2- اثرات دیررس ایسکمی
- 14.....1-1-14-1- مکانیسم آسیب قلبی در ایسکمی
- 15.....1-1-15-1- تفاوت ایسکمی موضعی و ایسکمی گلوبال
- 15.....1-1-16-1- بیماری ایسکمیک قلبی
- 16.....1-1-17-1- آترواسکلروزیس به عنوان یک علت بیماری ایسکمیک قلبی
- 16.....1-1-18-1- آسیب ایسکمیک در مقابل آسیب ناشی از خون رسانی مجدد
- 16.....1-1-19-1- فرآیند ری پرفیوژن
- 17.....1-1-19-1-1- انواع آسیب ناشی از ری پرفیوژن
- 18.....1-1-19-1-2- آریتمی های ناشی از ری پرفیوژن
- 19.....1-1-19-1-3- آسیب کشنده ناشی از ری پرفیوژن / نکروز میوکارد
- 19.....1-1-2-1- بیوشیمی بنزودیازپین ها
- 20.....1-1-2-1- ساختار بنزودیازپین ها
- 22.....1-1-2-2- هویت مولکولی گیرنده بنزودیازپینی محیطی
- 22.....1-1-2-3- ساختار و عملکرد رسپتور بنزودیازپین محیطی

- 23..... 4-2-1 بافت خاص رسپتورهای بنزودیازپین محیطی
- 23..... 5-2-1 گیرنده های بنزودیازپین در قلب
- 24..... 6-2-1 نقش رسپتورهای بنزودیازپین محیطی در تنفس سلولی
- 25..... 7-2-1 نقش گیرنده های بنزودیازپین محیطی در قلب و استرس
- 25..... 8-2-1 مکانیسم های درگیر رسپتورهای PBR در پاسخ به استرس
- 26..... 9-2-1 پاسخ به استرس
- 27..... 1-9-2-1 درگیری گیرنده های PBR در استرس حاد و مزمن
- 27..... 2-9-2-1 تنظیم گیرنده های PBR ناشی از اختلالات اضطراب و استرس
- 28..... 10-2-1 تأثیر عوامل مختلف بر تغذیه
- 29..... 11-2-1 بنزودیازپین و گرسنگی
- 30..... 1-11-2-1 گرسنگی متناوب و رژیم محدودیت کالری
- 30..... 2-11-2-1 افزایش طول زندگی توسط محدودیت کالری و گرسنگی
- 31..... 12-2-1 تأثیر CR و استرس گرسنگی در سیستم قلب و عروق
- 32..... 13-2-1 واکنش های قلبی در حضور استرس گرسنگی
- 34..... 14-2-1 تأثیر گرسنگی بر ایسکمی
- 34..... 15-2-1 گرسنگی متناوب مزمن و ایسکمی میوکارد
- 36..... 16-2-1 نقش گرسنگی در تراکم گیرنده های بنزودیازپینی
- 36..... 3-1 اهداف
- 37..... 4-1 فرضیه ها

فصل دوم : مواد و روشها

38..... 1-2- قلب پستانداران کوچک

38..... 2-2- وسایل مورد نیاز

39..... 3-2- مواد مصرفی

40..... 4-2- مواد و وسایل مورد نیاز جهت رنگ آمیزی با تترازولیوم

روش کار :

40..... 5-2- نوع مطالعه، مکان و زمان انجام مطالعه

41..... 6-2- نگهداری حیوانات و حجم نمونه

41..... 7-2- گروه های آزمایش

42..... 8-2- مهیاسازی Exvivo با قلب کامل

42..... 9-2- تهیه محلول پرفیوژن

44..... 10-2- روش مهیا سازی لانگندورف

46..... 11-2- روش جراحی

49..... 1-11-2- مرحله تثبیت

49..... 2-11-2- مرحله ایسکمی

49..... 3-11-2- مرحله ری - پرفیوژن

49..... 12-2- ارزیابی آسیب ناشی از ایسکمی

50..... 1-12-2- اندازه گیری پارامترهای عملکردی قلبی

- 50.....1-1-12-2- روش جمع آوری داده ها
- 51.....2-1-12-2- معیار ورود و حذف
- 52.....2-12-2- روش تعیین سائز انفارکتوس
- 52.....1-2-12-2- تهیه پودر تترازولیوم
- 52.....2-2-12-2- حل کردن رنگ
- 53.....3-2-12-2- تهیه برش از قلب
- 53.....4-2-12-2- انکوباسیون برش ها در داخل رنگ
- 54.....5-2-12-2- قرار دادن برش ها در داخل Holder
- 56.....13-2- روش محاسبه حجم (Planimetry)
- 57.....14-2- روشهای آماری

فصل سوم : نتایج

- 581-3- پارامترهای عملکردی قلب
- 65.....2-3- انفارکتوس قلبی

فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری

- 66.....بحث
- 74.....پیشنهادات

75.....منابع

91.....چکیده لاتین

فهرست اشکال:

2.....	1-1	نمای ظاهری قلب پستانداران.....
4.....	2-1	گردش خون قلب.....
20.....	3-1	ساختار بنرودیازپین.....
21.....	4-1	مولکول PBR.....
44.....	1-2	طرح شماتیک لانگندورف.....
45.....	2-2	دستگاه لانگندورف.....
46.....	3-2	نحوه باز کرد قفسه سینه رت.....
47.....	4-2	کانوله کردن قلب.....
51.....	5-2	دستگاه Power lab.....
54.....	6-2	رنگ آمیزی با تترازولیوم.....
55.....	7-2	قرار دادن برش های قلب در Holder.....

فهرست جداول

- 1-3 مقایسه پارامترهای عملکردی قلب گروه کنترل.....58
- 2-3 مقایسه پارامتر عملکردی RPP در گروه های مختلف.....59
- 3-3 مقایسه پارامتر عملکردی LVDP در گروه های مختلف.....61
- 4-3 مقایسه پارامتر عملکردی HR در گروه های مختلف.....64
- 5-3 مقایسه پارامتر عملکردی CSF در گروه های مختلف.....64

فهرست نمودارها

- 1-3 مقایسه پارامتر عملکردی RPP در گروه های مختلف.....60
- 2-3 مقایسه پارامتر عملکردی LVDP در گروه های مختلف.....63
- 3-3 بررسی سایز انفارکتوس در گروه های مختلف.....65
- گراف شماره 162

مقدمه

Introduction

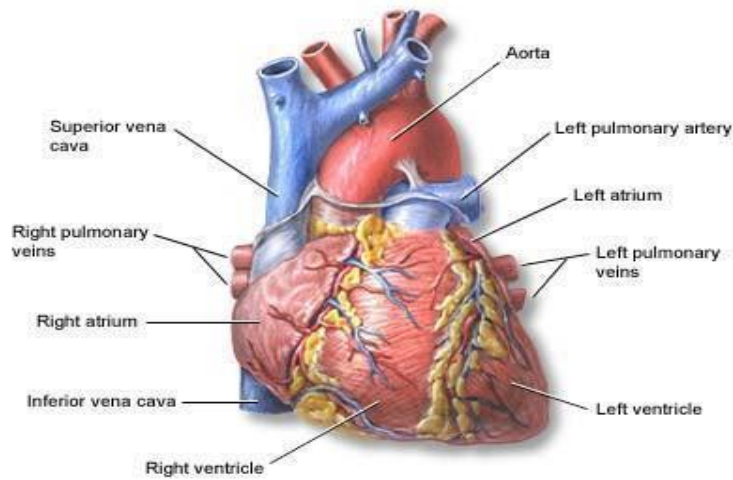
1-1-1 - گردش خون پستانداران :

دستگاه گردش خون پستانداران دارای اعمال متعددی از قبیل انتقال و توزیع مواد لازم در بافت ها و دفع مواد زائد حاصل از متابولیسم از طریق کلیه ها، شرکت در مکانیسم های هموستاتیک دیگر مانند تنظیم درجه حرارت بدن، ارتباطات شیمیایی هورمونی در بدن، تأمین اکسیژن و مواد غذایی درحالات فیزیولوژیک و دفع دی اکسید کربن بافت می باشد (Berne , 2001). در مجموع حفظ محیطی مناسب درکل مایعات بافتی بدن به منظور تأمین بقا و عملکرد بهینه سلولها می باشد (Brunner, 2008). در بافت ها سرعت جریان خون در پاسخ به نیاز آنها به مواد تغذیه ای تنظیم می شود. دستگاه گردش خون شامل قلب و عروق و دو جریان ریوی و سیستمیک می باشد (Guyton 2006).

1-1-1 - قلب :

قلب اندامی توخالی، مخروطی شکل و عضلانی است. این عضو مخروطی واژگون است که در مدیاستن میانی واقع گردیده است که از طرفین با ریه ها، از پشت با ستون مهره و از جلو توسط جناغ سینه (استرنوم) احاطه شده است (شکل 1-1). قلب به وسیله یک دیواره ی فیبری-عضلانی به دو بخش راست و چپ تقسیم شده است پس قلب در واقع دو پمپ مجزاست، قلب راست که خون را جهت تبادل اکسیژن و دی اکسید کربن به ریه ها پمپ می کند و این کار از طریق شریان ریوی صورت می گیرد (گردش خون ریوی) و قلب چپ خون تصفیه شده را از ریه ها دریافت و به سراسر بدن می فرستد (گردش خون سیستمیک یا عمومی) (Boll , 1992).

دیواره قلب از سه لایه مجزا، اندوکارد¹، میوکارد² و اپی‌کارد³ تشکیل شده است (Guyton 2006).



شکل 1-1: نمای ظاهری قلب پستانداران (chung 1990)

1- لایه داخلی یا اندوکارد: اندوکارد شامل یک لایه سلول پوششی به نام آندوتلیوم است و در عقب آن، بافت همبند ظریف زیرآندوتلیوم قرار دارد که ممکن است حاوی چند سلول عضله صاف باشد. در دیواره بین دو بطن در عمق این لایه دستگاه هدایتی قلب با ساختمان ویژه وجود دارد (Guyton , 2006).

2- لایه میانی یا میوکارد: این لایه از فیبرهای عضلانی غیرارادی تشکیل شده است و مسئول انقباض قلب می‌باشد. ضخامت آن در بطن‌ها بیشتر از دهلیزها است، بالاخص بطن چپ که بیشترین مقدار خون را دریافت می‌دارد. در بین سلولهای عضلانی قلب، بافت همبند حاوی رگ‌ها و اعصاب قرار گرفته است. میوکارد در دهلیز دارای کمترین ضخامت بوده و در بطن‌ها طبقه عضلانی دارای دولایه سطحی و عمقی است (Berne, 1993).

¹.Endocardium
².Myocardium
³.Epicardium

3- لایه خارجی یا اپی کارد: سطح خارجی قلب را غشای سروزی به نام اپی کارد می پوشاند که بر روی قلب چسبیده و یک بافت همبند می باشد که در ضخامت آن بافت چربی، رگها و اعصاب وجود دارند و در سطح بیرونی با یک لایه سلول پهن به نام مزوتلیوم پوشیده شده است. زیر مزوتلیوم لایه‌ی نازکی از بافت همبند محتوی الیاف الاستیک فراوان وجود دارد (Guyton, 2006).

1-1-2 - شریان های تغذیه کننده قلب :

قلب توسط دو شریان راست و چپ خونرسانی می شود. از ابتدای شریان آئورت صعودی بالاتر از دریچه آئورتی، دوشاخه شریان کوچک به نام شریان های کرونری جدا می شوند و به طرف راست و چپ قلب رهسپار می شوند.

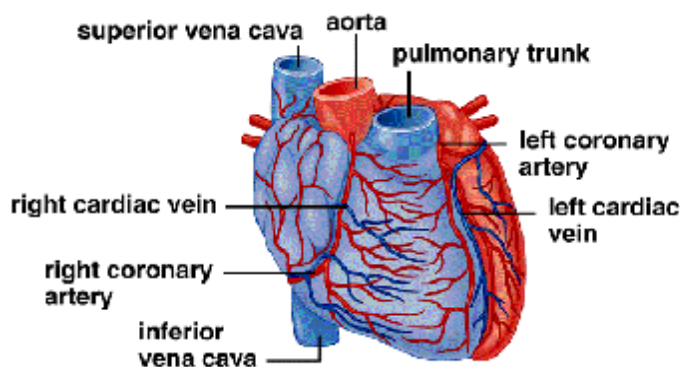
شریان کرونری راست: از سینوس آئورتیک قدامی شروع شده و از بین ریشه تنه شریانی ریوی و اوریکول راست ظاهر می گردد و در نهایت به شریان کرونری چپ می پیوندد. شریان کرونری چپ : این شریان بزرگتر از شریان کرونری راست بوده و از سینوس آئورتیک خلفی چپ (در بالای لت خلفی چپ دریچه آئورتیک) شروع شده و از بین تنه شریانی ریوی و اوریکول چپ ظاهر می شود. بطن ها به وسیله‌ی شاخه‌های راست و چپ کرونر و دهلیزها به وسیله‌ی شاخه‌های کوچک کرونر مربوط به خود مشروب می شوند (Guyton, 2011).

1-1-3 - ورید های قلب :

وریدهای قلب به دو گروه تقسیم می شوند:

1- وریدهایی که به سینوس کرونری تخلیه می‌شوند، عبارتند از: ورید قلبی بزرگ، ورید قلبی متوسط، ورید کوچک قلبی، وریدهای خلفی بطن چپ، ورید مایل دهلیز چپ و ورید حاشیه‌ای راست.

2- وریدهایی که به سینوس کرونری تخلیه نشده و مستقیماً به دهلیز راست تخلیه می‌شوند. عبارتند از: وریدهای قلبی قدامی و وریدهای کوچک تبزین¹ (Berne, 1993). (شکل 2-1)



شکل 2-1: گردش خون کرونری در قلب (chung 1990)

1-1-4 - سینوس کرونری :

ورید متسعی است که در ناودان کرونری چپ قرار دارد. حدود 2-3 سانتی متر طول داشته و از طریق دیوارخلفی دهلیز راست به آن تخلیه می‌گردد (Berne, 1993).

¹. Tebzin

1-1-5 - تشریح فیزیولوژیک عضله قلب :

عضله قلب مانند عضله مخطط¹ است اگر چه عضله قلب تحت کنترل ارادی نیست و از این نظر به عضله‌ی صاف شباهت دارد اما شباهت عضله قلب به عضله مخطط به علت میوفیبریل‌های تیبیک عضله‌ی قلب شامل اکتین و فیلامنت‌های میوزین می‌باشد (Berne, 1993). عضله‌ی قلبی یک سن سیشیوم متشکل از تعداد زیادی سلول عضلانی قلبی است که در آن سلول‌های قلبی به نحوی به هم متصلند که وقتی یکی از این سلول‌ها تحریک می‌شود، پتانسیل عمل به همه‌ی آن‌ها گسترش یافته و از سلولی به سلول دیگر در سراسر اتصالات شبکه‌ای منتشر می‌شود. سلولهای قلبی با طول حدود 150 میکرومتر و قطر 20 میکرومتر حاوی میتوکندریهای زیاد و یک هسته در مرکز سلول می‌باشند. شبکه سارکوپلاسمی عضله قلبی نسبت به عضله اسکلتی وسعت کمتری دارد و سیستم لوله عرضی گسترده با اتصال به شبکه سارکوپلاسمی تشکیل دیا² را می‌دهد، دیسک‌های درهم فرو رفته یا اینترکاله³ به طور عرضی در بین فیبرهای قلبی دیده می‌شوند. (Guyton, 2011).

1-1-5-1 - عضله قلبی :

عضله قلبی از سیستم اکتین، میوزین، ترپومیوزین و تروپونین ساخته شده است. عضله قلبی دارای فعالیت ریتمیک ذاتی و میوسیت‌های آن به صورت سن سیشیال با یکدیگر مرتبط هستند. سیستم توبولی T در عضله قلبی کامل تراست، درحالی که شبکه سارکوپلاسمیک آن گستردگی کمتری دارد و بنابراین ذخیره داخل سلولی کلسیم برای انقباض کمتر است در نتیجه عضله قلبی برای انقباض به

¹. Striated muscle

². Dyad

³. Intercalated Discs

کلسیم خارج سلولی متکی است، اگر عضله قلبی ایزوله و از کلسیم تخلیه شود، حدوداً در عرض یک دقیقه از تپش می‌ایستد (Brunner, 2008).

1-1-5-2 - پتانسیل‌های عمل در عضله قلبی :

پتانسیل استراحت غشا در سلول عضله قلبی 85- تا 95- میلی‌ولت و در سلول‌های الکتریکی (نودال و پورکنژ) حدود 90- تا 100- میلی‌ولت است. دیپلاریزاسیون سلولی با ورود یون‌های بار مثبت به داخل سلول آغاز می‌شود. میوسیت‌های بطنی و دهلیزی با ورود سدیم از طریق کانال‌های سریع سدیمی به داخل سلول به سرعت دیپلاریزه می‌شوند (Brunner, 2008). این میوسیت‌ها پتانسیل عمل واکنشی سریع دارند. کانال‌های کلسیمی - سدیمی آهسته تر باز شده اما برای چند دهم ثانیه باز باقی می‌مانند و سبب ایجاد یک مرحله طولانی دیپلاریزاسیون و ایجاد کفه در پتانسیل عمل می‌شوند. پس از شروع پتانسیل عمل نفوذپذیری غشای عضله‌ی قلبی برای یون‌های پتاسیم کاهش چشمگیری می‌یابد. این کاهش احتمالاً به دلیل ورود مقادیر زیاد کلسیم از طریق کانال‌های کلسیمی است. پس از بسته شدن کانال‌های آهسته سدیمی - کلسیمی و توقف ورود یون‌های کلسیم و سدیم نفوذپذیری غشا به یون‌های پتاسیم به سرعت افزایش می‌یابد. با خارج شدن سریع پتاسیم از فیبر، پتانسیل غشا به حد استراحت بازگشته و پتانسیل عمل به انتها می‌رسد (Guyton, 2006).