Archive of SID

Original Article

The Effect of Amiodarone on the Ultrastructure of Ganglionic Neurons of Rabbit Heart

Shams A. Ph.D.*, Mehraein F., Ph.D.

* P.O.Box: 14496-14525, Anatomy Department, Iran Medical Sciences University, Tehran, Iran

Abstract

Purpose: This research has been carried out to study the morphological and ultrastructural changes of rabbit heart ganglionic neurons and nerve fibers after treatment with Amiodarone.

Materials and Methods: 21 rabbits were divided into control and two experimental groups. The first experimental group for one week and the second experimental group for two weeks were injected intra-peritoneally 80 mg/kg Amiodarone. The control group received normal saline the same dose as Amiodarone .Then the animals were anesthetized and perfused with Karnovsky s fixative and the tissues were fixed and prepared for electron microscope study.

Results: Ultrastructural changes in neurons and nerve fibers of experimental groups in comparison with control group included shrinkage of nuclear envelope and formation of electron dense masses in myelin of nerve fibers.

Conclusion: These results indicate that Amiodarone causes ultrastructural changes in neurons and nerve fibers of intrinsic cardiac ganglia.

Key words: Amiodarone, Intrinsic Cardiac Ganglia, Ultrastructure

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله تحقیقی

تأثیر آمیوداروِن بر فراساختار نورونهای گانگلیونیک قلب خرگوش

علیرضا شمس .Ph.D*، فرشته مهرآئین .Ph.D **

* بخش آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

** بخش بافت‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران

تاریخ وصول: مهر ماه ۸۵، تاریخ پذیرش: آذر ماه ۸۵

چکیده

هدف: تغییرات مورفولوژیک و فراساختاری نورونها و رشته‌های عصبی گانگلیونهای عصبی قلب خرگوش پس از درمان با آمیوداروِن

مواد و روشها: تعداد ۲۱ خرگوش به یک گروه کنترل و دو گروه آزمایشی تقسیم شدند. به گروه آزمایشی اول به‌مدت یک هفته و به گروه آزمایشی دوم به مدت دو هفته داروی آمیوداروِن به میزان ۸۰mg/kg بصورت داخل صفاقی تزریق شد و گروه کنترل نیز دوز مشابهی از سرم فیزیولوژی دریافت کردند. سپس خرگوشها بیهوش شدند و با روش پرفیوژن و با استفاده از تثبیت‌کننده کارنوسکی بافتهای آنها تثبیت و برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی آماده‌سازی شد.

یافته‌ها: تغییرات فراساختاری در نورونها و رشته‌های عصبی گروههای آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد که شامل جمع‌شدگی غشای هسته نورونها و تشکیل توده‌های الکترون دنس در میلین رشته‌های عصبی بود.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان می‌دهد که آمیوداروِن باعث تغییرات فراساختاری در نورونها و رشته‌های عصبی گانگلیونهای داخل قلبی می‌شود.

کلید واژه‌ها: آمیوداروِن، گانگلیونهای داخل قلبی، فراساختار

مقدمه

یکی از علل مهم مرگهای ناگهانی در جوامع مختلف بروز ایسکمی‌های قلبی است که می‌تواند عوارضی مانند آریتمی‌های قلب و فیبریلاسیون بطنها و دهلیزها را به‌دنبال داشته باشد [٤-١].

تنظیم فعالیت و عملکرد قلب تحت کنترل اعصاب خودکار است به‌طوری‌که رشته‌های این اعصاب تشکیل شبکه‌های عصبی قلبی را می‌دهند. همراه با این شبکه تنظیم‌کننده، گانگلیونهای عصبی داخل قلبی (Intrinsic Cardiac Ganglia) نیز نقش مهمی در تنظیم فعالیت داخل قلبی دارند. رشته‌های پیش سیناپسی اعصاب خودکار به شبکه عصبی داخل قلبی می‌روند و پس از سیناپس با نورونهای گانگلیونی، رشته‌های پس سیناپسی خارج شده از گانگلیون به سیستم تولید و هدایت ضربان قلب می‌روند [٥].

درمقاله‌ای که توسط تامسون (Thompson) و همکاران در سال ۲۰۰۰ ارائه شد برای اولین بار این سیستم Heart Brain نامیده شد. گانگلیونهای عصبی داخل قلبی حتی پس از قطع کامل اعصاب باعث حفظ عمل طبیعی قلب هستند [٦].

اطلاعات جمع‌آوری شده راجع به شبکه عصبی درون قلبی در بیست سال اخیر نشان می‌دهدکه این شبکه شامل

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، بخش بافت شناسی، صندوق پستی: ١٤٤٩٦١٤٥٢٥

Email:Femehra@yahoo. Com

www.SID.ir

Archive of SID

نورونها و اکسونهایی است که با نورونهای مذکور سیناپس می‌دهند [۵].

ایسکمی میوکارد می‌تواند بر گانگلیونهای داخل قلبی تأثیر بگذارد زیرا شاخه‌هایی از شرائین کرونر خونرسانی به این گانگلیونها را به‌عهده دارد [۷] وکاهش خونرسانی به آنها می‌تواند باعث بروز آریتمی‌ها شود. در دهه‌های اخیر داروهای مختلف ضدآریتمی آزمایش شده است [۸]. از میان این داروها آمیودارون که مشتقی از بنزوفوران به فرمول $C_{25}H_{29}I_2NO3$ است از سال ۱۹۸۵ در بیماران با آریتمی‌های قلب به‌کار می‌رود. این دارو به‌عنوان β بلوکر ضربان قلب و انقباضهای ناقص بطن را کاهش می‌دهد و از فیبریلاسیون آن جلوگیری می‌کند [۹]. از آنجائی‌که مطالعه اثرات آمیودارون بر نورونهای گانگلیونهای عصبی داخل قلبی انجام نشده است به‌همین جهت ضروری به‌نظر می‌رسد که مکانیسم اثر آمیودارون بیشتر بررسی شود. سؤالی که مطرح می‌شود این است که آیا آمیودارون بر گانگلیونهای عصبی داخل قلبی نیز تأثیر می‌گذارد یا خیر. سؤالی که انگیزه این تحقیق بوده است بنابراین این پژوهش برای مطالعه آثار آمیودارون بر فراساختار نورونهای گانگلیونهای عصبی داخل قلبی انجام گرفته است.

مواد و روشها

برای بررسی آثار داروی آمیودارون بر فراساختار سلولهای گانگلیونیک داخل قلبی خرگوش، تعداد ۲۱ خرگوش بالغ نر به وزن تقریبی ۱/۵Kg که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود به‌مدت یکماه در شرایط استاندارد تغذیه و نگهداری شدند تا با شرایط حیوانخانه سازگار گردند. سپس حیوانات به یک گروه کنترل و دو گروه آزمایشی اول و دوم تقسیم شدند. به حیوانات گروه آزمایشی اول آمیودارون ساخت شرکت EBEWE pharma کشور اطریش به‌طور روزانه با دوز ۸۰ mg/kg به‌مدت یک هفته به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. به گروه دوم نیز آمیودارون با همان دوز به‌مدت دو هفته تزریق شد. خرگوشهای گروه کنترل به‌جای دارو، دوز مشابهی از سرم فیزیولوژی دریافت کردند. پس از طی دوره درمان، حیوانات با استفاده از تزریق مخلوطی از کتامین و گزیلازین به‌مقدار ۱۰۰ gr /۰/۲ ml تحت بیهوشی عمومی قرار گرفتند و پرفیوژن خرگوشها با استفاده از محلولهای گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد و پارافرمالدئید ٤ درصد و سرم فیزیولوژی و هپارین ۵۰۰۰ u/l انجام شد. پس از تشریح حیوانات چربی‌های اپیکارد، قاعده بطنها و خلف دهلیزها جدا شد و پس از شستشوی چربی ها با بافرفسفات در مایع تثبیت‌کننده گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد و پارافرمالدئید ٤ درصد قرار داده شد و در یخچال نگهداری شد. برای مطالعه گانگلیونها با استفاده از استریومیکروسکوپ و سرنگ حاوی رنگ ترپیان بلو، چربیها رنگ شدند و بعد رشته‌های عصبی همراه با گانگلیونها از بافت چربی اپیکارد با دقت و صرف وقت فراوان جدا و برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی آماده شد.

بررسی با میکروسکوپ الکترونی ترانزمیشن (TEM)[1]

مطالعه نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی ترانزمیشن شامل مراحل ثبوت، آب‌گیری، قالب‌گیری، برش‌گیری، رنگ‌آمیزی و مشاهده با میکروسکوپ و عکسبرداری است .

ابتدا نمونه‌ها در محلول گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد و پارافرمالدئید ٤ درصد قرار داده شد و سپس به مدت دو ساعت در محلول تترااکسید اسمیوم یک درصد قرار داده شد و پس از آب گیری در استون با غلظت‌های رو به افزایش آغشتگی با رزین اپوکسی شرکت TAAB انجام شد و پس از قالب‌گیری در رزین در oven با دمای ٦۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و پس از ٢٤ ساعت نمونه‌ها از قالب خارج شد. پس از اصلاح قالب‌ها و تهیه برش‌های فوق نازک با استفاده از نیترات سرب و یورانیل استات برش‌ها رنگ‌آمیزی گردید.

1 . Transmission Electron Microscope

www.SID.ir

Archive of SID

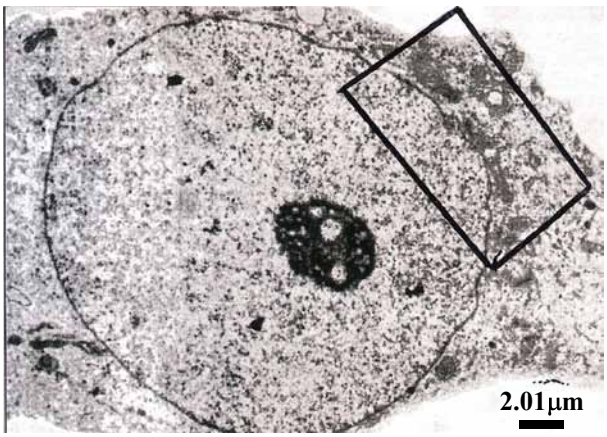
یافته‌ها

دراین تحقیق نورونها و رشته‌های عصبی داخل قلبی خرگوش در گروههای کنترل و آزمایشی یک و دو با میکروسکوپ الکترونی بررسی و مطالعه شد.

گانگلیونهای عصبی داخل قلبی اغلب در چربی اپیکارد و سطح خلفی دهلیزها و قاعده بطنها و به‌طور پراکنده در نواحی قاعده آئورت و شریان ریوی وجود داشتند که پس از جدا کردن چربی از مناطق مذکور، گانگلیونهای موجود در آنها با استفاده از استریومیکروسکوپ جدا شدند.

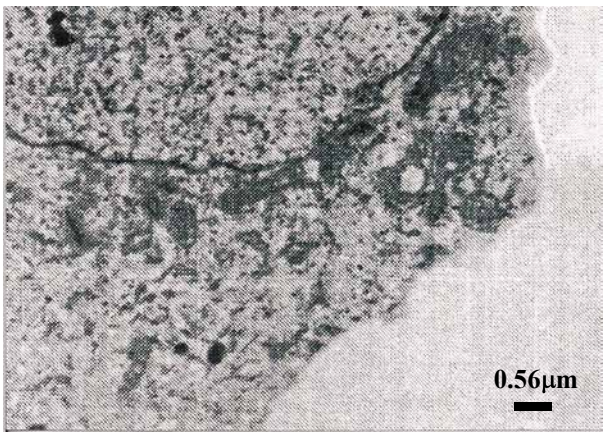
مشاهدات فراساختار گانگلیونها

نورونهایی که در گانگلیونهای عصبی داخل قلبی خرگوشهای گروه کنترل وجود داشتند دارای هسته ای گرد باهستک مشخص و یوکروماتین فراوان بودند. غشاء هسته دارای تمامیت بود و بطور کامل اطراف هسته را احاطه کرده بود (شکل ۱ و ۲). لایه های میلین در رشته‌های عصبی دانسیته‌ای طبیعی و یکنواخت را نشان می‌داد (شکل ۳) ولی در خرگوشهای گروه آزمایشی ۱ و ۲ که به مدت یک و دو هفته تحت درمان با آمیودارون قرار گرفته بودند برخی از

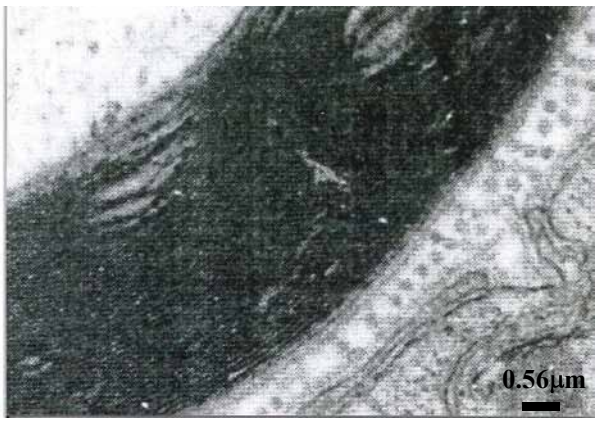


شکل ۱. یک نورون طبیعی با هسته‌ای گرد و هستک مشخص.
باز: ۲/۰۱ میکرومتر

نورونهای گانگلیونهای عصبی داخل قلبی شروع تغییرات دژنراتیو را نشان می‌دادند به‌طوری‌که میزان هتروکروماتین هسته افزایش یافته بود و در قسمتهایی از هسته تراکم بیشتری از هتروکروماتین مشاهده می‌شد، هستک قابل مشاهده نبود و هسته تغییر شکل یافته بود و از حالت گرد به صورت نامنظم درآمده بود (شکل ٤).



شکل ۲. تصویر بزرگ شده داخل مربع مستطیل در شکل ۱ برای نشان دادن میتوکندری‌ها با غشاء و کریستالهای طبیعی.
بار: ۰/٥٦ میکرومتر

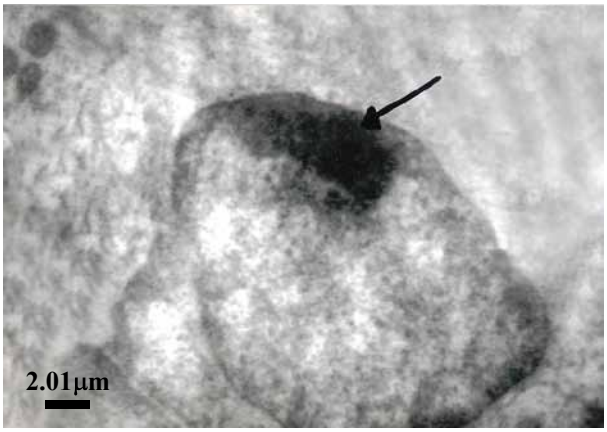


شکل ۳. یک رشته عصبی با میلین طبیعی. بار: ۰/٥٦ میکرومتر

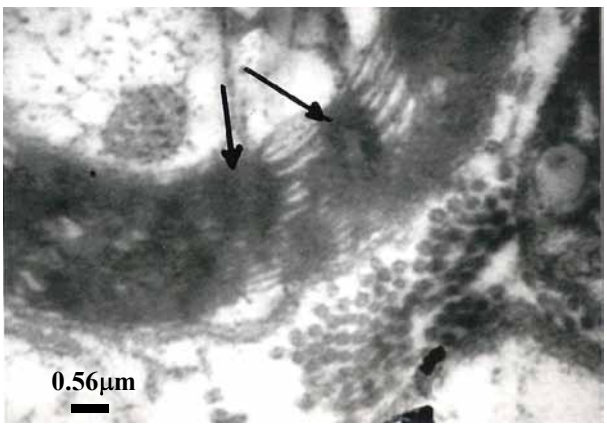
علاوه بر تغییرات ذکر شده، در بررسی رشته‌های عصبی در گروه آزمایشی دوم تغییراتی در میلین این رشته‌ها دیده می‌شد به‌طوری‌که بین لایه‌های میلین توده‌های الکترون دنس به‌وجود آمده بود (شکل ۵).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴. تغییرات شکلی هسته و افزایش هتروکرماتین (پیکان) در بعضی نورونهای آزمایشی یک که به مدت یک هفته آمیوداروون دریافت کرده بودند. بار: ۲/۰۱ میکرومتر



شکل ۵. توده‌های الکترون دنس (پیکانها) در لایه‌های میلین رشته عصبی گروه آزمایشی دو. بار: ۰/۵۶ میکرومتر

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که گانگلیونهای عصبی داخل قلبی درچربی اپیکارد و در سطح خلفی دهلیزها و قاعده بطنها قرار دارد همچنان‌که بسیاری از محققین دیگر نشان داده‌اند که این گانگلیونها در پستانداران در چربی اپیکارد، قاعده عروق بزرگ قلب و قاعده بطنها جای دارند [۱۲-۱۰].

برای بررسی آثار آمیوداروون بر گانگلیونهای عصبی داخل قلبی از سه گروه خرگوش که به دسته‌های کنترل و آزمایشی یک و دو تقسیم شده بودند استفاده گردید. خرگوشهای گروه آزمایشی۱ به‌مدت یک هفته آمیوداروون دریافت کرده بودند وگروه آزمایشی۲ به‌مدت دو هفته با آمیوداروون تیمار شده بودند.

گانگلیونهای عصبی داخلی قلبی آنها پس از تشریح و آماده‌سازی با میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت. نورونهای گانگلیونی داخل قلبی در خرگوشهای گروه کنترل دارای هسته کمرنگ و حاوی یک هستک بود و غشای هسته طبیعی بود. اما در گروه‌های آزمایشی یک و دو در برخی نورونها شروع تغییرات مورفولوژیک شامل تغییرشکل هسته مشاهده شد که این تغییرات در نورونهای گانگلیونهای عصبی داخل قلبی گروه آزمایشی ۲ از شدت بیشتری برخورداربود و چروکیدگی نورونها قابل مشاهده بود (misshapen).

Misshape شدن نورونهای گانگلیونهای عصبی بیانگر شروع مرگ نورونی است [۱۳]. تغییر شکل نورونها پس از ایسکمی قلب توسط آرمور و همکاران در سال ۲۰۰۰ بررسی شده است. این محققین گانگلیونهای عصبی داخل قلبی در بیماران دچار ایسکمی قلب را مطالعه نموده و مشاهده کردند که بعضی ازنورونهای این گانگلیاها چروکیده و دستخوش تغییرات شکلی شده‌اند همچنین وجود گرانولهای ظریف وانکلوزیونها در نورونهای تغییر شکل یافته را گزارش دادند که در تغییرات دژنراتیو نورونها مشاهده می‌شود.

در این تحقیق تغییرات دژنراتیو در خرگوشهای گروه آزمایشی دو که به‌مدت بیشتری تحت درمان با آمیوداروون بودند شدیدتر بود و این نشان می‌دهد که هرچه دوز دارو و مدت در معرض قرارگیری با آن بیشتر باشد تغییرات شدیدتر است. سانتورو (Santoro) و همکاران در سال ۱۹۹۲ در تحقیقی آمیوداروون را به داخل عصب تیبیال موش تزریق کردند و به‌تدریج دوز آن را بالا بردند و مشاهده کردند که دژنره شدن رشته‌های عصب به‌وقوع پیوسته است، به‌نظر می‌رسد که آمیوداروون یک اثر سمی مستقیم بر اکسون داشته باشد. این محققین پیشنهاد می‌کنند که تغییرات نورونها مربوط

www.SID.ir

Archive of SID

به تغییر در رشته‌های عصبی است [١٤].

ماسون (Mason) در سال ۱۹۸۷ تأثیر آثار سمی آمیودارون را در ارگانهای مختلف بررسی نموده است و ماتولا (Matola) و همکاران در سال ۲۰۰۰ آثار سمی آمیودارون را بر سلولهای غده تیروئید بررسی کرده اند . تحقیقات آنها نشان داد که این دارو سبب مرگ سلولی و آپوپتوز می‌شود [١٦].

وجود توده‌های الکترون دنس در لایه‌های میلین رشته‌های عصبی که در این تحقیق مشاهده شده است شروع تغییرات در رشته‌های عصبی را نشان می دهد و چون تغییرات پیشرونده به دوز و مدت زمان تجویز دارو بستگی دارد؛ به‌نظر می‌رسد با ادامه یافتن تجویز دارو با دوزهای زیادتر و مدت طولانی‌تر تغییرات شدیدتری به‌وجود آید.

آمیودارون مؤثرترین داروی ضد آریتمی است که در کمپلکسهای محلول در چربی در لیزوزومهای بافتهای مختلف تجمع می‌یابد که منجر به بروز نوروپاتی می‌شود. فردریک (Fredric) و همکاران در سال ۱۹۸۸ با تجویز دوزهای طولانی مدت آمیودارون به موشها ترمیم رشته‌های عصبی در عضله را به تعویق انداختند و با افزایش دوز دارو از بین رفتن رشته‌های عصبی در عضلات را مشاهده کردند [۱۷]. پلیسر (Pellissier) و همکاران در سال ١٩٨٤ چهار مورد نوروپاتی را در بیمارانی که آمیودارون مصرف کرده بودند را گزارش دادند و نقایصی در میلیینه شدن اعصاب مشاهده کردند [۱۸].

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده از آمیودارون تغییرات دژنراتیو در نورونهای گانگلیونهای عصبی داخل قلبی به‌وجود می‌آورد که نشانه های آن تغییرات مورفولوژیک در نورون شامل تغییرات شکلی هسته وافزایش هتروکروماتین است که همه این علایم بیانگر شروع دژنرسانس نورونها است. همچنین وجود توده‌های الکترون دنس در لایه‌های میلین رشته‌های عصبی بیانگر تغییرات در میلینه شدن رشته‌های عصبی است. همانطور که ذکر شد ایسکمی های قلب بر گانگلیونهای داخل قلبی تأثیر می‌گذارد و می‌تواند به‌طور ثانوی به علت کاهش جریان خون به این گانگلیونها مرگ نورونها را به‌دنبال داشته باشد و چون این بیماران پس از ایسکمی‌های قلبی دچار آریتمی می‌شوند؛ مؤثرترین دارو یعنی آمیودارون به عنوان β بلوکر و افزایش‌دهنده جریان خون کرونر به آنها تجویز می‌شود ولی چون دراین تحقیق آثار این دارو بر گانگلیونهای داخل قلب مشخص شد و نشان داده شد که این دارو سبب مرگ نورونها و تغییر در رشته‌های عصبی این گانگلیونها می‌شود. بنابراین می‌توان گفت که در دراز مدت استفاده از این دارو آثار وخیم و بیشتری بر عملکرد قلب به‌وجود می‌آورد. به همین دلیل پیشنهاد می‌شود که مصرف این دارو محدود شود و روشها و داروهای دیگری که آثار جانبی کمتری دارد مورد بررسی و استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران که با تصویب این طرح فرصت انجام آن را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. **Underwood RD, Sra J, Akhtar M.** Evaluation and Treatment strategies in patients at high risk of sudden death postmyocardial infarction. Clin Cardiol 1997; 20: 753-8.
2. **Chen Ls, zhou S, Fishbien MC, Chen Ps.** New perspectives on the role of autonomic nervous system in the genesis of arrythmias. J Cardiovasc Electrophysiol 2007; 18(1): 123-7.
3. **Cao JM, Chen Ls, Kenknight BH, Ohara T., Lee MH. Tsai J., Lai www, karagueuzian HS,** et al. Nerve sprouting and sudden cardiac death. Circ Res 2000; 86: 816-21.

www.SID.ir

Archive of SID

4. **Jardine DL, Charles CJ, Forrester MD, Forrester M, Whitehead M, Nicholls MG.** A neural mechanism for sudden death after myocardial infarction. Clin Auton Res 2003; 13: 339-41.
5. **Armour JA, Murphy DA, Yuan BX, Macdonald S, Hopkins D.** Gross and microscopic anatomy of the human intrinsic caradiac nervous system. Anato Rec. 1997; 247: 289-98.
6. **Ardell JL.** Structure and function of mammalian intrinsic cardiac neurons. In Neurocardiology. JA Armour and J. L Ardell. ed. Oxford university press . NewYork, 1994, pp 95–114.
7. **Thompson GW, Collier K, Ardell JL.** Functional interdependence of neurons in a single canine intrinsic cardiac ganglion ated plexus. physiol. 2002; 528(3): 561–71.
8. **Echt DS, leibson RP, Mitchell B., Peter RW.** Mortality and morbidity in patients receiving encainide, Flecainide or placebo: the cardiac arrhythmias suppression trial. N Engl J Med 1991; 324: 781–8.
9. **Connolly SJ.** Evidence – based analysis of amiodarone efficacy and safety. Circulation. 1999; 100: 2025–34.
10. **Smith RB.** The occurance and location of intrinsic cardiac ganglia and nerve plexuses in the human neonate. Anat Rec. 1970; 164: 33-40.
11. **Singh S, Johnson PI, Lee RE.** Topograply of cardiac Ganglia in the adult human heart. J Thoras Cardiovasc Surg. 1996; 112: 943–53.
12. **Chen RF, Chiou RJ, Yen CT.** Distribution and number of intracardiac Ganglia cells in the rat. Acta Zoology Taiwanica. 1997; 8(1): 47-54.
13. **Duchen LW, Anjorin A, Watkins PJ.** Pathology of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. Ann Int Med 1980; 92: 301–3.
14. **Santoro L, Babieri F, Nucciotti R. Fenzi G.** Amiodarone induced experimental acute. neuropathy in Rats. Musc Nerv 1992; 15: 788–95.
15. **Mason JW.** Amiodarone. N Engl J Med 1987; 316: 455–66.
16. **Matola T., Ascoli F., Fenzi G.** Amiodarone induces cytochrome C release and apoptosis through iodine–independent mechanism. The journal of clinical Endocrinology & Metabolism. 2000; 85: 4323–30.
17. **Fredric R. Costa Jussa. Guevara A.** Changes in denervated skeletal muscle of amiodarone fed mice. Muscle & Nerve. 1988; 11: 627–37.
18. **Pellissier JF, Pouget J.** Peripheral neuropathy induced by amiodarone chlorhydrate. A Clinicopathological study. J Neurol Sci 1984; 63(2): 251–66.

www.SID.ir