



Frequency-dependent anti arrhythmic effects of *Crataegus monogyna* on the extracellular field potential recordings in the rabbit atrioventricular node, an experimental model of AF

Vahid Khori¹, Mohammad Azadbakht², Mohsen Nayeypour^{3*}, Amir Hossein Jamshidi⁴, Mona Pourabouk¹, Ali Mohammad Alizadeh⁵, Fakhri Badaghabadi¹, Shima Changizi¹, Maryam Rajaei¹

1. Golestan Cardiovascular Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
2. Faculty of Pharmacy, Sari University of Medical Sciences, Sari, Iran
3. Dept. Pharmacology, Faculty of pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Dept. Pharmacognosy, Iranian Institute of Medicinal Plant, Ministry of Health, Tehran, Iran
5. Cancer Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 2 Jun 2010

Accepted: 22 Dec 2010

Abstract

Introduction: Despite extensive studies that have been performed on the effects of *Crataegus monogyna* in cardiovascular diseases, only few investigations have addressed the antiarrhythmic properties of this plant. Aims of the present study were: 1) To determine the protective role of methanolic extract of *C. monogyna* on the rate-dependent model and the concealed conduction of the AV node. 2) To explore the role of Na⁺-K⁺ ATP_{ase} in the protective role of *C. monogyna*

Methods: Male New Zealand rabbits (1.5-2kg) were used in all experiments. Stimulation protocols were used to measure basic and rate-dependent AV nodal properties (recovery, atrial fibrillation and zone of concealment) in two groups (N=14). In the first group, all the stimulation protocols were performed before and after the administration of different concentrations of *C. monogyna* extract (n=7), while in the second group (n=7), all stimulation protocols were carried out in the presence of ouabaine (0.05 μM) and the plant extract.

Results: Basic and rate-dependent properties of the AV node were inhibited after the addition of the extract of *C. monogyna* to Kerebs Henselite solution. At the maximum concentration of *C. monogyna* (30 mg/l), WBCL cycle length was significantly increased from 156.5±3.4 to 173±5.8 ms and the nodal functional refractory period was prolonged from 164.4±4.1 to 182.7±3.8 ms ($P<0.05$). Significant decreases of ventricular rhythm were recorded in both selective concentrations of the plant extract. The depressant electrophysiological effect of *C. monogyna* on the AV node was not abolished by ouabaine, a selective inhibitor of Na⁺-K⁺ ATP_{ase} enzyme.

Conclusion: The results showed a potential anti-arrhythmic and protective effect for *C. monogyna*. The effect of the plant extract in increasing nodal refractory period and widening of the concealment zone might be the major mechanisms involved. The protective role of *C. monogyna* was not related to the Na⁺-K⁺ ATP_{ase} activity.

Key words: Hydroalcoholic extract of *C. monogyna*, rate-dependent properties, zone of concealment

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

اثرات وابسته به سرعت ضد آریتمی گیاه ولیک سرخ بر روی ثبت خارج سلولی میدانی در مدل فیبریلاسیون دهلیزی آزمایشگاهی گره دهلیزی بطنی جدا شده خرگوش

وحید خوری^۱، محمد آزادبخت^۲، محسن نایب پور^{۳*}، امیر حسین جمشیدی^۴، منا پوراوبوک^۱، علی محمد علیزاده^۵، فخری بداغ آبادی^۱، شیما چنگیزی^۱، مریم رجایی^۱

۱. مرکز تحقیقات قلب و عروق گلستان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان
۲. گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری
۳. گروه فارماکولوژی دانشکده داروسازی تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
۴. گروه فارماکولوژی، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، پژوهشکده گیاهان دارویی، تهران
۵. مرکز تحقیقات کانسر، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

پذیرش: ۱ دی ۸۹

دریافت: ۱۲ خرداد ۸۹

چکیده

مقدمه: با وجود مطالعات گسترده اثرات ولیک سرخ بر روی بیماریهای قلب و عروق تا کنون کمتر مطالعه ای در مورد اثرات ضدآریتمی این گیاه انجام شده است. هدف از مطالعه حاضر (۱) تعیین اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی ولیک سرخ در مدل وابسته به سرعت و هدایت پنهان (۲) تعیین نقش سیستم سدیم - پتاسیم وابسته به انرژی در اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی ولیک سرخ می باشد.

روش ها: در کلیه آزمایشات از خرگوشه ای نر نژاد نیوزلندی (۲-۱/۵ کیلوگرم) استفاده شد. پروتکل های تحریکی جهت اندازه گیری خواص پایه و وابسته به سرعت (ریکاوری، فیبریلاسیون دهلیزی و ناحیه پنهان) در دو گروه (n=۱۴) استفاده شدند. در گروه اول کلیه پروتکل های تحریکی قبل و بعد از غلظتهای مختلف عصاره ولیک سرخ تکرار شدند (n=۷) در گروه دوم (n=۷) تمام پروتکل های تحریکی در حضور اتوبائین ۰/۰۵ میکرومولار و عصاره گیاه تکرار گردید. تمام نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شده است.

یافته ها: کلیه خواص پایه و وابسته به سرعت بعد از اضافه شدن عصاره گیاه ولیک سرخ به محلول کربس هنسلیت مهار شدند. در حداکثر غلظت ولیک سرخ (۳۰ میلیگرم) طول دوره ونکیاخ به صورت معنی داری افزایش یافت بطوریکه نمایه ونکیاخ از $۱۵۶/۵ \pm ۳۲/۴$ به $۱۷۳ \pm ۵/۸$ میلی ثانیه و زمان تحریک ناپذیری کارکردی از $۱۶۴/۴ \pm ۴/۱$ به $۱۸۲/۷ \pm ۳/۸$ میلی ثانیه افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$). کاهش معنی دار در ریتم بطنها در غلظت های انتخابی گیاه ثبت شد. اثرات الکتروفیزیولوژیک مهارتی ولیک سرخ توسط اتوبائین بر روی گره دهلیزی بطنی (مهارکننده انتخابی آنزیم سدیم پتاسیم وابسته به انرژی) حذف نشد.

نتیجه گیری: تمام نتایج نشان دهنده اثرات بالقوه ضدآریتمی و محافظتی ولیک سرخ می باشند. اثرات گیاه در افزایش زمان تحریک ناپذیری و عریض کردن ناحیه پنهان ممکن است مکانیزم عمده این گیاه باشد. نقش محافظتی ولیک سرخ ارتباطی به فعالیت سدیم پتاسیم وابسته به انرژی ندارد.

واژه های کلیدی: عصاره هیدروالکلی ولیک سرخ، گره دهلیزی- بطنی، فیبریلاسیون دهلیزی، ناحیه پنهان

مقدمه

مبتلا به آریتمی بوده و سالانه بیش از ۱۶۰۰۰۰ مورد جدید به آن اضافه می شود. فیبریلاسیون دهلیزی خطر سکته و نارسایی قلبی احتقانی، مرگ ناشی از گرفتگی عروق قلبی را افزایش می دهد [۶]. خطر فیبریلاسیون دهلیزی در ۴۰ سالگی، ۲۶٪ مردان و ۲۳٪ زنان را شامل می شود [۷]. گیاهان دارویی مانند

فیبریلاسیون دهلیزی (AF) یکی از انواع رایج آریتمی است. تنها در ایالت متحده ی آمریکا حدود ۳/۲ میلیون نفر * نویسنده مسئول مکاتبات: vaph99@yahoo.com وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

سرخ اثرات اینوتروپ قلبی واضح دارد. عصاره این گیاه قادر به رقابت با رسپتورائوبائین بروی پمپ سدیم - پتاسیم وابسته به انرژی است. بنابراین اثر این گیاه در افزایش نیروی انقباضی مشابه آئوبائین و بدون ارتباط با C_{AMP} می باشد [۱۴،۲۰]. با وجود مطالعات مختلف در ارتباط با اثرات متفاوت اینوتروپ مثبت و ضد آریتمی تا کنون در کمتر تحقیقی ارتباط بین مصرف این گیاه و ایجاد اثرات ضد آریتمی و تغییر خواص الکتروفیزیولوژیک گره دهلیزی - بطنی مورد بررسی قرار گرفته است. بنابراین هدف تحقیق حاضر: (۱) تعیین اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی ولیک سرخ در مدل وابسته به سرعت و هدایت پنهان در گره دهلیزی - بطنی، (۲) تعیین نقش سیستم پمپ سدیم - پتاسیم وابسته به انرژی در اثرات محافظتی عصاره هیدروالکلی ولیک سرخ در مدل فوق می باشد.

مواد و روش ها

بذرهای گیاه ولیک سرخ در مزرعه تحقیقاتی، موسسه گیاهان دارویی ایران در کرج پرورش یافته اند. قسمت های هوایی گیاه در ماه اردیبهشت ۸۴ جمع آوری شده است. ماهیت تاکسونومیکی گیاه، توسط متخصص گیاه شناس مزرعه شناسایی و کد هرباریومی (ACECRI1490) به آن تعلق گرفت. سرشاخه های گلدار گیاه جهت تحقیقات استفاده شده است. گیاه به مدت ۱۰ روز در سایه و دمای 27 ± 2 درجه سانتیگراد اتاق خشک شده است. عصاره متانولیکی ۸۰ درصد (۷:۱) پودر خشک شده گیاه آماده شده است. محلول آماده شده فیلتر شده و با استفاده از یک پمپ خلاء در دمای ۳۰ الی ۴۰ درجه سانتیگراد غلیظ شده است. تجزیه و تحلیل HPLC عصاره ولیک، حضور Vitexin-2 o-rhamnoside با غلظت ۲/۱۵ درصد را نشان می دهد. این ماده به عنوان استاندارد برای تعیین غلظت Vitexin-2o-rhamnoside در عصاره ولیک استفاده شده است. شرایط لازم برای تعیین مقدار عصاره توسط دستگاه HPLC، استفاده از ستون (NOVA-PaK (Dual C1860A0 و در طول موج ۳۴۰ نانومتر و دتکتور absorbance شرکت واتر (Water,s.co) می باشد [۱۰].

آزمایشات فارماکولوژیک: در آزمایشهای انجام شده از

دیگوکسین، آجمالین می توانند خواص حفاظتی گره دهلیزی - بطنی را در زمان وقوع آریتمی های فوق بطنی و فیبریلاسیون دهلیزی تقویت کنند [۸]. گره دهلیزی بطنی قادر است با توجه به سرعت ضربانات ورودی، تأثیر عوامل خارجی و خواص ذاتی خود، در هر لحظه شدت تأخیر در هدایت امواج را تنظیم کند. خواص ذاتی گره مطابق با مدل کارکردی تحت تأثیر سه پارامتر ریکاوری، تسهیل و خستگی قرار می گیرد [۱۸]. مدل فانکشنال میتواند رفتار گره دهلیزی-بطنی را در هنگام وقوع آریتمی توضیح دهد اما چگونگی مکانیسم عملکرد مدل فانکشنال همچنان ناشناخته باقی مانده است [۱۸]. تاکنون تأثیر عوامل آگروژن (آجمالین) و اندوژن (سیستم سمپاتیک، پاراسمپاتیک)، بر روی خواص ذاتی مطالعه شده است [۱۸،۱۹]. داروهای گیاهی می توانند با تنظیم خواص الکتروفیزیولوژیک ذاتی گره اثرات ضد آریتمی مشخص داشته باشند. جواب بطنی نامنظم در طی فیبریلاسیون دهلیزی در سرعتی کمتر از ضربانات الکتریکی تولید شده توسط دهلیزها ایجاد می شود. این جواب آهسته می تواند توسط پدیده هدایت پنهان و تحریک ناپذیری در گره دهلیزی بطنی توضیح داده شود [۱۷]. هدایت پنهان به عنوان مهمترین شاخص رفتار بطن ها در طی فیبریلاسیون دهلیزی می باشد [۹،۱۵]. شواهد مختلفی بیانگر نقش هدایت پنهان و ناحیه پنهان در پیش بینی سرعت ضربانات بطنی در طول فیبریلاسیون دهلیزی می باشد. مکانیسم سلولی هدایت پنهان هنوز شناخته شده نیست [۹]. با وجود اهمیت این شاخص، تاکنون داروی گیاهی موثر بر روی هدایت پنهان در زمان فیبریلاسیون دهلیزی مشخص نشده است. گیاه ولیک سرخ با اسامی مختلفی از قبیل Hawthorn و با اسم لاتین *Crataegus monogyna* از خانواده Rosaceae به صورت سنتی به عنوان تونیک قلبی استفاده می شود [۷]. ترکیبات مختلفی در ولیک سرخ وجود دارد که شامل: ساپونین های تری ترپن، فلاونوئیدها، کاتیشن اپی کاتشین و ... می باشد. این گیاه در بیماریهای مختلفی از قبیل آنژین، فشار خون، آریتمی و نارسائی احتقانی قلبی مورد استفاده قرار می گیرد [۳]. اثرات آنتی آریتمیک این گیاه سبب ایجاد ریتم منظم در سلولهای جدا شده قلبی میشود. اثرات منفی بروی ضربانات قلب ولیک سرخ ارتباطی به رسپتورهای β -آدرنژیک ندارد [۳،۱۴]. عصاره حاصل از برگ و گلهای ولیک

5KHz، الکتروود از جنس نقره با پوشش تفلون با ضخامت ۰/۲۵ میلی متر، ترموستات برای تنظیم درجه حرارت مدار داخلی با دقت ۰/۵ ± درجه سانتیگراد (Rayan teb)، ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ ± میلی گرم (Shimadzo)، ترازو با دقت ۰/۱ ± میلی گرم (Sartorius)، کامپیوتر پنتیوم 4 IBM Compatible

پروتکل های تحریکی: مفاهیم پایه در مقالات چاپ شده گذشته به تفصیل شرح داده شده است [۱۲] که به طور کلی عبارتند از:

شاخص و نکباج (WBCL): بیانگر تحریک ناپذیری گره ای می باشد.

پروتکل ریکاوری (Recovery): در طی این پروتکل بعد از ۱۰ تحریک پایه یک تحریک نارس به بافت اعمال شده و پاسخ آخرین تحریک پایه نسبت به تحریک تأخیری - به صورت فاصله A2H2 (زمان هدایت) در برابر A1A2 (زمان ریکاوری) رسم می شود.

زمان تحریک ناپذیری مؤثر (ERP): طولانی ترین فاصله دو ثبت متوالی از دهلیزها (A1A2) قبل از آنکه به بلوک دهلیزی-گره ای برسیم.

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

فیبریلاسیون دهلیزی (AF): از پروتکل تحریک تصادفی با سرعت بالا جهت ایجاد فیبریلاسیون دهلیزی توسط رایانه استفاده شد. حداقل و حداکثر فاصله بین تحریکات ۷۵ تا ۱۲۵ میلی ثانیه و کل زمان اجرای پروتکل فیبریلاسیون دهلیزی ۱۵۰۰ ضربه که حدود ۵ دقیقه می باشد. جهت اطمینان از صحت ایجاد آریتمی فاصله بین ضربانات و فاصله بین دو ثبت متوالی از دسته هیس در دو پروتکل جداگانه و پشت سرهم اندازه گیری شد که تفاوت بین دو پروتکل تحریکی اجرا شده نباید بیش از ۳ میلی ثانیه باشد.

ناحیه پنهان (ZOC): اجرای پروتکل ریکاوری در چند سرعت پایه متفاوت که در هر بار ناحیه پنهان از طریق تفاضل بین زمان تحریک ناپذیری دهلیزی و زمان تحریک ناپذیری گره ای مشخص گردید. آستانه تحریک پذیری آریتمی (Exactable Gap): توسط اختلاف بین زمان تحریک ناپذیری

خرگوشهای نرنزاد نیوزلندی در محدوده وزنی ۱/۵-۲ کیلوگرم استفاده شد که با هپارین (۵mg/kg/IV) و پنتوباریتال سدیم (۳۵mg/kg/IV) پیش درمانی شدند، کلیه مراحل جراحی و جداسازی نمونه در مطالعات قبلی توضیح داده شده است [۱۲]. سپس قفسه سینه قلب باز شده و گستره بافتی شامل دهلیز راست نواحی گره دهلیزی-بطنی و سپتوم بین بطنی را از آن جدا و به کمک سوزنهایی بر روی یک توری، داخل محلول کربس هنسلیت ثابت و توسط محلول کربس هنسلیت به طور پیوسته با سرعت ۲۰۰ میلی لیتر در دقیقه تغذیه گردید. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی گلستان انجام گرفت. همچنین با استفاده از یک کانول پرفیوژن کرونر با فشار ۷۰-۸۰ میلی لیترجیوه و جریان کرونر ۱۰-۱۲ میلی لیتر در دقیقه برقرار گردید. توسط الکتروود دو قطبی از نواحی گره سینوسی-دهلیزی، کریستاترمینالیس، سپتوم بین دهلیزی و دسته هیس ثبت و سرعت ضربانات پایه قلب را مشخص کرده (شکل ۱) و سپس به کمک الکتروود تحریکی که درحاشیه گره سینوسی دهلیزی در دهلیز راست قرار گرفت، قلب را با سرعتی بالاتر از سرعت پایه ضربانات قلب تحریک نموده و پروتکل های تحریکی اجرا گردید. محلول کربس هنسلیت اکسیژنه شده توسط اکسیژن (۹۵٪) و دی اکسید کربن (۵٪) با درجه حرارت ۳۷±۰/۱ درجه سانتیگراد و pH= ۷/۴ ± ۰/۱ با حجم ۶ لیتر در یک مدار بسته توسط پمپ پریستالتیک بطور پیوسته بافت را از دو طریق تغذیه می کرد. محتوای محلول بر حسب میلی مولار شامل سدیم کلراید (۱۲۸)، پتاسیم کلراید (۴/۷)، کلسیم کلراید (۱/۷)، منیزیم کلراید (۱)، سدیم بیکربنات (۲۵)، سدیم هیدروژن فسفات (۰/۷) و دکستروز (۱۱/۱) بدون آب (Fluka) بود که تماماً از شرکت Sigma تهیه شدند. جهت بدست آوردن و آنالیز داده ها از کامپیوتر و نرم افزار استفاده می شود و سوگرایی محقق (Bias) در جمع آوری داده ها به دلیل استفاده از نرم افزار در جمع آوری داده ها وجود ندارد.

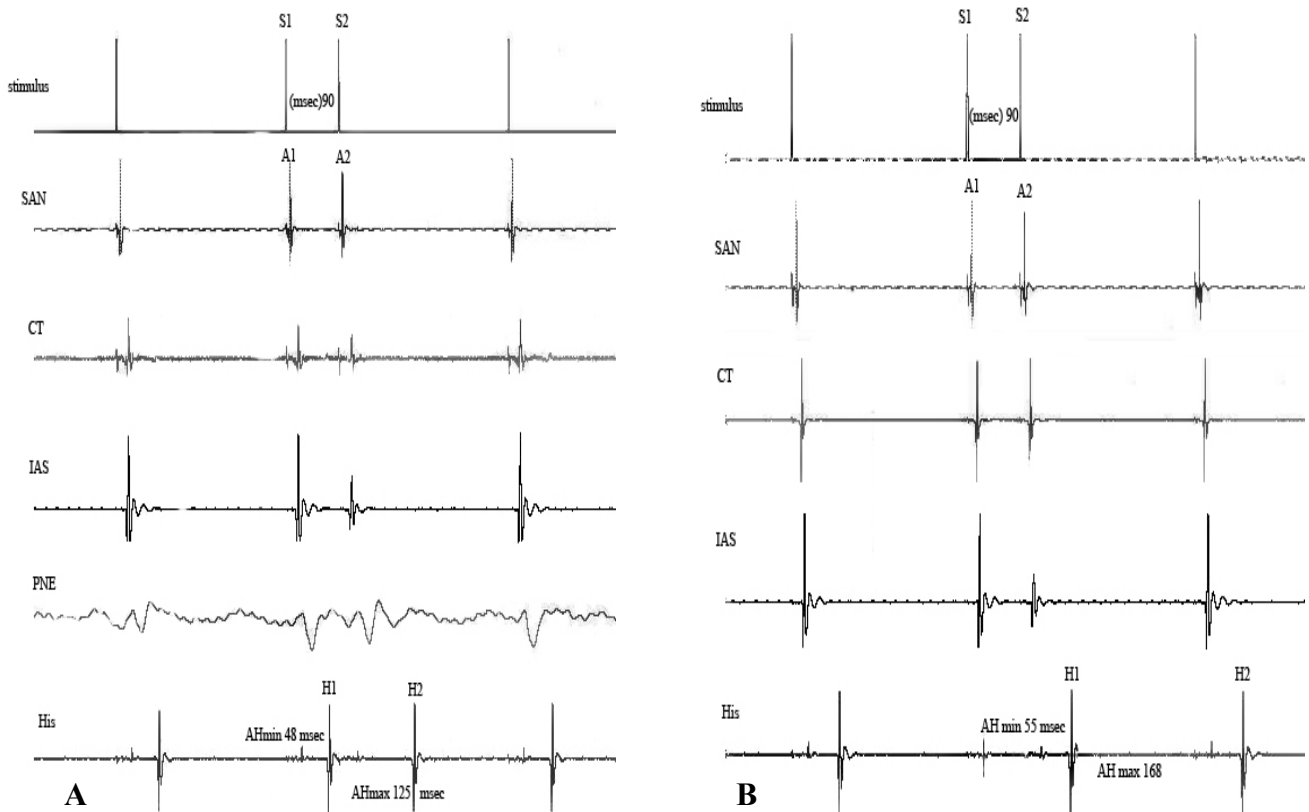
ابزار مورد استفاده: آمپلی فایر ۶ کاناله World Precision Instruments (W.P.I) (water safe)، ایزولاتور و واحد ثابت نگهدارنده ولتاژ World Precision Instruments (W.P.I)، پمپ پریستالتیک (Gambro)، برد A/D هشت کاناله با فرکانس نمونه برداری

حدود ۴۵ دقیقه مجدداً پروتکل‌های تحریکی تکرار گردید (N=۷). مقایسه بین دو گروه در ارتباط با یک شاخص با تست غیر جفتی (unpaired t-test) انجام شد و مقایسه بین دو گروه در ارتباط با چند شاخص به وسیله تست آنالیز واریانس دو طرفه انجام گرفت. $P < 0.05$ به عنوان معنی دار و کلیه آزمون‌ها بصورت دو طرفه ارزیابی گردید و سایر تجزیه و تحلیل‌ها توسط نرم افزار Graph pad Prism 5 انجام گرفت. کلیه داده‌ها به صورت $Mean \pm SE$ گزارش شد.

یافته‌ها

در آزمایشات اولیه غلظت‌های (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱۵ و ۳۰ میلی گرم در لیتر) مورد آزمایش قرار گرفت که با توجه به نتایج (جدول ۱)، غلظت‌های ۱۵ و ۳۰ میلی گرم در لیتر عصاره جهت آزمایشات بعدی انتخاب گردید. عصاره ولیک سرخ در غلظت‌های انتخابی سبب افزایش معنی دار زمان تحریک ناپذیری کارکردی (FRP) و زمان ونکباخ نسبت به حالت

موثر قبل و بعد از تاثیر دارو تقسیم بر اختلاف بین زمان هدایت قبل و بعد از تاثیر دارو محاسبه می‌گردد. اگر دارویی سبب ایجاد آستانه تحریک پذیری بزرگتر از یک شود به معنای آن است که می‌تواند آریتمی‌های گره‌ای را آهسته کرده و یا متوقف کند در صورتی که مقادیر کمتر از یک آستانه تحریک پذیری، بیانگر پتانسیل آریتمی زای دارو می‌باشد (۱۹). قبل از شروع آزمایش قلب مورد نظر باید حداقل به مدت ۶۰ دقیقه از نظر جریان عروق کرونر، زمان انتقال دهلیزی-گره‌ای و شاخص ونکباخ پایدار شده باشد، طراحی آزمایشات شامل مراحل کنترل و دارو بود، در گروه اول غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی ولیک سرخ به مدار داخلی اضافه گردید که به مدت حداقل ۴۰ دقیقه در تماس با قلب بود که پروتکل‌های تحریکی قبل و بعد از اضافه شدن عصاره هیدروالکلی ولیک سرخ تکرار شد (N=۷). در گروه دوم اتوبائین با غلظت ۰/۰۵ میکرومولار در لیتر به مدت ۴۰ دقیقه در تماس با قلب بود و پروتکل‌های تحریکی انجام شد پس از آن غلظت‌های انتخابی ولیک سرخ (۱۵ و ۳۰ میلی گرم در لیتر) اضافه و بعد از



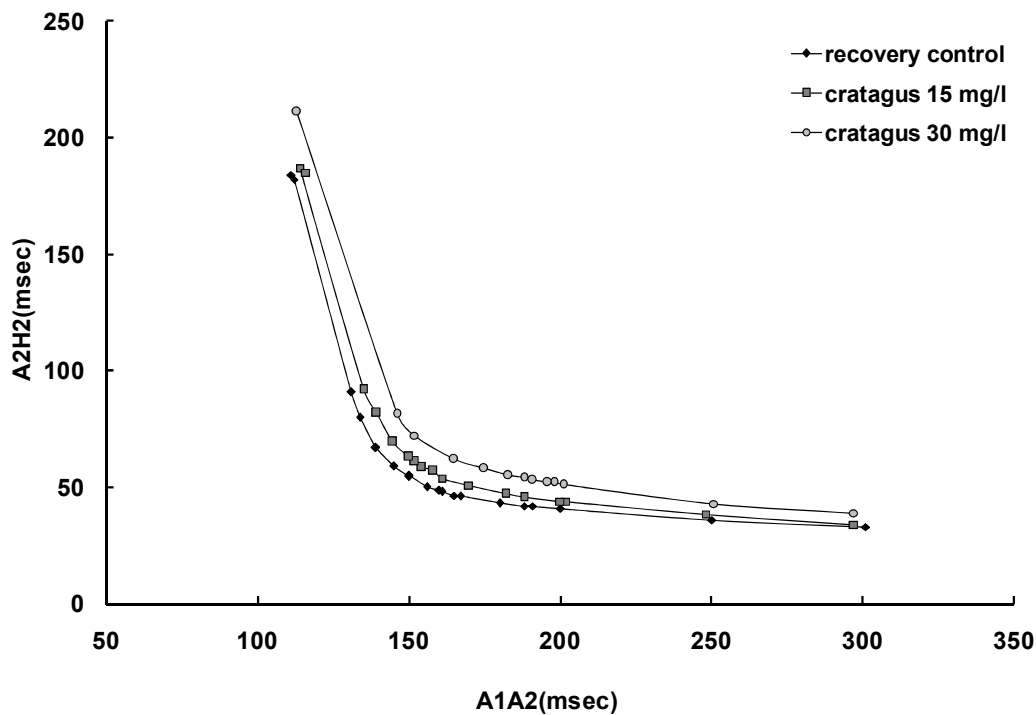
شکل ۱- وسط الکتروود دو قطبی از نواحی مختلف گره دهلیزی-بطنی ثبت گرفته شد که به ترتیب زیر مشخص می‌گردد. شکل A: قبل از اضافه کرده عصاره گیاه (کنترل)، شکل B: بعد از اضافه کردن غلظت ۳۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره ولیک سرخ، SAN: گره سینوسی دهلیزی، CT: کریستاترمینالس، IAS: سپتوم بین دهلیزی، PNE: زائده خلفی گره دهلیزی بطنی، HIS: دسته هیس، AH1H2 max: زمان هدایت ماکزیمم، AH1H1 min: زمان هدایت مینیوم

جدول ۱- اثرات غلظتهای مختلف ولیک سرخ در آزمایشات اولیه بر روی پارامترهای الکتروفیزیولوژیک پایه گره دهلیزی- بطنی (N=7). در مقایسه با کنترل *P<0.05, **P<0.01

Exactable GAP	WBCL (msec)	FRP (msec)	ERP (msec)	AH (msec)	کنترل
-	۱۵۸/۳±۳/۳	۱۶۶/۹±۳/۲	۱۰۱/۵ ± ۳/۶	۵۴/۹ ± ۶/۱	
-۵/۵	۱۶۰/۶±۳/۷*	۱۶۹/۴±۵/۲	۹۶/۵±۵/۲	۵۴±۵/۸	ولیک سرخ ۰/۱ میلیگرم در لیتر
۰/۱۵	۱۶۵/۱±۳/۳*	۱۷۳/۴±۹/۲	۱۰۲/۵±۵/۴	۶۱/۶±۳/۲	ولیک سرخ ۰/۵ میلیگرم در لیتر
۲/۵	۱۶۶ ± ۲/۹*	۱۷۳/۹ ± ۶/۲*	۱۱۱/۸ ± ۶/۵	۵۹ ± ۴/۲	ولیک سرخ ۱ میلیگرم در لیتر
- ۰/۶	۱۶۹/۳±۶/۴*	۱۷۱/۱±۵/۵*	۹۷/۴±۷/۳	۴۸/۳±۸/۲	ولیک سرخ ۱۵ میلیگرم در لیتر
۱۵/۸	۱۷۳±۵/۸*	۱۸۲/۷±۳/۸**	۱۲۸/۴±۱۲/۹	۵۶/۶±۳/۱	ولیک سرخ ۳۰ میلیگرم در لیتر

AH: زمان هدایت گره ای، WBCL: زمان شروع بلوک ۱:۲ دهلیزی-بطنی در طول اجرای پروتکل، ERP: زمان تحریک ناپذیری موثر (دهلیزی)، FRP: زمان تحریک ناپذیری عملکردی (بطنی)

آستانه آریتمی: اختلاف بین زمان تحریک ناپذیری موثر قبل و بعد از تاثیر دارو تقسیم بر اختلاف بین زمان هدایت گره‌های قبل و بعد از تاثیر دارو $\Delta ERP / \Delta AH$ تمامی داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شده است. تست آماری مورد استفاده: unpaired t-test two-tail p value



شکل ۲- اثرات غلظتهای ۱۵ و ۳۰ میلی گرم در لیتر عصاره هیدروالکلی ولیک سرخ بر روی منحنی ریکاوری گره دهلیزی بطنی. A1A2: مدت زمان بین دو تحریک متوالی، A2H2: مدت زمان هدایت گره ای.

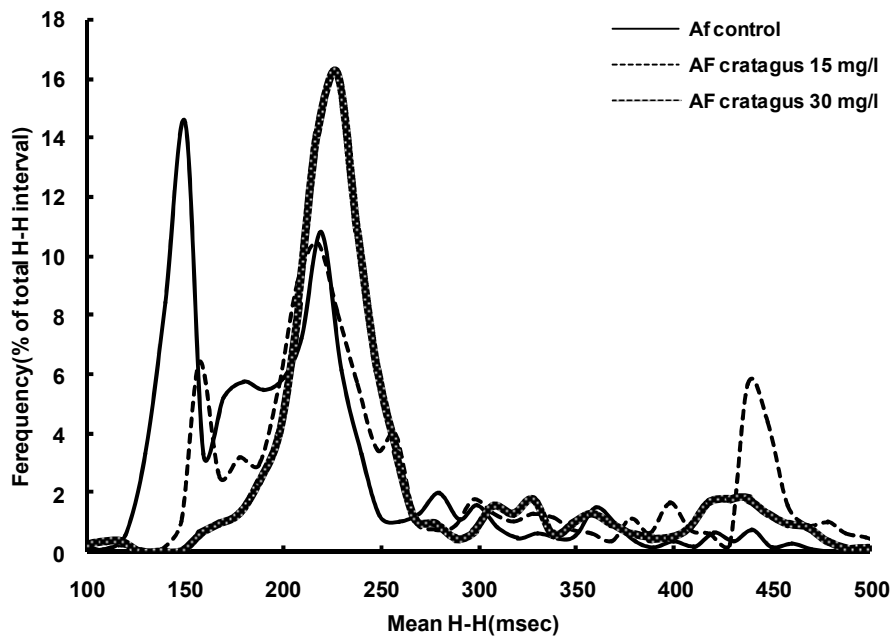
سبب کاهش غیر معنی دار میزان تسهیل در تمام غلظت‌ها گردید. اثرات گیاه سبب انتقال منحنی ریکاوری به سمت بالا شد که بیانگر افزایش زمان تحریک ناپذیری کارکردی FRP است (شکل ۲).

کنترل گردید ($P < 0.05$) (جدول ۱ و شکل ۲). از دیگر اثرات عصاره ولیک سرخ افزایش معنی دار میزان خستگی از $1/7 \pm 4/9$ میلی ثانیه به $23/1 \pm 4/9$ میلی ثانیه و $0/5$ میلی گرم در لیتر بود ($p < 0.05$)، همچنین

جدول ۲- اثرات غلظت‌های مختلف ولیک سرخ بر روی روی فیبریلاسیون دهلیزی شبیه سازی شده (N=7). در مقایسه با کنترل *P<0.05

تعداد حذف گره ای	میانگین فاصله H-H (msec)	
۷۴۳/۵ ± ۱۹/۴	۲۲۰ ± ۵/۴	کنترل
۷۹۸/۵ ± ۲۴/۲*	۲۵۰ ± ۸/۳*	ولیک سرخ ۱۵ میلیگرم در لیتر
۸۲۹/۵ ± ۲۸/۲*	۲۸۴ ± ۱۱/۱*	ولیک سرخ ۳۰ میلیگرم در لیتر

میانگین فاصله H-H: میانگین فاصله دو ثبت متوالی از دسته هیس، تعداد حذف گره ای: تعداد بلاک دو ثبت متوالی از دسته هیس، تمامی داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است، تست آماری مورد استفاده: unpaired t-test two-tail p value



شکل ۳- در حالت کنترل سیگنالها عمدتا در دو ناحیه بیشترین هدایت را از خود نشان دادند (منحنی دو قله ای) که قله با هدایت ۱۵۰ میلی ثانیه بیانگر هدایت در مسیر خلفی گره دهلیزی بطنی (مسیر آهسته) می باشد و قله با هدایت ۲۲۰ میلی ثانیه بیانگر هدایت در مسیر قدامی گره دهلیزی بطنی (مسیر سریع) است که بعد از اضافه نمودن غلظت های مختلف ولیک سرخ پیک هدایت در مسیر آهسته بتدریج کوچکتر شده و بیشترین هدایت امواج از طریق مسیر سریع صورت گرفت. Mean H-H (msec): میانگین فاصله دو ثبت متوالی از دسته هیس، Frequency (% of total HH interval): درصد فراوانی

جدول ۳- اثرات غلظت های مختلف ولیک سرخ بر روی پروتکل هدایت پنهان با سرعت های مختلف (N=7).

Zone of recovery(msec) CL Short (180-160)	Zone of recovery(msec) CL Intermediate (230-200)	Zone of recovery(msec) CL Long (300-280)	
۲۶/۱ ± ۱۱/۶	۲۶/۸ ± ۱۰/۴	۱۶/۲ ± ۵/۳	کنترل
۲۶/۵ ± ۱۰/۵	۲۷/۱ ± ۱۰/۸	۱۵/۵ ± ۳/۱	ولیک سرخ ۱۵ میلیگرم در لیتر
۳۴/۷ ± ۱۴/۸	۱۹/۸ ± ۹/۲	۲۱/۲ ± ۱۱/۲	ولیک سرخ ۳۰ میلیگرم در لیتر

Zone of recovery: اندازه فاصله بلاک ثبت از دسته دهلیزها (AA) و بلاک زمان هدایت گره ای (AH)، CL Long: Cycle Length. تمامی داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است، تست آماری مورد استفاده: unpaired t-test two-tail p value

جدول ۴- اثرات غلظتهای مختلف ولیک سرخ در حضور اثوبائین ر روی پارامترهای الکتروفیزیولوژیک پایه گره دهلیزی- بطنی (N=7). در مقایسه با کنترل *P<0.05.

WBCL (msec)	FRP (msec)	ERP (msec)	AHmax (msec)	AHmin (msec)	AH (msec)	
۱۵۳/۷±۴/۲	۱۶۳/۵±۳/۴	۹۶ ± ۴	۱۴۶/۴ ± ۱۲/۱	۶۷/۱ ± ۳/۴	۶۶/۱ ± ۵	اثوبائین ۰/۰۵ میکرومولار
۱۶۲/۱±۴/۸*	۱۶۷/۷±۴/۳*	۹۷±۸/۱	۱۵۵/۴±۲۰/۴	۶۸/۱±۲/۶	۶۷/۵±۵/۶	ولیک سرخ ۱۵
۱۶۷/۷±۴/۵*	۱۶۹/۸±۳/۱*	۱۰۷/۳±۱۰/۳	۱۴۹/۵±۱۸/۲	۶۸/۹±۳/۱	۶۸/۵±۴/۶	ولیک سرخ ۳۰

AH: زمان هدایت گره ای AHmin: زمان هدایت حداقل، AHmax: زمان هدایت حداکثر، ERP: زمان تحریک ناپذیری موثر (دهلیزی)، FRP: زمان تحریک ناپذیری عملکردی (بطنی)، WBCL: زمان شروع بلوک ۲:۱ دهلیزی- بطنی در طول اجرای پروتکل تمامی داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است. تست آماری مورد استفاده: unpaired t-test two-tail p value

با مدل مسیره‌های دوتایی شامل مسیر آهسته با هدایت طولانی و زمان تحریک ناپذیری کوتاه و مسیر سریع با زمان هدایت کوتاه و زمان تحریک ناپذیری طولانی می باشد. معمولا مسیر سریع از ورودی های قسمت آنتریور سلول های ترانزیشنال از سمت سپتوم بین دهلیزی تغذیه می شود، در حالیکه مسیر آهسته شامل سلولهای قسمت خلفی کامپکت نود می باشد [۱۹].

ولیک سرخ اثرات واضحی بر روی هدایت مسیر قدامی گره نداشت و نتوانست هدایت امواج در مسیر سریع را تضعیف کرده و آنرا به سمت مسیر خلفی (مسیر آهسته) هدایت کند (شکل ۲). اثرات گیاه بر روی منحنی ریکواری بیانگر تاثیر مهاری بیشتر ولیک سرخ روی مسیر آهسته (قسمت انتهایی منحنی) نسبت به مسیر سریع (قسمت صاف منحنی) می باشد. تاثیر عصاره ولیک بر روی افزایش غیرمعنی دار مقدار هدایت حداکثر (AHmax) منعکس کننده اثرات گیاه روی مسیر آهسته (سلولهای ترانزیشنال قسمت خلفی کامپکت نود) است. با توجه به آن که مطالعات قبلی بیانگر نقش سلولهای ترانزیشنال قسمت پروگزیمال گره در مکانیسم ایجاد تسهیل می باشد [۱۶]. مطالعه حاضر نشان داد که گیاه ولیک سرخ سبب افزایش غیر معنی دار زمان هدایت حداقل می گردد بنابراین احتمالا تاثیر ناپذیری بر روی قسمت قدامی سلولهای کامپکت نود دارد که این نتایج تأیید کننده نقش ناپذیر این گیاه در پدیده تسهیل می باشد.

افزایش معنی دار خستگی بیانگر رفتار وابسته به سرعت ولیک سرخ می باشد. خستگی را به علت زمان تحریک ناپذیری

عصاره ولیک همچنین سبب افزایش معنی دار میانگین فاصله دو ثبت متوالی از دسته هیس و میانگین تعداد حذف گره ای در پروتکل فیبریلاسیون دهلیزی گردید (جدول ۲ و شکل ۳). همچنین ولیک سرخ در دو غلظت انتخابی توانست تعداد ضربانات رادر یک رابطه وابسته به غلظت کندتر کند و از $۳۶۸ \pm ۲۲/۱$ میلی ثانیه در کنترل به $۴۶۵ \pm ۳۷/۱$ میلی ثانیه در غلظت ۳۰ میلیگرم در لیتر برساند که از نظر آماری معنی دار بود ($p \leq 0.05$).

عصاره هیدروالکلی ولیک سرخ در غلظت ۳۰ میلی گرم در لیتر سبب افزایش غیر معنی دار ناحیه پنهان شد (جدول ۳). میزان تحریک ناپذیری کارکردی (FRP) و میزان ونکباخ در حضور اثوبائین ۰/۰۵ میکرومولار افزایش معنی دار یافت ولی مهار پمپ سدیم پتاسیم وابسته به انرژی نتوانست جلوی اثرات مهاری عصاره هیدروالکلی ولیک سرخ را بگیرد (جدول ۴). اثوبائین همچنین تاثیری در اثرات طولانی کننده ضربانات بطنی (میانگین H-H) و تعداد بیت های پنهان توسط ولیک سرخ نداشت.

بحث

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان میدهد که عصاره هیدروالکلی ولیک سرخ در غلظت ۰/۵ تا ۳۰ میلیگرم در لیتر میتواند سبب اثرات مهاری معنی دار گره ای شود. این رفتار به صورت افزایش در زمان تحریک ناپذیری کار کردی و بدون تاثیر بر روی زمان هدایت دیده شد. گره دهلیزی بطنی مطابق

اثرات خود را اعمال نموده است. نتایج حاصل از سوزاندن مسیر آهسته در انسان و در حیوانات نشان داده است که تحریک ناپذیری موثر (ERP) در ارتباط با مسیر آهسته می باشد و تحریک ناپذیری کارکردی (FRP) در ارتباط با سلول های فشرده گره ای است، بنابراین افزایش FRP و ونکباخ و عدم افزایش معنی دار ERP و زمان هدایت می تواند نشان دهنده تاثیر این گیاه بر روی سلول های فشرده باشد. عصاره هیدروالکلی ولیک سرخ در غلظت ۱۵ و ۳۰ میلیگرم در لیتر سبب تقویت رفتار محافظتی ضد فیبریلاسیون دهلیزی گره دهلیزی-بطنی شد. این اثرات حداقل قسمتی به دلیل اثرات این گیاه بر روی افزایش در ناحیه پنهان و اثرات وابسته به سرعت در غلظتهای بالاست.

نتایج تحقیق حاضر دلالت بر اثرات حفاظتی این گیاه بر روی گره دهلیزی-بطنی در زمان فیبریلاسیون دهلیزی دارد. این اثرات به صورت کاهش ضربانات بطنی و به صورت افزایش در میانگین فاصله دو ثبت متوالی از دسته هیس ظاهر شد. در ارتباط با اثرات ضد فیبریلاسیون بطنی و اثرات جلوگیری کننده از آریتمی های بطنی ناشی از ایسکمی این گیاه تحقیقات متعددی انجام شده است [۱، ۲، ۳، ۴، ۵]، که تحقیقات حاضر تایید کننده تحقیقات قبلی در اثرات واضح گیاه ولیک سرخ است.

در سال ۱۹۸۱ آقای Ammon و Handel اثرات پیشگیری کننده این گیاه را در آریتمی های ایجاد شده توسط اکونیتین، کلسیم کلراید و آدرنالین نشان دادند [۱]. آقای Veveris اثرات ضد آریتمی عصاره گیاه ولیک سرخ را نشان داد همچنین در مطالعات مختلف اثرات جلوگیری کننده از آریتمی ناشی از ایسکمی مخصوصا در دوره های مصرف طولانی به صورت پیش درمانی با این گیاه دیده شده است [۱۳، ۱۱، ۳، ۲۲، ۲۰].

بنابراین مطالعه حاضر برای اولین بار توانست نشان دهد که عصاره هیدروالکلی ولیک سرخ می تواند از طریق تاثیر بر روی سلولهای فشرده و افزایش زمان تحریک ناپذیری وبدون تاثیر بر روی ناحیه پنهان نقش محافظتی گره دهلیزی-بطنی را در زمان وقوع آریتمی های دهلیزی تقویت کند. عصاره هیدروالکلی گیاه ولیک سرخ سبب افزایش ناحیه پنهان، کاهش سرعت ضربانات بطنی و افزایش زمان تحریک ناپذیری در گره

طولانی سلولهای کامپکت نود در قسمت دیستال گره دهلیزی-بطنی می دانند [۲]. مطالعات قبلی نشان داد که مکانیسم اثرات ولیک سرخ در افزایش نیروی انقباضی و ضربانات قلبی به علت مهار پمپ سدیم پتاسیم وابسته به انرژی و مهار پمپ فسفودی استراز می باشد [۲۰، ۳].

بنابراین نتایج این تحقیق در راستای مطالعات قبلی می-تواند احتمال مهار پمپ سدیم پتاسیم وابسته به انرژی را توسط گیاه ولیک سرخ در گره دهلیزی بطنی مطرح کند. افزایش زمان تحریک ناپذیری کارکردی و زمان ونکباخ بیانگر نقش قاطع عصاره ولیک سرخ روی سلولهای گره ای (N) در قسمت کامپکت نود گره می باشد. آستانه تحریک پذیری به عنوان یکی از مهمترین عوامل کنترل کننده آریتمی های گره ای مطرح می باشد [۲۱].

نسبت بین توانایی دارو در افزایش تحریک ناپذیری به توانایی دارو در افزایش هدایت گره ای به نام شاخص آستانه تحریک پذیری دارو تعریف می گردد [۲۱]. داروهای ضد آریتمی موثر مانند دیلتازم و وراپامیل آستانه تحریک پذیری بالاتر از یک دارند. هرچه آستانه تحریک پذیری بالاتر باشد توانایی دارو در خاتمه آریتمی های چرخشی بیشتر است. در تحقیق حاضر اگرچه ولیک سرخ نتوانست آستانه تحریک پذیری را زیاد بالا ببرد ولی سبب مثبت شدن این آستانه گردید که می تواند بیانگر نقش نسبی این گیاه در خاتمه دادن به آریتمی های چرخشی گره باشد [۲۱]. جواب بالینی بطن ها در AF مشخصا به صورت فواصل نامنظم بطنی ظاهر میشود اگر چه دلیل اصلی این آشوب مشخص نیست ولی دو مکانیسم در ایجاد آن عبارت است از پدیده هدایت پنهان در گره دهلیزی-بطنی و زمان تحریک ناپذیری گره ای. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی ولیک سرخ سبب کاهش سرعت ضربانات بطنها در آریتمی و افزایش تعداد ضربانات پنهان شده ولی سبب افزایش ناحیه پنهان در گره نمی گردد. مکانیزم ایجاد ناحیه پنهان را در ارتباط با نقش مسیر آهسته می دانند زیرا سوزاندن مسیر آهسته سبب افزایش معنی دار ناحیه پنهان در گره می شود.

بنابراین می توان نتیجه گیری کرد که به دلیل تاثیر مشخص ولیک در افزایش FRP و WBCL احتمالا این گیاه از طریق تاثیر بر روی مسیر آهسته و سلولهای فشرده گره ای

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی استان گلستان و مازندران جهت تصویب و در اختیار گذاشتن اعتبار جهت انجام طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

دهلیزی- بطنی خرگوش می‌شود که این اثرات بیانگر نقش محافظتی این گیاه در طول آریتمی های دهلیزی (AF) در جلوگیری از افزایش سرعت ضربانات بطنها و کاهش سرعت و یا خاتمه آریتمی های گره ای و چرخشی (AVNRT) می‌باشد.

References

- [1] Ammon HP, Händel M. Crataegus, Toxicology and Pharmacology Part II: Pharmacodynamics1. *Planta Med.* 1981; 43(11):209-39.
- [2] Billette J, Metayer R, St-Vincent M. Selective functional characteristics of rate-induced fatigue in rabbit atrioventricular node. *Circ Res.* 1988; 62(4):790-9.
- [3] Chang WT, Dao J, Shao ZH. Hawthorn: potential roles in cardiovascular disease. *Am J Chin Med.* 2005; 33(1):1-10.
- [4] Chen SA, Chiang CE, Tai CT, Lee SH, Chiou CW, Ueng KC, Wen ZC, Chang MS. Transient complete atrioventricular block during radiofrequency ablation of slow pathway for atrioventricular nodal reentrant tachycardia. *Am J Cardiol.* 1996; 77(15):1367-70.
- [5] Cleland JG, Coletta AP, Clark AL. Clinical trials update from the American College of Cardiology 2007: ALPHA, EVEREST, FUSION II, VALID, PARR-2, REMODEL, SPICE, COURAGE, COACH, REMADHE, pro-BNP for the evaluation of dyspnoea and THIS-diet. *Eur J Heart Fail.* 2007; 9(6-7):740-5.
- [6] Geller JC, Biblo LA, Carlson MD. Relation between the AH interval and the ablation site in patients with atrioventricular nodal reentrant tachycardia. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2004; 27(10):1347-54.
- [7] Gruenwald. J Crataegus laevigata. PDR herbal medicines 271-275 second edition (2001).
- [8] Guerra PG, Talajic M, Roy D, Dubuc M, Thibault B, Nattel S. Is there a future for antiarrhythmic drug therapy? *Drugs.* 1998; 56(5):767-81.
- [9] Hirao K, Scherlag BJ, Poty H, Otomo K, Tondo C, Antz M, Patterson E, Jackman WM, Lazzara R. Electrophysiology of the atrio-AV nodal inputs and exits in the normal dog heart: radiofrequency ablation using an epicardial approach. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1997; 8(8):904-15.
- [10] Iranian Herbal Pharmacopoeia, Herbal Pharmacopoeia Committee of Iran, Food and Drug, Ministry of Health, Medical Education, First Edition, 2002.
- [11] Jayalakshmi R, Thirupurasundari CJ, Devaraj SN. Pretreatment with alcoholic extract of Crataegus oxycantha (AEC) activates mitochondrial protection during isoproterenol. induced myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem.* 2006; 292(1-2):59-67.
- [12] Khori V, Nayeypour M, Mansourian AR. The effect of aqueous extract of crocus sativus on the electrophysiological properties of isolated perfused rabbit AV-Node. *Pakistan journal of biological sciences.* 2006; 9(14): 2647-265.
- [13] Koçyıldız ZC, Birman H, Olgaç V, Akgün-Dar K, Melikoğlu G, Meriçli AH. Crataegus tanacetifolia leaf extract prevents L-NAME-induced hypertension in rats: a morphological study. *Phytother Res.* 2006; 20(1):66-70.
- [14] Long SR, Carey RA, Crofoot KM, Proteau PJ, Filtz TM. Effect of hawthorn (Crataegus oxycantha) crude extract and chromatographic fractions on multiple activities in a cultured cardiomyocyte assay. *Phytomedicine.* 2006; 13:643-50.
- [15] Mazgalev TN, Ho SY, Anderson RH. Anatomic-electrophysiological correlations concerning the pathways for atrioventricular conduction. *Circulation.* 2001; 103(22):2660-7.
- [16] Mazgalev T, Mowrey K, Efimov I, Fahy GJ, Van Wagoner D, Cheng Y, et al. Mechanism of atrioventricular nodal facilitation in rabbit heart: role of proximal AV node. *Am J Physiol.* 1997; 273(4 Pt 2):H1658-68.
- [17] Mazgalev TN, Tchou PJ. Atrial-AV Nodal Electrophysiology: A View from the Millennium. Futura Publishing Co., Armonk, NY, 2000, pp: 1-492.
- [18] Nayeypour 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; 412(1):77-89.
- [19] 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.
- [20] Schwinger RH, Pietsch M, Frank K, Brixius K. Crataegus special extract WS 1442 increases force of contraction in human myocardium cAMP-independently. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 35(5):700-7.
- [21] Talajic M, Lemery R, Roy D, Villemaire C, Cartier R, Coutu B, Nattel S. Rate-dependent effects of diltiazem on human atrioventricular nodal properties. *Circulation.* 1992; 86(3):870-7.
- [22] Veveris M, Koch E, Chatterjee SS. Crataegus special extract WS 1442 improves cardiac function and reduces infarct size in a rat model of prolonged coronary ischemia and reperfusion. *Life Sci.* 2004; 74(15):1945-55.