

بررسی ویژگی‌های بافت‌شناسی و بیوشیمیایی دیواره سرخرگ و سیاهرگ در بیماران کاندید جراحی بای‌پس کرونر

چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۰۸ آنالیز: ۱۳۹۳/۰۶/۲۰

نسیم دانا^۱

شیوا صفوی^۲، نفیسه نیلی^۲

بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی^۲

شقایق حق جوی جوانمرد^{۳*}

۱- مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی، دانشگاه

علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی

کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان،

ایران.

زمینه و هدف: شکست پیوند در حال حاضر یک مشکل عمده در جراحی بای‌پس عروق کرونر است. تجزیه کلاژن و الاستین، فراوان‌ترین پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی دیواره عروق توسط ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) منجر به بازآرایی ماتریکس خارج سلولی و در نتیجه تغییر ساختار دیواره عروق می‌شود. هدف این مطالعه مقایسه خصوصیات بافت‌شناسی و بیوشیمیایی سرخرگ و سیاهرگ مربوط به شکست پیوند بود.

روش بررسی: در یک مطالعه مقطعی در بیمارستان‌های قلب اصفهان طی تیر ۱۳۸۹ تا آذر ۱۳۹۰، بقایای عروق از عمل بای‌پس ۸۰ بیمار جمع‌آوری شد و پس از یکنواخت‌سازی داده‌ها و حذف عوامل مخدوش‌کننده، نمونه‌های ۱۱ بیمار مرد غیردیابتی بررسی شد. رگ‌های کاندید از نظر بافت‌شناسی، نسبت الاستین به کلاژن و میزان MMPs با سرخرگ آئورت مقایسه شدند. میزان MMP2,9، با استفاده از روش ژلاتین زایموگرافی تعیین و محتوای الاستین و کلاژن نمونه‌ها با روش آنزیماتیک اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: میزان MMP-2 و MMP-9 فعال و غیرفعال در سرخرگ لیما (Left Internal Mammary Artery, LIMA) مشابه آئورت بود ولی میزان آنها در سرخرگ رادیال و ورید صافن به طور معناداری بیشتر از آئورت بود. نسبت الاستین به کلاژن در سرخرگ لیما ($1/92 \pm 1/15$) شبیه آئورت ($3/4 \pm 1/66$) بود ولی این نسبت در ورید صافن ($1/07 \pm 0/47$) و شریان رادیال ($1/14 \pm 0/39$) به طور معناداری ($P=0/02$) از میزان آن در آئورت کمتر بود. پلاک آترواسکلروز در رادیال اکثر بیماران وجود داشت ولی در لیما فقط در یک مورد مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: وجود پلاک آترواسکلروز در رادیال و ضخیم بودن لایه ایتیمیا در ورید صافن در اکثر بیماران و همچنین پایین بودن نسبت الاستین به کلاژن و بالا بودن میزان آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز در رادیال و ورید صافن می‌تواند منجر به شکست پیوند شود. نتایج این پژوهش استفاده از سرخرگ لیما را به‌عنوان مناسب‌ترین رگ کاندید برای عمل بای‌پس را تأیید می‌کند.

کلمات کلیدی: عمل قلب باز، ماتریکس متالوپروتئینازها، شریان رادیال، ورید صافن، شریان لیما.

* نویسنده مسئول: اصفهان، خیابان هزار جریب،

دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، معاونت تحقیقات و

فناوری، مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی.

تلفن: ۰۳۱-۳۷۹۲۲۹۵

E-mail: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir

مقدمه

بیماری‌های قلبی-عروقی خواهد بود.^۱ بای‌پس عروق کرونر (Coronary Artery Bypass Graft, CABG) یکی از درمان‌های رایج در بیماران مبتلا به انسداد عروق کرونر است.^{۲-۵} موفقیت یک بای‌پس عروق کرونر بستگی به باز بودن طولانی مدت شریان یا ورید پیوندی دارد.^۶

در سطح جهانی، تعداد مرگ و میر ناشی از بیماری‌های قلبی و عروقی و گردش خون تا یک سوم بین سال‌های ۱۹۹۰ و ۲۰۱۰ افزایش یافته و تا سال ۲۰۱۵، از هر سه مرگ و میر ناشی از

فراوان‌ترین پروتئین‌های موجود در دیواره عروق هستند و مسئول صفات مکانیکی از جمله قدرت کششی و صفات الاستیسیته این بافت می‌باشند. بنابراین تغییر در میزان کلاژن و الاستین نقش مهمی در خصوصیات و عملکرد دیواره عروق دارد. هدف از انجام این پژوهش تعیین میزان MMPها و پروتئین‌های مهم ماتریکس خارج سلولی (Extracellular Matrix, ECM) عروقی است که به‌طور معمول به‌عنوان گرافت در عمل CABG استفاده می‌شوند. مقایسه این پارامترها در این رگ‌های کاندید با پارامترهای آئورت می‌تواند به انتخاب رگ مناسب برای عمل بای‌پس کمک کند.

روش بررسی

در یک مطالعه مقطعی که از تیر ۱۳۸۹ تا آذر ۱۳۹۰ انجام شد، سرخرگ‌های لیما، رادیال، ورید صافن و نمونه‌های آئورت حدود ۸۰ بیمار جمع‌آوری شد. مطالعه قبل از شروع در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بررسی و تأیید شد (۲۸۶۱۶۷). از کلیه شرکت‌کنندگان در مطالعه فرم رضایت آگاهانه دریافت شد. نمونه‌ها از بیمارانی گرفته شد که پس از تشخیص CAD توسط آنژیوگرافی در بیمارستان‌های چمران، سینا و سپاهان اصفهان تحت عمل جراحی بای‌پس قرار گرفتند. پس از یکنواخت‌سازی داده‌ها و حذف عوامل مخدوش‌کننده مانند نمونه‌های مربوط به بیماران معنادار به دخانیات و مبتلا به دیابت و فشارخون، فقط نمونه‌های مربوط به ۱۱ بیمار مرد غیردیابتی که هر سه رگ لیما، رادیال و ورید صافن آنها در عمل بای‌پس استفاده شده بود، برای انجام آزمایشات انتخاب شد. نمونه‌ها از مازاد (حدود دو تا سه سانتی‌متر) ورید صافن، شریان‌های لیما و رادیال که در عمل بای‌پس مورد استفاده قرار نمی‌گرفتند و تکه‌های آئورت را که در زمان زدن پیوند با پانچ جدا شدند از هر بیمار تهیه و در داخل نرمال سالین سرد و هپارین قرار داده شدند.

لازم به ذکر است که به منظور مهار فعالیت‌های آنزیمی تمام مراحل تهیه نمونه‌ها بر روی یخ انجام گرفت.

۱- بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی: برای بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی شریان‌های آئورت، لیما و رادیال و ورید صافن از نمونه‌های فیکس شده در فاین فیکس (Arian Chemical Gostar, Tabriz, Iran) استفاده شد. این نمونه‌ها ابتدا در پارافین قالب‌گیری و

در اوایل سال ۱۹۴۱ وینبرگ برای اولین بار Left Internal Mammary Artery (LIMA) را به‌عنوان گرافت به شریان کرونر نزولی قدامی (Left Anterior Descending Coronary Artery, LAD) پیوند زد (آناستوموز) و در دهه بین ۱۹۶۳-۱۹۵۴ حدود ۱۴۰ عمل انجام داد.^۷ عمل قلب باز با این تکنیک تا سال ۱۹۷۰ یعنی تا زمانی که تکنیک‌های بای‌پس مستقیم عروق کرونر به آئورت معرفی شد، ادامه پیدا کرد. بیشتر تکنیک‌هایی که امروزه در عمل بای‌پس استفاده می‌شود در فاصله زمانی دهه ۱۹۵۰-۱۹۶۰ معرفی شدند. استفاده از ورید صافن در عمل بای‌پس به‌عنوان یک گرافت به سرعت توسعه یافت و به دنبال آن کارپنتایر برای اولین بار از شریان رادیال به‌عنوان گرافت در عمل بای‌پس استفاده کرد.^{۹،۸}

در عمل قلب باز فرد بر اساس تعداد رگ‌های گرفتار، یک تا سه گرافت از عروق خونی نقاط دیگر بدن دریافت می‌کند. عروقی که به‌طور معمول برای عمل بای‌پس مورد استفاده می‌گیرند عبارتند از: شریان پستانی داخلی (Internal mammary artery)، شریان رادیال (Radial artery) و ورید صافن (Saphenous vein).^{۱۰}

Internal Mammary Artery (IMA) که شریان توراسیک داخلی Internal Thoracic Artery (ITA) نیز نامیده می‌شود از نظر آناتومی انسانی شریانی است که خون را به دیواره جلویی قفسه سینه و سینه‌ها می‌رساند. این شریان به شاخه چپ و راست تقسیم می‌شود. جراحان به‌طور عمده از شریان سمت چپ یا Left Internal Mammary Artery (LIMA) به‌عنوان گرافت استفاده می‌کنند.^{۱۱}

یکی از مشکلات عمده بعد از عمل CABG تنگ شدن یا بسته شدن گرافت است. به‌طور معمول در اولین سال پس از عمل، ترومبوسیس و تجمع پروتئین‌های رشته‌ای (فیبروسیس) در لایه ایتیمیای گرافت اتفاق می‌افتد. در مراحل بعدی ایتیمیا هاپرپلازیا و آترواسکلروزیس عوامل عمده شکست گرافت (Graft failure) هستند.^{۱۱} ریمودلینگ پراکنده در طول گرافت‌های وریدی در مراحل اولیه پس از CABG به دلیل قرار گرفتن ورید در جریان خون شریانی و در نتیجه تغییر شرایط همودینامیکی (Shear stress) گرافت است که می‌تواند منجر به شکست گرافت شود.^{۱۲}

ماتریکس متالوپروتئینازها (Matrix Metalloproteinase, MMP)، به‌ویژه MMP-2 و MMP-9 در بیماری‌های قلبی-عروقی از جمله آترواسکلروزیس نقش اساسی دارند.^{۱۳} کلاژن و الاستین از

منحنی استاندارد با استفاده از اعداد جذب نوری به‌دست آمده از استانداردها و با کمک نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2003، رسم شد و رابطه‌ی بین مقدار هیدروکسی‌پرولین و جذب نوری در طول موج ۵۵۰ nm به صورت معادله‌ی درجه اول (رگرسیون خطی) به‌دست آمد. سپس با کمک فرمول خطی به‌دست آمده و با استفاده از اعداد مربوط به جذب نوری نمونه‌ها میزان کل هیدروکسی‌پرولین برای هر نمونه محاسبه گردید. مقدار هیدروکسی‌پرولین به‌صورت میکروگرم در میلی‌گرم بافت خشک گزارش شد.

۳- استخراج و اندازه‌گیری پروتیین بافت: نمونه‌ها در نیتروژن مایع آسیاب شدند و در بافر استخراج (۰/۱۶٪ کاکودیلک اسید، ۰/۸۷٪ کلرید سدیم، ۰/۱٪ سدیم ازیت و ۱٪ SDS، pH=۵) عصاره‌گیری شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴°C سانتریفوژ شدند و مایع رویی هر نمونه برای زایموگرافی مورد استفاده قرار گرفت. مایع رویی تا زمان انجام آزمایشات اندازه‌گیری پروتیین کل و زایموگرافی تا در دمای ۲۰°C نگهداری شد.

۴- اندازه‌گیری پروتیین کل (Total Protein Measurement):

مقدار پروتیین نمونه‌ها به روش لوری با اندازه‌گیری شدت جذب در طول موج ۶۰۰ nm به کمک اسپکتروفوتومتر (Epoch plate, BioTek, Winooski, VT) reading spectrophotometer انجام شد و برای رسم منحنی استاندارد از سرم آلبومین گاوی (Zist-Shimi Inc., Tehran, Iran) استفاده گردید.^{۱۷}

۵- تعیین میزان MMPها: تشخیص حضور و تعیین میزان MMPها، با روش Substrate-specific zymography انجام شد نمونه‌ها در ژل پلی‌آکریل آمید (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) حاوی ژلاتین و در حضور ۲- دسیل سولفات تحت شرایط غیر احیا به مدت سه ساعت در ۷۵ ولت الکتروفورز شدند. در مرحله بعد جهت حذف سدیم ۲- دسیل سولفات، ژل با Triton X-100 (Dow Chemical Company, Midland, MI, USA) با غلظت ۲/۵٪ شسته شد. سپس ژل به‌دست آمده به مدت یک شب در ۳۷°C درون محلول حاوی ۰/۱ مولار تریس هیدروکلراید و ۱۰۰ میلی‌مولار کلسیم کلراید نگهداری و در نهایت با کوماسی آبی (۰/۰۵٪) در زمینه اصلی مشخص شدند. پس از شست و شوی ژل با آب مقطر، محلول رنگبر اضافه شد و به مدت ۳-۴ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. در پایان این مرحله باندهای روشن در زمینه آبی ظاهر شد که حاصل

سپس توسط دستگاه میکروتوم (Microtome Rotary MR 2258: Histo Line Laboratories S.r.l., Milano, Italy) برش‌گیری شده و برش‌ها با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و Verhoeff-van Gieson (VVG) رنگ‌آمیزی شدند و زیر میکروسکوپ نوری (Olympus DP12 Digital Microscope Camera) (Olympus America Inc., Melville, NY, USA) از لحاظ تراکم سلولی و توزیع بافتی الاستین مورد مطالعه قرار گرفتند. در شریان لیما که به صورت پدیکل پیوند زده می‌شود فقط قسمت دیستال لیما برای آزمایشات در اختیار ما قرار گرفت.

۲- آزمایشات بیوشیمیایی: برای انجام آزمایشات بیوشیمیایی از نمونه‌های بافتی ذخیره شده در دمای ۷۰°C- استفاده شد. اندازه‌گیری الاستین با استفاده از تیمار بافت با محلول سیانوژن بروماید بر اساس روش Strauss و همکاران همراه با اصلاحاتی صورت گرفت.^{۱۴} این روش بر اساس اندازه‌گیری وزن پلت باقیمانده از تیمار بافت با محلول سیانوژن بروماید در اسید فرمیک ۷۰٪ انجام شد.

برای اندازه‌گیری کلاژن هم سوپ رویی و هم پلت حاصل از هضم با سیانوژن بروماید مورد آزمایش قرار گرفت. اندازه‌گیری کلاژن بر طبق روش ارایه شده توسط Reddy و همکاران همراه با اصلاحاتی صورت گرفت.^{۱۵} این روش که مبتنی بر اندازه‌گیری مقدار اسید آمینه هیدروکسی‌پرولین در بافت است از دو قسمت اصلی تشکیل شده است: (۱) هضم بافت، (۲) اندازه‌گیری مقدار هیدروکسی‌پرولین.

برای اندازه‌گیری مقدار هیدروکسی‌پرولین در بافت ابتدا باید پروتیین‌های بافت تجزیه شده و به اسیدهای آمینه تشکیل دهنده تبدیل شوند که این عمل طی فرآیند هضم صورت می‌پذیرد.

نظر به اینکه اسیدآمینه هیدروکسی‌پرولین، تنها در ساختار کلاژن یافت شده و در حدود ۱۲/۷۷٪ از وزن کلاژن را تشکیل می‌دهد، با اندازه‌گیری مقدار این اسید آمینه‌های می‌توان مقدار کلاژن بافت را محاسبه نمود.^{۱۶} اندازه‌گیری هیدروکسی‌پرولین با روش اسپکتروفوتومتری که در آن از اسید آمینه ال-هیدروکسی‌پرولین به عنوان استاندارد استفاده شد، صورت گرفت. همچنین از دو معرف کلرامین-T (Chloramine-T) و ارلیخ (Ehrlich) استفاده شد. این دو معرف در حضور هیدروکسی‌پرولین رنگی تولید می‌کنند که در ۵۵۰ nm دارای بیشترین جذب نوری (Optical density) می‌باشد.

الف- آئورت: نظر به این که کلیه برش‌های رنگ‌آمیزی شده از نظر ظاهری مشابه بودند یکی از برش‌های رنگ‌آمیزی شده نشان داده شد (شکل ۱).

آئورت لایه مدیای بسیار ضخیم و ایتیمای بسیار نازک داشت. ضخیم بودن لایه مدیا قدرت کششی و الاستیسیته لازم را به آن می‌دهد تا فشارخون خروجی از قلب را تحمل کند. قبل از آنستوموز گرفت به آئورت، جراح لایه ادونتیس (Advetetia) ادونتیس بخشی از آئورت را بر می‌دارد. بنابراین در شکل ۱، لایه ادونتیس مشاهده نمی‌شود.

ب- لیما (Left Internal Mammary Artery, LIMA): شکل ۲ نشان می‌دهد که لیما غشای الاستیک داخلی و خارجی مشخصی داشته که هر سه لایه ایتیمای، مدیا و ادونتیس را از هم تفکیک می‌کند. به جز لیمای یک بیمار (شکل ۲A) که پلاک آترواسکلروسیس داشت، لیمای بقیه بیماران دارای ایتیمای نازک بود (شکل ۲B).

ج- رادیال: در کلیه بیماران رادیال دارای غشای الاستیک داخلی و خارجی مشخصی بود (شکل ۳). بیماران شماره ۱۰ و ۱۱ دارای رادیال به‌ظاهر طبیعی بودند (شکل ۳B) که در آن لایه ایتیمای نازک و لایه مدیا ضخیم بود. در ۴۵٪ بیماران، رادیال دارای پلاک آترواسکلروسیس و در ۶۵٪ بیماران، رادیال دارای ایتیمای ضخیم (ایتیمال هاپرپلاژیا) بود و در دو بیمار علاوه بر وجود پلاک آترواسکلروسیس، لایه ایتیمای نیز ضخیم بود (شکل ۳A).

د- ورید صافن: نتایج نشان داد که ورید صافن ۹۰٪ بیماران دارای غشای الاستیک داخلی و خارجی مشخصی نیستند ولی لایه‌های ایتیمای، مدیا و ادونتیس قابل تفکیک است. ورید صافن این بیماران دارای مدیای طولی داخلی و مدور خارجی بود (شکل ۴A). در سه بیمار ضخامت لایه‌های ایتیمای، مدیای طولی داخلی و مدور خارجی به حدی بود که به نظر می‌رسید ورید صافن آن‌ها مبتلا به واریس است (شکل ۴B).

میزان ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPها): شکل ۵، ژلاتین زایموگرافی شریان‌های آئورت، لیما و رادیال و ورید صافن را نشان می‌دهد. باندهای سفید نمایانگر وجود آنزیم‌های ژلاتیناز و ضخامت شدت هر باند بیانگر میزان آنزیم مربوطه بود. نظر به تفاوت در خصوصیات فردی بیماران، میزان Pro-MMP-9، Active MMP-9، Pro-MMP-2 و Active MMP-2 در رگ‌های هر بیمار با یکدیگر

هضم ژلاتین در اثر فعالیت MMPها است. ارزیابی کمی از طریق محاسبه چگالی سطح به وسیله نرم‌افزار رایانه‌ای انجام شد و فعالیت آنزیمی به صورت نسبی بیان شد.

۶- آنالیزهای آماری: به منظور نرمال کردن متغیرها و حذف خطای اندازه‌گیری و همچنین با توجه به منابع موجود^{۱۹،۱۸} برای بیان مقدار الاستیسیته و خصوصیات مکانیکی عروق از نسبت الاستین به کلاژن کل (Elastin/Total collagen)، نسبت کلاژن نامحلول به کلاژن کل (Insoluble collagen/Total collagen) استفاده گردید. داده‌های مربوط به مقدار نسبت کلاژن نامحلول به کلاژن کل و الاستین به کلاژن کل با استفاده از روش‌های ناپارامتریک نرم‌افزار آماری SSPS ویراست ۱۸ آنالیز شدند. $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنادار اعلام شد.

باندهای مربوط به MMP-2 و MMP-9 با استفاده از نرم‌افزار رنگ سفید باندها با استفاده از دندسیتومتری و نرم‌افزار فوق، بر اساس ضخامت و شدت رنگ سفید باند در زمینه آبی ژل اندازه‌گیری شد و نمودار آن رسم گردید و ارتفاع نقطه بیشینه هر نمودار به عنوان اعداد مربوط به ضخامت باند در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار (MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) منحنی میزان MMPهای هر رگ در هر بیمار رسم گردید.

یافته‌ها

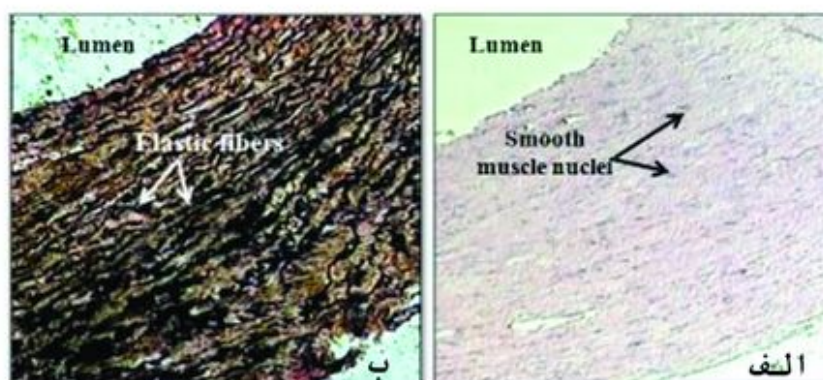
میزان MMP-2 و MMP-9 فعال و غیرفعال در شریان لیما و آئورت مشابه بوده ولی میزان این آنزیم‌ها در شریان رادیال و ورید صافن به‌طور معناداری بیشتر از آئورت بود. نسبت الاستین به کلاژن در شریان لیما ($1/92 \pm 1/15$) شبیه آئورت ($3/4 \pm 1/66$) بود ولی در ورید صافن ($1/07 \pm 0/47$) و شریان رادیال ($1/14 \pm 0/39$) به‌طور معناداری ($P = 0/02$) از آئورت کمتر بود. پلاک آترواسکلروسیس در رادیال اکثر بیماران وجود داشت ولی در لیما فقط در یک مورد مشاهده شد.

هیستولوژی: نتایج هیستولوژی رگ‌های مورد آزمایش بیماران به شرح زیر است. اشکال ۴-۱ تراکم سلولی را به‌صورت نقطه‌های پررنگ (رنگ‌آمیزی H&E) و رشته‌های الاستین را به‌صورت خطوط سیاه رنگ (رنگ‌آمیزی Verhoeff van Gieson (VVG) نشان دادند.

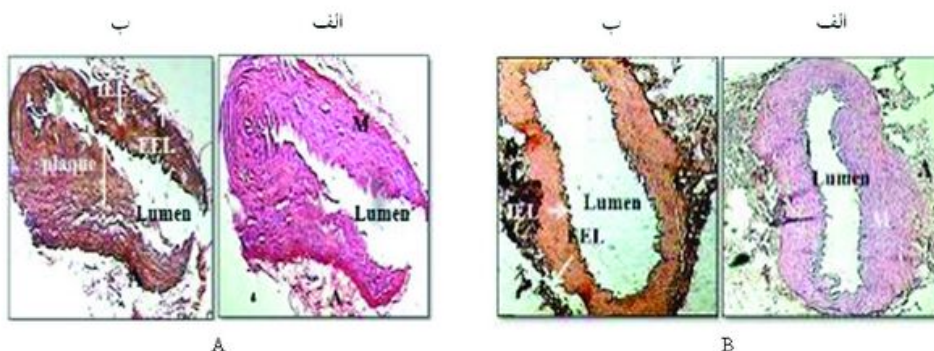
قرار می‌گرفت. بنابراین، برای بررسی تأثیر زمان بر میزان MMPها، رگ‌های رادیال و ورید صافن به دو قسمت تقسیم شدند و قطعه‌ای از آنها بلافاصله و قطعه دیگر پس از این که به مدت یک ساعت در نرمال سالین سرد حاوی هپارین قرار گرفت، منجمد شدند و هر دو رگ تا زمان انجام آزمایش در فریزر 80°C - نگه‌داری شدند. آنالیز نتایج زایموگرافی نشان داد که میزان MMPها در دو نمونه در دو زمان مختلف تفاوت معناداری نداشت. بنابراین می‌توان گفت که تأخیر زمانی یک ساعته بر روی میزان MMPها تأثیری نداشت که این می‌تواند به دلیل نگهداری بافت در هپارین باشد که به‌عنوان یک مهار کننده MMPها عمل کرده است.

مقایسه شدند (شکل ۵). میزان MMP-2 و MMP-9 فعال و غیرفعال در لیمای بیماران هشت و ۹ مشابه آنورت بود ولی رادیال و ورید صافن با آنورت تفاوت قابل ملاحظه‌ای داشت. میزان MMP-2 و MMP-9 فعال و غیرفعال در رگ‌های بیمار ۱۰ مشابه بود. در بیمار ۱۱ میزان Active MMP-2 در آنورت و Pro-MMP-9 در آنورت، لیما و رادیال بالا بود. میزان MMP-2 غیرفعال در تمام عروق و در هر چهار بیمار تقریباً یکسان بود.

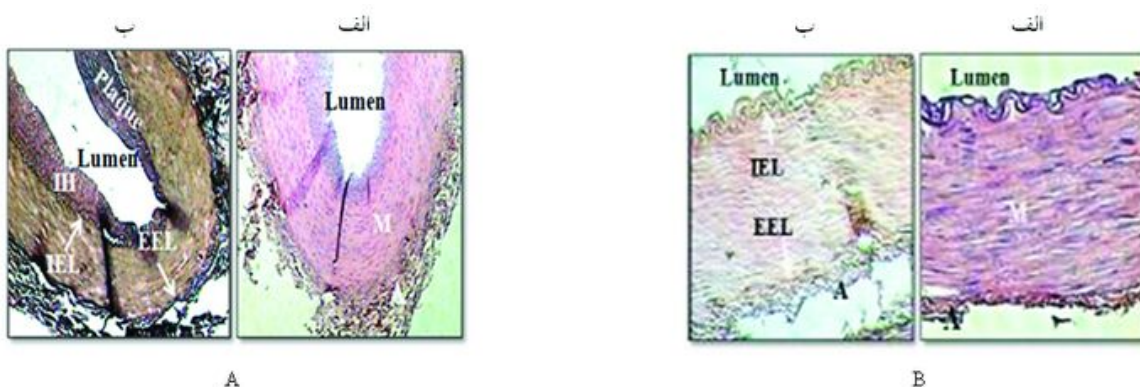
ج- تأثیر زمان بر میزان ماتریکس متالوپروتیناز: در جریان عمل قلب باز، لیما بلافاصله و در بعضی موارد عروق رادیال و ورید صافن در حدود یک ساعت پس از جدا کردن رگ از بدن بیمار در اختیار ما



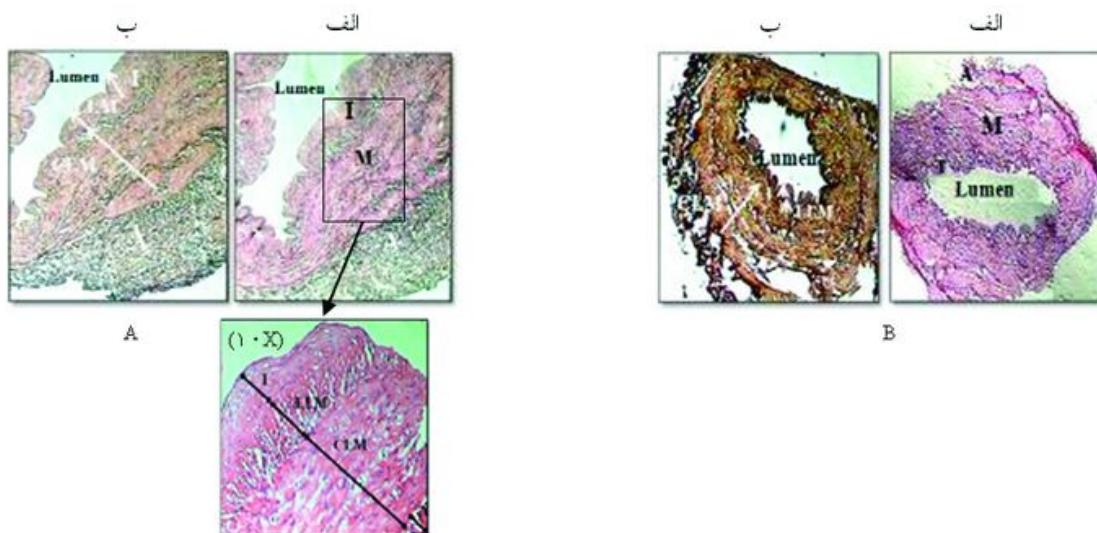
شکل ۱: هیستولوژی آنورت، الف- رنگ آمیزی H&E، ب- رنگ آمیزی Verhoeff van Gieson



شکل ۲: هیستولوژی شریان لیما (Left Internal Mammary Artery, LIMA) (۴X): شکل (A) لیمای حاوی پلاک اترواسکلروزیس، شکل (B) لیمای سالم، الف) رنگ آمیزی H&E و ب) رنگ آمیزی Verhoeff van Gieson.



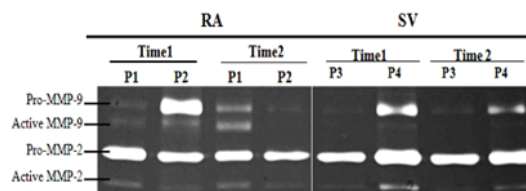
شکل ۳: هیستولوژی شریان رادیال (A: (۴X): رادیال بیمار دارای پلاک و لایه اینتیمای ضخیم، B) رادیال سالم، الف) رنگ آمیزی H&E و ب) رنگ آمیزی Verhoeff van Gieson



شکل ۴: (۴X). هیستولوژی ورید صافن: (A) صافن با لایه‌های قابل تفکیک، (B) صافن با لایه‌های ضخیم. الف) رنگ آمیزی H&E و ب) رنگ آمیزی Verhoeff van Gieson.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که میزان MMP-2 و MMP-9 فعال و غیرفعال در لیما (Left Internal Mammary Artery, LIMA) با آئورت مشابه بوده ولی در رادیال و ورید صافن به طور معناداری بیشتر از آئورت بود. نسبت الاستین به کلاژن در لیما (۱/۹۲±۱/۱۵)



شکل ۵: تاثیر زمان بر میزان ماتریکس متالوپروتینازها در شریان رادیال و ورید صافن

ولی تحقیقات اخیر رسپتورها را تعیین کننده دانسته‌اند و در صورت به‌کارگیری رادیال به عنوان گرافت، به‌طور معمول از بلوکرهای کانال کلسیم (Calcium-channel blockers) مانند دیلتیازم (Diltiazem) برای کنترل اسپاسم استفاده می‌شود.^{۳۲،۳۱}

در مطالعات کلینیکی و آماری انجام شده پس از عمل بای‌پس، برتری لیما بر گرافت‌های رادیال^{۳۳،۳۶} و ورید صافن^{۳۵} گزارش شده است و نشان داده شده است که درصد باز ماندن و بقای گرافت لیما حتی در مدت زمان طولانی پس از عمل بای‌پس به‌طور معناداری بیشتر است.^{۳۴-۳۶} برتری لیما نسبت به رگ‌های دیگر می‌تواند مربوط به صفات بیولوژیکی ذاتی این رگ باشد. مطالعات هیستولوژیک وجود غشای الاستیک داخلی سازمان یافته و تراکم بالای رشته‌های الاستیک به همراه تعداد کم سلول‌های ماهیچه‌ای صاف (Smooth muscle cells, SMCs) در لایه مدیا را در شریان لیما گزارش می‌دهند.^{۳۸،۳۹} غشای الاستیک داخلی سازمان یافته از مهاجرت SMCs به اینتیمای جلوگیری کرده و دیواره عروق را از ایجاد تغییراتی که منجر به تشکیل پلاک آترواسکلروزیس می‌شود، محافظت می‌کند.^{۳۳} بنابراین لیما به عنوان یک گرافت استاندارد در عمل بای‌پس به‌ویژه برای پیوند به رگ پایین رونده سمت چپ قلب (Left Anterior Descending Coronary artery, LAD) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

برای اولین بار در این پژوهش نشان داده شد که نسبت الاستین به کلاژن کل در لیما بالا بوده و در نتیجه می‌توان آن را از نظر مولکولی و خواص الاستیسیته مشابه‌ترین رگ به آنورت محسوب کرد. برای برآورد قدرت کششی و صفات الاستیسیته عروق، از نسبت الاستین به کلاژن کل استفاده می‌شود^{۳۷-۳۹} و بالا بودن این نسبت دال بر الاستیسیته بالای رگ می‌باشد. الاستیسیته مقاومت لازم در برابر فشار بالای خون شریانی را به عروق می‌دهد. در عمل بای‌پس، به دلیل اینکه خون شریانی وارد گرافت‌ها می‌شود، هرچه نسبت الاستین به کلاژن کل بیشتر باشد، رگ در برابر فشار شریانی مقاوم‌تر بوده و کمتر دستخوش تغییرات مولکولی و ساختاری می‌شود و به دنبال آن احتمال گرفتگی آن کمتر است.

بر خلاف لیما، نسبت الاستین به کلاژن کل در رادیال و ورید صافن پایین بود که نشان‌دهنده کم بودن مقاومت مکانیکی این رگ‌ها و افزایش احتمال ریمدلینگ دیواره گرافت و انسداد آن است. لیمای یک بیمار کمترین میزان نسبت الاستین/کلاژن کل را داشت که با

شبه آنورت ($3/4 \pm 1/66$) بود ولی در ورید صافن ($1/07 \pm 0/47$) و شریان رادیال ($1/14 \pm 0/39$) به‌طور معناداری ($P \leq 0/05$) از آنورت کمتر بود. پلاک آترواسکلروزیس در رادیال اکثر بیماران وجود داشت ولی در لیما فقط در یک مورد مشاهده شد. از نظر آناتومیکی، لیما به‌طور مستقیم از آنورت منشعب شده و از این روی به آن شباهتی نزدیک دارد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که لیما از نظر بافت‌شناسی و ساختار ماکرومولکولی و آنزیمی نیز به آنورت شبیه بوده و با رادیال و ورید صافن تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد. در پژوهش حاضر پلاک آترواسکلروزیس تنها در لیمای یک بیمار مشاهده شد. این نتیجه در تایید مطالعات قبلی^{۲۴،۲۵} است و نشان‌دهنده نادر بودن پلاک آترواسکلروزیس در لیماست اگرچه، لیما نیز نسبت به بروز آترواسکلروزیس مصون نیست. نتایج زایموگرافی نشان داد که به جز لیمای یک بیمار که در آن میزان Pro-MMP-9 بالا بود، بقیه دارای الگوی MMPها شبیه آنورت بودند. این بیمار مسن و دارای فشارخون بالا بوده است و ۲۴ ساعت پیش از عمل دچار سکته قلبی شده و به‌طور اورژانسی برای عمل بای‌پس پذیرش شده بود. در این بیمار علاوه بر لیما، میزان Pro-MMP-9 در آنورت و رادیال نیز بالا بود.

برخلاف لیما، در رادیال اکثر بیماران پلاک آترواسکلروزیس و اینتیمال هایپرپلازیا و در ورید صافن افزایش ضخامت لایه‌ها و در برخی موارد واریس مشاهده شد که می‌تواند به عنوان عوامل محدودکننده در استفاده از این رگ‌ها در عمل بای‌پس باشد. مشابه مطالعات قبلی،^{۲۶} نتایج این مطالعه نیز نشان می‌دهد که بین فعالیت MMPها و ریسک فاکتورهای موثر در بیماری‌های قلبی-عروقی رابطه‌ای وجود ندارد، ولی میزان Pro-MMP-9 در رادیال‌هایی که پلاک آترواسکلروزیس و اینتیمال هایپرپلازیا داشتند، بالا بود. برخلاف گزارشات پیشین،^{۲۷} در این مطالعه الگوی MMPها در ورید صافنی که از نظر بافت‌شناسی سالم، در شرف بروز واریس و یا واریسی بودند، مشابه بود. یکی دیگر از عوامل محدودکننده استفاده از رادیال به عنوان گرافت، اسپاسم این رگ است که می‌تواند همزمان با جدا کردن آن از ساق دست شروع شود. لازم به ذکر است که این ویژگی منحصر به رادیال نیست و به استثنای لیما، اسپاسم در سایر شریان‌ها نیز مشاهده شده است.^{۲۸-۳۰} برخی از پژوهشگران ضخیم‌تر بودن لایه مدیا در رادیال را ($RA/IMA=1/7$) عامل بروز اسپاسم معرفی کرده‌اند

به صورت همروند با مطالعات سایر پژوهشگران^{۴۶، ۴۷} نشان داد که نسبت الاستین به کلاژن کل و کلاژن نامحلول به کلاژن کل در ورید صافن از شریان آئورت کمتر بود.

نوع رگ انتخاب شده برای استفاده در عمل بای پس در شکست یا موفقیت گرفت تعیین کننده است. در این تحقیق برای اولین بار با مقایسه تفاوت های هیستولوژیکی، مولکولی و آنزیمی رگ های کاندید برتری لیما را نسبت به بقیه رگ ها گزارش کردیم. برتری لیما نسبت به بقیه رگ ها به دلیل بالا بودن میزان الاستیسیت، تشابه الگوی MMPها به آئورت و نادر بودن پلاک آترواسکلروزیس در این رگ است. اگرچه لیما مناسب ترین رگ کاندید است ولی رادیال نیز از نظر آناتومیکی و هیستولوژیکی در درجه دوم اهمیت قرار داشته و در مقایسه با سایر عروق نظیر ورید صافن، کاندید مناسب تری است. در هر صورت به دلیل تفاوت های فردی بین بیماران بررسی دقیق رگ کاندید پیش از عمل می تواند تعیین کننده باشد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان "مقایسه بین پروتئین های ماتریکس خارج سلولی سیاهرگ پشت پا و سرخرگ ها" به شماره تصویب (۳۷۷) از دانشگاه صنعتی اصفهان و طرح تحقیقاتی تحت عنوان "مقایسه ساختار بافت شناسی و میزان MMPs و TIMPs در سرخرگ ها و سیاهرگ ها قبل از استفاده در عمل بای پس کرونر" به شماره تصویب (۲۸۶۱۶۷) از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می باشد. بدین وسیله از دانشگاه صنعتی اصفهان و معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت تأمین هزینه این پژوهش سپاسگزاری می شود.

توجه به مشخصات او ممکن است به دلیل بالا بودن چربی خون او باشد. بالا بودن چربی خون یک فاکتور مهم در کاهش میزان الاستین است.^{۴۰، ۴۱} کلاسترول با اتصال به رشته های الاستین باعث افزایش حساسیت آن ها به آنزیم های پروتئولیتیک مانند الاستازها و MMPها شده و به این ترتیب با تخریب رشته های الاستین، تراکم و ساختار آن ها در بافت تغییر می کند. علاوه بر این، وجود مقدار زیادی کلاسترول در خون افراد مبتلا به هیپرلیپیدمی می تواند باعث کاهش سنتز الاستین شود.^{۴۰، ۴۱}

در مقایسه با لیما، نسبت الاستین به کلاژن کل در رادیال و ورید صافن پایین بود که ممکن است در رادیال تحت تأثیر سن و وجود پلاک آترواسکلروزیس و در ورید صافن مربوط به شدت واریس باشد. افزایش فعالیت آنزیم های الاستاز در بدن وابسته به سن بوده^{۴۱} و در بیماری های عروقی از جمله در رگ هایی که اینتیمای آن ها به دلیل وجود پلاک آترواسکلروزیس، ضخیم شدن اینتیمای^{۴۲} و یا بروز واریس^{۴۳-۴۴} آسیب دیده است، افزایش می یابد. بنابراین به دلیل تجزیه آنزیمی الاستین و کاهش مقدار این پروتئین، نسبت الاستین به کلاژن کاهش می یابد. در شرایط طبیعی الاستین موجود در لایه مدیا^{۴۳} از طریق نگه داشتن SMCs در حالت کشیده (Contractile state) باعث پایداری ساختار دیواره عروق می شود.^{۴۵} رادیال دو بیمار که در محدوده سنی ۳۸-۴۲ سال بودند دارای بالاترین نسبت الاستین به کلاژن کل بود. وریدهای صافن در ۴۵٪ بیماران مورد مطالعه واریسی بود. نسبت الاستین به کلاژن کل در وریدهای واریسی کمتر از بقیه بود. کاهش این نسبت در رگ های واریسی به دلیل افزایش فعالیت الاستازها و کاهش مهارکننده های این آنزیم است.^{۴۶} نتایج این مطالعه

References

- Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet* 2014;383(9921):999-1008.
- Ascarelli A, Francone M, Cannata D, Cannavale A, Carbone L, Passariello R. Role of multidetector CT in the evaluation of coronary artery bypass grafts. *Imaging Med* 2010;2(1):77-86.
- Eagle A, Guton R. ACC/AHA guidelines for coronary artery bypass graft surgery. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1263-341.
- Serruys PW, Morice MC, Kappetein AP, Colombo A, Holmes DR, Mack MJ, et al. Percutaneous coronary intervention versus coronary-artery bypass grafting for severe coronary artery disease. *N Engl J Med* 2009;360(10):961-72.
- Serruys PW, Unger F, Sousa JE, Jatene A, Bonnier HJ, Schönberger JP, et al. Comparison of coronary-artery bypass surgery and stenting for the treatment of multivessel disease. *N Engl J Med* 2001;344(15):1117-24.
- Goldman S, Sethi GK, Holman W, Thai H, McFalls E, Ward HB, et al. Radial artery grafts vs saphenous vein grafts in coronary artery bypass surgery: a randomized trial. *JAMA* 2011;305(2):167-74.
- Vinberg AM. Development of an anastomosis between the coronary vessels and a transplanted internal mammary artery. *Can Med Assoc J* 1946;55:117-21.
- Durairaj M, Buxton B. History of internal thoracic artery grafting and alternative arterial grafts. In: He GW, editor. *Arterial Grafting*

- for Coronary Artery Bypass Surgery. 2nd ed. Berlin: Springer Verlag; 2006. p. 89-94.
9. Carpentier A, Guernonprez JL, Deloche A, Frechette C, DuBost C. The aorta-to-coronary radial artery bypass graft. A technique avoiding pathological changes in grafts. *Ann Thorac Surg* 1973;16(2):111-21.
 10. Al-Sabti HA, Al Kindi A, Al-Rasadi K, Banerjee Y, Al-Hashmi K, Al-Hinai A. Saphenous vein graft vs. radial artery graft searching for the best second coronary artery bypass graft. *J Saudi Heart Assoc* 2013;25(4):247-54.
 11. Bergqvist D. Historical aspects on aneurysmal disease. *Scand J Surg* 2008;97(2):90-9.
 12. Schoenhagen P, Ziada KM, Vince DG, Nissen SE, Tuzcu EM. Arterial remodeling and coronary artery disease: the concept of "dilated" versus "obstructive" coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(2):297-306.
 13. Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1977;46:897-930.
 14. Strauss BH, Chisholm RJ, Keeley FW, Gotlieb AI, Logan RA, Armstrong PW. Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. *Circ Res* 1994;75(4):650-8.
 15. Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem* 1996;29(3):225-9.
 16. Keeley FW, Morin JD, Vesely S. Characterization of collagen from normal human sclera. *Exp Eye Res* 1984;39(5):533-42.
 17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
 18. Ben Driss A, Himbert C, Poitevin P, Duriez M, Michel JB, Levy BI. Enalapril improves arterial elastic properties in rats with myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34(1):102-7.
 19. Pamplona R, Ilieva E, Ayala V, Bellmunt MJ, Cacabelos D, Dalfó E, et al. Maillard reaction versus other nonenzymatic modifications in neurodegenerative processes. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1126:315-9.
 20. van Son JA, Smedts F, de Wilde PC, Pijls NH, Wong-Alcala L, Kubat K, et al. Histological study of the internal mammary artery with emphasis on its suitability as a coronary artery bypass graft. *Ann Thorac Surg* 1993;55(1):106-13.
 21. Sons HJ, Godehardt E, Kunert J, Lösse B, Bircks W. Internal thoracic artery: prevalence of atherosclerotic changes. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106(6):1192-5.
 22. Sisto T, Isola J. Incidence of atherosclerosis in the internal mammary artery. *Ann Thorac Surg* 1989;47(6):884-6.
 23. Sims FH. A comparison of coronary and internal mammary arteries and implications of the results in the etiology of arteriosclerosis. *Am Heart J* 1983;105(4):560-6.
 24. Kay HR, Korns ME, Flemma RJ, Tector AJ, Lopley D Jr. Atherosclerosis of the internal mammary artery. *Ann Thorac Surg* 1976;21(6):504-7.
 25. Canham PB, Finlay HM, Boughner DR. Contrasting structure of the saphenous vein and internal mammary artery used as coronary bypass vessels. *Cardiovasc Res* 1997;34(3):557-67.
 26. McNulty M, Spiers P, McGovern E, Feely J. Aging is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity in the human aorta. *Am J Hypertens* 2005;18(4 Pt 1):504-9.
 27. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* 2003;57(5-6):195-202.
 28. van Son JA, Smedts F, Vincent JG, van Lier HJ, Kubat K. Comparative anatomic studies of various arterial conduits for myocardial revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;99(4):703-7.
 29. Sarabu MR, McClung JA, Fass A, Reed GE. Early postoperative spasm in left internal mammary artery bypass grafts. *Ann Thorac Surg* 1987;44(2):199-200.
 30. He GW, Yang CQ. Comparison among arterial grafts and coronary artery. An attempt at functional classification. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109(4):707-15.
 31. Acar C, Jebara VA, Portoghesi M, Beyssens B, Pagny JY, Grare P, et al. Revival of the radial artery for coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1992;54(4):652-9; discussion 659-60.
 32. Hannes W, Seitelberger R, Christoph M, Keilich M, Kulinna C, Holubarsch C, et al. Effect of peri-operative diltiazem on myocardial ischaemia and function in patients receiving mammary artery grafts. *Eur Heart J* 1995;16(1):87-93.
 33. Desai ND, Fremes SE. Radial artery conduit for coronary revascularization: as good as an internal thoracic artery? *Curr Opin Cardiol* 2007;22(6):534-40.
 34. Sethi GK, Copeland JG, Moritz T, Henderson W, Zadina K, Goldman S. Comparison of postoperative complications between saphenous vein and IMA grafts to left anterior descending coronary artery. *Ann Thorac Surg* 1991;51(5):733-8.
 35. Loop FD, Lytle BW, Cosgrove DM, Stewart RW, Goormastic M, Williams GW, et al. Influence of the internal-mammary-artery graft on 10-year survival and other cardiac events. *N Engl J Med* 1986;314(1):1-6.
 36. Berger PB, Alderman EL, Nadel A, Schaff HV. Frequency of early occlusion and stenosis in a left internal mammary artery to left anterior descending artery bypass graft after surgery through a median sternotomy on conventional bypass: benchmark for minimally invasive direct coronary artery bypass. *Circulation* 1999;100(23):2353-8.
 37. Barner HB, Swartz MT, Mudd JG, Tyras DH. Late patency of the internal mammary artery as a coronary bypass conduit. *Ann Thorac Surg* 1982;34(4):408-12.
 38. Teoh LS, Hingston G, Al-Ali S, Dawson B, Windsor JA. The iliopubic tract: an important anatomical landmark in surgery. *J Anat* 1999;194 (Pt 1):137-41.
 39. Gosline JM, Shadwick RE. The mechanical properties of fin whale arteries are explained by novel connective tissue designs. *J Exp Biol* 1996;199(Pt 4):985-97.
 40. Robert L, Robert AM. Elastin, elastase and arteriosclerosis. In: Robert AM, Robert L, editors. *Frontiers of Matrix Biology*. Vol 8. Basel: Karger; 1980. p. 130-73.
 41. Pasquali-Ronchetti I, Baccarani-Contri M. Elastic fiber during development and aging. *Microsc Res Tech* 1997;38(4):428-35.
 42. Robert L. Aging of the vascular wall and atherogenesis: role of the elastin-laminin receptor. *Atherosclerosis* 1996;123(1-2):169-79. Erratum in: *Atherosclerosis* 1996;126(1):173.
 43. Svejcar J, Prerovsky I, Linhart J, Kruml J. Content of collagen, elastin, and water in walls of the internal saphenous vein in man. *Circ Res* 1962;11:296-300.
 44. Elsharawy MA, Naim MM, Abdelmaguid EM, Al-Mulhim AA. Role of saphenous vein wall in the pathogenesis of primary varicose veins. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2007;6(2):219-24.
 45. Karnik SK, Brooke BS, Bayes-Genis A, Sorensen L, Wythe JD, Schwartz RS, et al. A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development* 2003;130(2):411-23.
 46. Venturi M, Bonavina L, Annoni F, Colombo L, Butera C, Peracchia A, et al. Biochemical assay of collagen and elastin in the normal and varicose vein wall. *J Surg Res* 1996;60(1):245-8.
 47. Travers JP, Brookes CE, Evans J, Baker DM, Kent C, Makin GS, et al. Assessment of wall structure and composition of varicose veins with reference to collagen, elastin and smooth muscle content. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;11(2):230-7.

Histological and biochemical characteristics of arteries and veins in patients candidate for coronary bypass surgery

Abstract

Received: 10 Jun. 2014 Accepted: 30 Aug. 2014 Available online: 11 Sep. 2014

Nasim Dana Ph.D.¹
Shiva Safavi M.Sc.²
Nafiseh Nili Ph.D.^{1,2}
Badroddin Ebrahim Seyed Tabatabaei Ph.D.²
Shaghayegh Haghjooy Javanmard M.D., Ph.D.^{1*}

1- Applied Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

2- Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

Background: The occlusion of the artery and vein grafts are currently a major problem in coronary bypass surgery. Degradation of collagen and elastin, the most abundant extracellular matrix proteins in the vessel wall by matrix metalloproteinase (MMPs), leads to a rearrangement of the extracellular matrix and vascular wall structure. The present study aimed to compare the histological and biochemical characteristics of arteries and veins which could have a role in the failure of the graft.

Methods: This study was a cross-sectional study of 80 patients conducted at Heart Hospitals in Isfahan, Iran, between July 2012 and November 2013. Samples were collected from the remains of vessels used in bypass surgery of 11 male nondiabetic patients. The histologic, collagen elastin ratio and MMPs levels of the vessels were investigated. MMPs were determined using the Gelatin Zymography method. For elastin and collagen content measurement, the sample was digested by cyanogen bromide and hydrochloric acid and then hydroxyproline was measured with a spectrophotometer.

Results: The amount of active and inactive MMP-2 and MMP-9 of the left internal mammary artery (Lima) was similar to aorta, but the amount of MMP-2 and MMP-9 in the radial artery and saphenous vein were significantly higher than aorta. Elastin to collagen ratio in Lima (1.92 ± 1.15) was similar to the aorta (3.4 ± 1.66), but this proportion in saphenous vein (1.07 ± 0.47) and radial artery (1.14 ± 0.39) was significantly lower in the aorta ($P \leq 0.05$). Most patients had atherosclerotic plaque in radial while there was atherosclerotic plaque in Lima of only one case.

Conclusion: The presence of atherosclerotic plaques in radial and thickening of the intimal layer of the saphenous vein in the majority of patients and decrease of collagen to elastin ratio and the high level of matrix metalloproteinase enzymes in the radial and saphenous vein can induce early pathological conditions, and remodeling of the vessels involved. So the results of this study confirm that Left Internal Mammary Artery (LIMA) is the most suitable candidate for bypass surgery.

Keywords: coronary artery bypass, left internal mammary artery, matrix metalloproteinases, radial artery, saphenous vein.

* Corresponding author: Applied Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Hezar jarib Avenue, Isfahan, Iran.
Tel: +98- 31- 37922295
E-mail: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir