

نقش رسپتورهای آدرنرژیک در اثرات الکتروفیزیولوژیک عصاره هیدروالکلی بهار نارنج (*Citrus bigaradia*) در مدل آزمایشگاهی فیبریلاسیون دهلیزی گره دهلیزی بطنی جدا شده خرگوش

محمد آزادبخت^۱ وحید خوری^۲ محسن نایب پور^۳ منا پورابوک^۴ سمیه فاضلی نژاد^۵

چکیده

سابقه و هدف: مطالعات اولیه اثرات سودمند قلبی عصاره بهار نارنج را با مکانیسم‌های متفاوت نشان داده است. نقش محافظتی کارکردی این گیاه در مقابل آریتمی‌های فوق بطنی هنوز مشخص نشده است. مطالعه حاضر جهت بررسی نقش عصاره هیدروالکلی بهار نارنج در تغییر خواص الکتروفیزیولوژیک گره دهلیزی-بطنی در طول فیبریلاسیون دهلیزی شبیه‌سازی شده در خرگوش آزمایشگاهی و تعیین نقش رسپتورهای آدرنرژیک در اثر بهار نارنج روی گره دهلیزی-بطنی طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از خرگوش‌های نر نیوزلندی (۲-۱/۵ kg) استفاده شد. پروتکل‌های تحریکی (ریکاوری، ونکباخ، فیبریلاسیون دهلیزی و ناحیه پنهان) برای بررسی خواص الکترو فیزیولوژیک گره دهلیزی-بطنی ایزوله خرگوش، در ۲ گروه استفاده شدند (N=۲۳). در گروه اول (N=۱۰) غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی بهار نارنج جهت تعیین خصوصیات هدایت پنهان به تیرود اضافه شدند. در گروه دوم (N=۱۳) اثرات غلظت‌های عصاره گیاه (۱۰۸، ۵۴ میلی گرم در لیتر) در حضور آنتاگونیست رسپتور β ، (نادولول ۲ میکرومولار در لیتر) آنالیز شدند. تمام نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شده است.

یافته‌ها: عصاره هیدروالکلی بهار نارنج یک الگوی وابسته به غلظت دوفازی داشت به صورتیکه در غلظت‌های کم و متوسط (۳/۲-۰/۸ میلی گرم در لیتر) تحریک ناپذیری گره‌ای و ونکباخ را کوتاه کرد. کاهش غیر معنی‌دار در میانگین فاصله دو ثبت متوالی از دسته هیس و مقدار ضربانات پنهان در تمامی غلظت‌های بهار نارنج دیده شد. ناحیه پنهان توسط این گیاه کوتاه گردید. نادولول (۲ میکرومولار در لیتر) از تمامی اثرات بهار نارنج روی هدایت پنهان، تحریک ناپذیری و هدایت پنهان جلوگیری کرد.

استنتاج: تمامی این نتایج نشان دهنده پتانسیل اثرات آریتمی‌زای بهار نارنج در تشدید تاکی آریتمی‌های فوق بطنی است. ممکن است مکانیزم عمده این گیاه کاهش تحریک ناپذیری گره‌ای و ناحیه پنهان باشد. حداقل قسمتی از اثرات بهار نارنج از طریق رسپتور β واسطه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: گره دهلیزی-بطنی، فیبریلاسیون دهلیزی، عصاره هیدروالکلی بهار نارنج، آریتمی

مقدمه

فیبریلاسیون دهلیزی (AF) یکی از انواع رایج آریتمی است، تنها در ایالت متحده آمریکا حدود ۳/۲ میلیون

E-mail: vaph99@yahoo.com

مؤلف مسئول: دکتر وحید خوری - گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی فلسفی، مرکز تحقیقات قلب و عروق

۱. دکترای فارماکولوژی، استاد دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲. دکترای فارماکولوژی، دانشیار مرکز تحقیقات قلب و عروق دانشگاه علوم پزشکی گلستان

۳. دکترای فارماکولوژی، دانشیار گروه فارماکولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴. کارشناس زیست‌شناسی، مرکز تحقیقات قلب و عروق دانشگاه علوم پزشکی گلستان

۵. کارشناس ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه فارماکولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۷/۱۱/۱۳ تاریخ تصویب: ۸۷/۱۲/۱۴

همچنین اثرات ضد ترومبوز، ضد ایسکمی، آنتی اکسیدانی و گشادکننده عروق از فلاونوئیدهای بهارنارنج گزارش شده است. مهمترین فلاونوئیدهای بهارنارنج شامل هسپریدین، نارنجین، نوهسپریدین است که جزء کلاس فلاوانون می باشند همچنین از دسته فلاونها (flavones) دئوسپین، آپی جنین نیز وجود دارند (۹). مطالعه آقای خوآرز دیاز در سال ۲۰۰۷ نشان داده است که عصاره بهارنارنج در مدل قلب ایزوله می تواند سبب کاهش فشار شریانی شود (۱۰). اسانس بهارنارنج در یک مدل وابسته به غلظت و غیر وابسته، به سرعت سبب اثرات مهاری مسیر آهسته و سریع گره دهلیزی بطنی و سلولهای کامپکت نود گردید که اثرات گیاه روی مسیر سریع بیش از مسیر آهسته بود. این رفتار نشان دهنده اثرات ضدآریتمی این گیاه میباشد که در مقایسه با وراپامیل قابل توجه بود (۱۱). تاکنون هیچ تحقیقی با موضوع نقش ضدآریتمی عصاره خشک شده بهارنارنج و مکانیزم اثرات آن انجام نشده است. مطالعه حاضر جهت بررسی نقش عصاره هیدروالکلی بهارنارنج در تغییر خواص الکتروفیزیولوژیک گره دهلیزی- بطنی در طول فیبریلاسیون دهلیزی شبیه سازی شده در خرگوش آزمایشگاهی و تعیین نقش رسیپتورهای آدرنژیک در اثر بهارنارنج روی گره دهلیزی-بطنی طراحی شده است.

مواد و روش ها

عصاره گیری بهارنارنج:

گل های گیاه نارنج (بهار نارنج) با نام علمی *Citrus bigaradia* از درختان شهر ساری در اردیبهشت ۱۳۸۶ جمع آوری گردید و نمونه هرباریومی آن در هرباریوم دانشکده داروسازی ساری با شماره ۱۱-۲۹-El ثبت شد. گلها در سایه و سپس در آن (۴۰ درجه سانتیگراد) خشک شدند. جهت استخراج از ۵۰۰ گرم پودر خشک (با مش ۱۰۰) توسط حلال اتانل - آب (۱-۴) با روش پرکولاسیون (به مدت ۷۲ ساعت) استفاده شد.

نفر مبتلا به آریتمی هستند و سالانه بیش از ۱۶۰۰۰۰ مورد جدید به آن اضافه می شود. فیبریلاسیون دهلیزی خطر سکت، نارسایی قلبی احتقانی و مرگ ناشی از گرفتگی عروق قلبی را افزایش می دهد (۱). گره دهلیزی- بطنی با استفاده از خواص منحصر به فرد خود مانند تحریک ناپذیری و هدایت پنهان نقش محافظتی مهمی در تعیین سرعت ضربان بطنها در طول فیبریلاسیون دهلیزی دارد. داروها و تکنیکهای جراحی مانند سوزاندن بافت های گره، دهلیزی- بطنی می توانند از طریق تغییر خواص هدایتی و تحریک ناپذیری گره نقش مهمی در درمان آریتمی های فوق بطنی داشته باشند (۲). با وجود درمان های متعدد، تاکنون روش ایده آل دارویی در درمان طیف وسیع بیماران با تاکی آریتمی های /فوق بطنی و دهلیزی پیدا نشده است. دیگوکسین نزدیک به ۱۰۰ سال است که از گیاه گل انگشتانه (*Digitalis purpurea*) به دست می آید، کینیدین و آجمالین جزء مهمترین داروهای گیاهی مورد تایید FDA در درمان آریتمی های بطنی و دهلیزی هستند (۳). نارنج *Citrus bigaradia or auriantum* درختی است به ارتفاع ۴ تا ۵ متر با برگ های براق و معطر و طعمی تلخ، گل های آن معطر و سرشار از اسانس است (۴). ترکیبات شیمیایی موجود در این گیاه هیدروکربن ها، الکل ها، انواعی از استات، اسیدها و فنولها می باشد. فلاونوئیدها دسته ای از پلی فنولها است که در عصاره گرفته شده از بهار نارنج موجود می باشند (۵). در طب سنتی قسمت های مختلف گیاه نارنج در درمان سردرد، درد سینه، شادابی پوست مورد استفاده قرار می گیرد و همچنین به عنوان آرام بخش و تونیک کاربرد دارد (۶،۳). عصاره بهار نارنج سبب رفع طپش قلب می شود و همچنین اثر تونیک قلبی دارد (۵،۴). فلاونوئیدهای بهار نارنج، اثر اینوتروپ مثبت روی میوکاردا دارند (۸،۷). خواص ضدسرطانی و ضدالتهابی نیز از فلاونوئیدهای گیاه بهارنارنج گزارش شده است. بسیاری از تاثیرات فلاونوئیدهای بهارنارنج به علت مهار آنزیمی است،

گره سینوسی - دهلیزی، کریستا ترمینالیس، سپتوم بین دهلیزی و دسته هیس ثبت گرفته و سرعت ضربانات پایه قلب مشخص گردید (شکل شماره ۲) و سپس به کمک الکتروود تحریکی که درحاشیه گره سینوسی دهلیزی در دهلیز راست قرار می گرفت، قلب با سرعتی بالاتر از سرعت پایه ضربانات قلب تحریک و پروتکل های تحریکی اجرا گردید. محلول تیروید اکسیژنه شده توسط اکسیژن (۹۵ درصد) و دی اکسید کربن (۵ درصد) با درجه حرارت 37 ± 0.1 درجه سانتیگراد و $pH = 7.4 \pm 0.1$ با حجم ۶ لیتر، در یک مدار بسته توسط پمپ پرستالتیک به طور پیوسته بافت را تغذیه می کرد. محتوای محلول بر حسب میلی مولار در لیتر شامل مواد ذیل می باشد که از شرکت MERCK آلمان تهیه شده است:

NaCl (128), KCl (4.7), CaCl₂ (2), MgCl₂ (1), NaHCO₃ (25), NaH₂PO₄ (0.7), Dextrose (11.1).

پروتکل های تحریکی:

مفاهیم پایه در مقالات چاپ شده گذشته به تفصیل شرح داده شده است (۱۱) که به طور کلی عبارتند از: شاخص ونکباخ (WBCL): بنا به تعریف به بلوک درجه سوم دهلیزی - گره ای ناشی از افزایش در سرعت تحریک دهلیزها اطلاق شده و شروع بلوک به عنوان زمان ونکباخ ثبت می شود.

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 موثر (ERP): مطابق با مطالعات گذشته عبارت از طولانی ترین فاصله دو ثبت متوالی از دهلیزها (A1A2) قبل از رسیدن به بلوک دهلیزی - گره ای است.

زمان تحریک نا پذیر کارکردی (FRP): عبارت

پایان زمان استخراج با انجام تست سیانیدین جهت استخراج کامل فلاونوئیدها تعیین گردید و عصاره حاصل توسط دستگاه تقطیر در خلا دوار و سپس توسط آون با حرارت ۴۵ درجه سانتیگراد خشک و سپس پودر شد. میزان پودر حاصل ۱۱/۲ درصد بود. جهت استاندارد سازی، پودر حاصل از عصاره مذکور، با اسید کلریدریک اسیدی شده و توسط اتیل استات سه بار و هر بار با ۵۰۰ میلی لیتر دکانته شد. حاصل استخراج اتیل استاتی نیز توسط دستگاه دوار تقطیر در خلا تغلیظ شده و میزان فلاونوئیدهای تام آن با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (فارماکوپه 10 DAB آلمان) اندازه گیری گردید. در این روش از معرف هگزامیلن تترامین در طول موج ۴۲۲ نانومتر استفاده شد. میزان فلاونوئید تام ۰/۳۷۱ درصد بوده است.

آزمایش های فارماکولوژیک:

در آزمایش های انجام شده از خرگوش های نر نژاد نیوزلندی انیستیتو پاستور در محدوده وزنی ۲-۱/۵ کیلوگرم استفاده شد که به صورت چرخه نور، ۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی در قفس های جداگانه و دسترسی آزاد به آب و غذای پلیت (خوراک دام پارس) داشتند. در زمان اجرای آزمایش حیوانات با هیپارین (۵mg/kg/IV) و پنتوباریتال سدیم (۳۵mg/kg/IV) پیش درمانی شده و پس از بیهوش شدن با وارد آوردن ضربه ای به پشت سر کشته می شدند. بعد از باز کردن قفسه سینه قلب آنها جدا شده و گستره بافتی شامل دهلیز راست نواحی گره دهلیزی - بطنی و سپتوم بین بطنی جدا شده و به کمک سوزنهایی روی یک توری داخل تیروید در مدار داخلی ثابت می شد. سپس توسط محلول تیروید به طور پیوسته با سرعت ۲۰۰ میلی لیتر در دقیقه آن را تغذیه می شدند. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی گلستان رعایت شد. با استفاده از الکتروود دو قطبی، از نواحی

ریکاوری با چند سرعت پایه متفاوت انجام شد و در هر بار، ناحیه پنهان از طریق تفاضل بین زمان تحریک ناپذیری دهلیزی و زمان تحریک ناپذیری گره‌ای مشخص گردید.

قبل از شروع آزمایش‌های مورد نظر حداقل به مدت ۶۰ دقیقه از نظر جریان عروق کرونر، زمان انتقال دهلیزی- گره‌ای و شاخص ونکباخ پایدار شده بودند. طراحی آزمایش در دو گروه به صورت کنترل و مورد بود. گروه ۱: انجام پروتکل‌های تحریکی در حضور تیروید (کنترل)، اضافه کردن عصاره هیدروالکلی بهارنارنج به مدار داخلی و سپری شدن ۴۵ الی ۹۰ دقیقه و تکرار پروتکل‌های تحریکی (مورد). گروه ۲: اضافه کردن نادلول ۲ میکرومولار (۱۲) و گذشت ۱۰ دقیقه و اجرای پروتکل‌های تحریکی (کنترل) و اضافه کردن غلظت‌های مختلف عصاره به مدار داخلی و سپری شدن ۴۵ الی ۹۰ دقیقه و تکرار پروتکل‌های تحریکی (مورد). تعداد کل نمونه‌های مورد بررسی و آنالیز ۲۳ نمونه بود. نرمال بودن داده‌ها توسط تست KS (کروموف-اسپیرونوف) بررسی شد و سپس مقایسه بین چندگروه با تست آنالیز واریانس یکطرفه و تست تکمیلی t زوج مورد بررسی قرار گرفت. کلیه داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شد. $P < 0.05$ به عنوان شاخص معنی‌داری در نظر گرفته شد. از نرم‌افزار SPSS جهت بررسی‌های آماری استفاده شده.

یافته‌ها

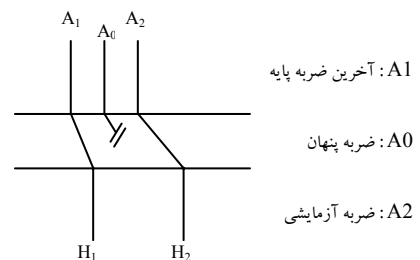
آزمایشات اولیه جهت تعیین غلظت موثر بهارنارنج:

ابتدا در یک سری آزمایشات اولیه که روی ۱۰ نمونه انجام شد، غلظت‌های ۰/۴، ۰/۸، ۱/۶، ۳/۲، ۶ و ۹ میلی‌گرم در لیتر عصاره هیدروالکلی بهارنارنج مورد آزمایش قرار گرفت. عصاره هیدروالکلی بهارنارنج توانست در یک مدل وابسته به غلظت، سبب کاهش پارامترهای پایه به خصوص زمان تحریک ناپذیری گره

است از کوتاه‌ترین فاصله دو ثبت متوالی از دسته هیس (H1H2) که در طی یک پروتکل تحریکی به دست می‌آید. 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 میلی‌ثانیه و کل زمان اجرای پروتکل فیبریلاسیون دهلیزی ۱۵۰۰ ضربه، حدود ۳ دقیقه می‌باشد. 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 اندازه‌گیری شد که تفاوت بین دو پروتکل تحریکی اجرا شده نباید بیش از ۳ میلی‌ثانیه باشد.

هدایت پنهان (ZOC): این پروتکل به دو طریق اندازه‌گیری شد: ۱) با استفاده از پروتکل ریکاوری ناحیه پنهان که به صورت تفاضل بین زمان تحریک ناپذیری گره‌ای و دهلیزی مشخص گردید. سپس منحنی هدایت پنهان با استفاده از ضربه پنهان به صورت ذیل تعریف شد.

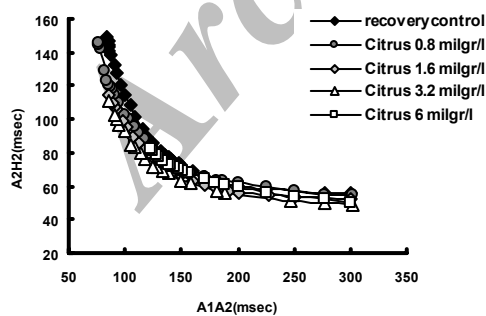
فاصله بین زمان تحریک ناپذیری دهلیزی (AA) و تحریک ناپذیری گره‌ای (AH)



سپس منحنی پنهان از طریق رسم هدایت ضربه بعد از بیت پنهان در مقابل ریکاوری ضربه قبل از ضربه پنهان رسم شد.

۲) استفاده از سرعت‌های مختلف در پروتکل هدایت پنهان: اثرات ضربانات شرطی روی ناحیه پنهان در پروتکل جداگانه به این ترتیب بررسی شد که پروتکل

تعداد ضربانات بطن‌ها) و در نهایت شیفت به سمت چپ منحنی فیبریلاسیون دهلیزی شد که این روند در غلظت ۶ میلی گرم در لیتر از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.05$) (شکل شماره ۲). عصاره هیدروالکلی بهارنارنج سبب کاهش هدایت پنهان و ناحیه پنهان با استفاده از هر دو پروتکل به کار رفته شد به صورتی که در غلظت‌های ۳/۲ و ۶ میلی گرم در لیتر بیشترین کاهش در ناحیه پنهان مشاهده شد (جدول شماره ۱). نادولول با غلظت ۲ میکرومولار توانست اثرات کاهنده بهارنارنج را روی هدایت پنهان از بین ببرد و سبب افزایش غیر معنی دار هدایت پنهان گردد به طوری که اختلاف ناحیه ریکاوری در سرعت‌های بالا و پایین از $11/2 \pm 21/3$ میلی ثانیه در حضور نادولول به $9/7 \pm 26/2$ میلی ثانیه در حضور بهارنارنج با غلظت ۶ میلی گرم در لیتر افزایش غیر معنی دار یافت. نادولول همچنین توانست کاهش زمان هدایت گره‌ای دیده شده از غلظت‌های مختلف بهارنارنج را آنتاگونیست کند، در صورتیکه هیچ تاثیری روی پارامترهای تحریک ناپذیری گره‌ای (FRP و WBCL) نداشت (جدول شماره ۲).



شکل شماره ۱: اثرات غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی بهارنارنج روی منحنی ریکاوری گره دهلیزی بطنی.
A1A2: مدت زمان بین دو تحریک متوالی
A2H2: مدت زمان هدایت گره ای.

گردد که این اثرات در غلظت‌های ۰/۸، ۱/۶، ۳/۲ و ۶ میلی گرم در لیتر بیشتر از سایر غلظت‌ها بود. اثرات عصاره گیاه در دو فاز بررسی شد به این ترتیب که، در غلظت‌های ۰/۸، ۱/۶، ۳/۲ میلی گرم در لیتر اثرات تحریکی مشاهده شد و در غلظت ۶ میلی گرم در لیتر اثرات مهاری عصاره گیاه دیده شد. زمان تحریک ناپذیری کارکردی از $151 \pm 1/5$ در حالت کنترل به $143/1 \pm 3/1$ میلی ثانیه در غلظت ۳/۲ میلی گرم در لیتر رسید ($P < 0.05$). ولی در غلظت ۶ میلی گرم در لیتر میزان زمان تحریک ناپذیری کارکردی و موثر به ترتیب ۵ و ۱۱ میلی ثانیه اضافه شد. عصاره بهارنارنج همچنین سبب کاهش معنی دار زمان ونکباخ از $138/8 \pm 2/1$ میلی ثانیه در حالت کنترل به $131/6 \pm 3/3$ میلی ثانیه در غلظت ۳/۲ میلی گرم در لیتر عصاره بهارنارنج شد ($P < 0.05$). در صورتی که در غلظت ۶ میلی گرم در لیتر میزان ونکباخ به صورت غیر معنی داری افزایش یافت (از $138/8 \pm 2/1$ به $141/7 \pm 3/3$ رسید). اثرات عصاره هیدروالکلی بهارنارنج اگر چه سبب کاهش پارامترهای زمان هدایت مینم، زمان هدایت ماکزیمم و زمان تحریک ناپذیری موثر (ERP) گردید ولی این تغییرات از نظر آماری معنی دار نبود (شکل شماره ۱). در نهایت با توجه به نتایج آزمایشات اولیه، چهار غلظت مختلف ۰/۸، ۱/۶، ۳/۲ و ۶ میلی گرم در لیتر جهت آزمایشات بعدی روی پروتکل فیبریلاسیون دهلیزی شبیه‌سازی شده و هدایت پنهان انتخاب شد. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که منحنی خروجی‌های گره براساس ثبت‌های متوالی از دو دسته هیس، بیانگر یک الگوی دو قله‌ای مطابق منحنی شماره ۲ است که این الگوی دو قله‌ای تحت تاثیر غلظت‌های مختلف بهارنارنج از بین نرفت. بهارنارنج در غلظت‌های انتخابی، سبب کاهش تعداد حذف گره‌ای و همچنین میانگین فاصله دو ثبت متوالی از دسته هیس

جدول شماره ۱: اثرات غلظت های انتخابی عصاره هیدروالکلی بهارنارنج روی هدایت پنهان با سرعت های مختلف (N=10)

Δ Zone of recovery(msec) CL Long (280-300)-(150-160)	Zone of recovery(msec) CL Short (150-160)	Zone of recovery (msec) CL Intermediate (180-200)	Zone of recovery(msec) CL Long (280-300)	
۲۲/۶ ± ۸/۶	۳۹/۱ ± ۱۱/۶	۲۴/۵ ± ۱۱/۳	۱۶/۴ ± ۷/۷	کنترل
۱۴/۵ ± ۶/۵*	۲۶ ± ۱۰	۱۵/۳ ± ۱۰/۲	۱۱/۵ ± ۷/۳	بهارنارنج ۰/۸ میلیگرم در لیتر
۵/۷ ± ۱/۲**	۱۴/۸ ± ۶	۹/۷ ± ۶/۲	۹/۱ ± ۶	بهارنارنج ۱/۶ میلیگرم در لیتر
۸/۵ ± ۱/۲**	۲۱/۸ ± ۱۱	۱۴ ± ۸/۸	۱۳/۳ ± ۸/۴	بهارنارنج ۳/۲ میلیگرم در لیتر

در مقایسه با کنترل *P<0.05 **P<0.001

Zone of recovery: اندازه فاصله بلاک ثبت از دسته دهلیزی ها (AA) و بلاک زمان هدایت گره ای (AH) Cycle Length : CL Long

در سرعت های (۲۸۰-۳۰۰) و (۱۵۰-۱۶۰). Zone of recovery: Δ اختلاف CL Long Zone of recovery: تمامی اعداد بر حسب Mean \pm SE بیان شده است.

Paired t-test two-tail p value: تست آماری مورد استفاده:

جدول شماره ۲: اثرات غلظت های مختلف بهارنارنج در حضور نادولول روی پارامترهای الکتروفیزیولوژیک پایه گره دهلیزی-بطنی (N=13).

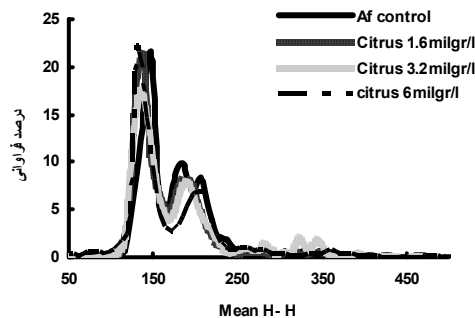
WBCL (msec)	FRP (msec)	ERP (msec)	AHmax (msec)	AHmin (msec)	
۱۴۶ ± ۵	۱۵۸ ± ۳/۷	۹۶/۷ ± ۱۲/۸	۱۴۳/۲ ± ۲۹/۳	۵۴/۲ ± ۶/۹	نادولول ۲ میکرومولار
۱۵۱/۲ ± ۳/۳*	۱۶۶ ± ۲/۸*	۹۶ ± ۱۰/۸	۱۶۲/۷ ± ۳۵/۶	۵۷/۷ ± ۵/۲	بهارنارنج ۱/۶ میلیگرم در لیتر
۱۵۹/۵ ± ۳/۱*	۱۷۱/۷ ± ۳/۳*	۱۱۰ ± ۱۳	۱۵۲/۵ ± ۲۸/۹	۵۶ ± ۷/۶	بهارنارنج ۳/۲ میلیگرم در لیتر
۱۶۴/۷ ± ۳/۳*	۱۷۷/۷ ± ۳/۲*	۱۱۲/۲ ± ۳/۴	۱۳۸/۵ ± ۶/۵	۵۸/۲ ± ۸/۷	بهارنارنج ۶ میلیگرم در لیتر

در مقایسه با کنترل *P<0.05

AHmin: زمان هدایت حداقل، AHmax: زمان هدایت حداکثر
WBCL: زمان شروع بلوک ۲:۱ دهلیزی-بطنی در طول اجرای پروتکل
ERP: زمان تحریک ناپذیری موثر (دهلیزی)
FRP: زمان تحریک ناپذیری عملکردی (بطنی)
تمامی اعداد بر حسب Mean \pm SE بیان شده است.
Paired t-test two-tail p value: تست آماری مورد استفاده:

بحث

بطور کلی نتایج این تحقیق نشان دهنده یک الگوی الکتروفیزیولوژیک وابسته به غلظت دو فازی عصاره هیدروالکلی بهارنارنج می باشد. بدین ترتیب که عصاره هیدروالکلی بهارنارنج قادر است در غلظت های پایین با یک اثر شبه سمپاتیکی، خواص محافظتی گره دهلیزی-بطنی را از طریق تغییر در خواص تحریک ناپذیری گره و تاثیر روی زمان هدایت و ناحیه پنهان بدون تاثیر روی هدایت گره ای تغییر دهد. این اثرات توسط آنتاگونیست رسیپتورهای $\beta 1$ و $\beta 2$ (نادولول) از بین رفت؛ این امر بیانگر آن است که حداقل قسمتی از اثرات عصاره هیدروالکلی بهارنارنج، از طریق سیستم سمپاتیکی روی گره دهلیزی-بطنی اعمال می شود.



شکل شماره ۲: در حالت کنترل سیگنال ها به طور عمده 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) است و قله با هدایت ۲۰۰ میلی ثانیه بیانگر هدایت در مسیر قدامی گره دهلیزی-بطنی (مسیر سریع) می باشد که بعد از اضافه نمودن غلظت های مختلف بهارنارنج سیگنال ها در هر دو قله اندکی به سمت راست شیفت کردند که این اثرات کاهنده بهارنارنج، در غلظت زیاد معنی دار بود. میانگین فاصله H-H: میانگین فاصله دو ثبت متوالی از دسته هیس

در صورتیکه در غلظت‌های بالا سبب مهار خواص گره و افزایش زمان تحریک ناپذیری می‌شود.

مهم‌ترین امتیاز تحقیق حاضر آن است که علاوه بر اجرای پروتکل‌های هدایت پنهان، ضربه پنهان و خواص پایه گره، اثرات عصاره هیدروالکلی بهارنارنج را روی منحنی فیبریلاسیون دهلیزی نیز مطالعه نمود. جواب بالینی بطن‌ها در AF به طور مشخص به صورت فواصل نامنظم بطنی ظاهر می‌شود. اگرچه دلیل اصلی این آشوب مشخص نیست ولی دو مکانیسم در ایجاد آن موثر است: ۱- پدیده هدایت پنهان در گره دهلیزی- بطنی ۲- زمان تحریک ناپذیری گره ای.

بر اساس تئوری هدایت پنهان، گره دهلیزی بطنی به مانند محل گذری است که بسته به خاصیت تحریک ناپذیری و تحریک پذیری به صورت تصادفی اجازه عبور امواج را به بطن‌ها می‌دهد. طولانی شدن فاصله دو انقباض بطنی با سوزاندن اختصاصی مسیر آهسته در انسان، بیانگر نقش مسیر آهسته در جواب بطن‌ها در طول فیبریلاسیون دهلیزی است. مطالعات مختلف در انسان نشان داده است که مسیر آهسته، مسیر غالب در کنترل ضربانات بطنی در طول فیبریلاسیون دهلیزی است. در صورتیکه سوزاندن مسیر سریع در انسان بندرت منجر به کنترل ضربانات بطن‌ها می‌شود (۱۳). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی بهارنارنج نقشی در افزایش سرعت ضربانات بطن‌ها در طول فیبریلاسیون دهلیزی ندارد ولی سبب کاهش معنی‌دار ناحیه پنهان در گره دهلیزی بطنی می‌شود. مکانیسم ایجاد ناحیه پنهان را در ارتباط با نقش مسیر آهسته می‌دانند زیرا سوزاندن مسیر آهسته سبب افزایش معنی‌دار ناحیه پنهان در گره می‌شود. بنابراین می‌توان این چنین نتیجه‌گیری کرد که به دلیل تاثیر مشخص بهارنارنج در کاهش FRP و WBCL احتمالاً این گیاه از طریق تاثیر روی مسیر آهسته اثرات خود را اعمال نموده است. اثرات عصاره هیدروالکلی بهارنارنج در غلظت‌های بالا (۶ میلی گرم در لیتر) به صورت مهار خواص پایه گره (افزایش ERP،

FRP و WBCL) ظاهر شد که این اثرات سبب شد که در منحنی ریکواری (شکل شماره ۱) هدایت در مسیر آهسته کاهش یافته و ناحیه با شیب تند منحنی ریکواری که بیانگر هدایت در مسیر آهسته گره دهلیزی- بطنی می‌باشد، از بین برود و در واقع بیانگر آن است که در غلظت‌های بالا بهارنارنج می‌تواند مانند داروهای کلسیم بلاکر و جراحی سوزاندن مسیر آهسته عمل کند و نقش محافظتی و کاهش‌دهنده تعداد ضربانات بطنی داشته باشد.

اجرای پروتکل فیبریلاسیون دهلیزی بیانگر الگوهای توزیع هدایتی دسته هیس در نمونه‌های مختلف بود (مطابق شکل شماره ۲) که با نتایج تحقیق مشابه هم خوانی دارد (۲). الگوهای دوقله‌ای به دست آمده از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که توزیع هدایتی متفاوتی در نمونه‌های مختلف به کار رفته وجود دارد. در تفسیر الگوی مشاهده شده در توزیع هدایتی منحنی فیبریلاسیون دهلیزی، توجه‌های متفاوتی به کار رفته است. این الگوهای متفاوت را نشان دهنده هدایت در مسیر آهسته و سریع می‌دانند، به صورتی که در سرعت‌های آهسته ضربانات دهلیزی، مسیر سریع و در سرعت‌های سریع، مسیر آهسته عهده دار هدایت امواج می‌باشد. بنابراین قله‌های دیده شده در هدایت‌های سریع در منحنی توزیع هدایتی بیانگر هدایت در مسیر آهسته و هدایت طولانی بیانگر مسیر سریع می‌باشد (۱۴). عصاره هیدروالکلی بهارنارنج در غلظت‌های متفاوت تنها سبب انتقال منحنی دو قلّه‌ای به نواحی با هدایت سریع شد و تغییری در الگوی هدایتی گره ایجاد نکرد. این نتایج گویای آن است که اثرات این عصاره به صورت یکنواخت و در یک الگوی شبه آدرنژیک بر گره اعمال می‌گردد. همچنین مقایسه اثرات قسمت‌های مختلف گیاه روی منحنی هدایت گره‌ای (ریکواری) تاییدکننده این مطلب می‌باشد، در صورتیکه غلظت‌های بالا عصاره بهارنارنج توانست هدایت را در مسیر آهسته تضعیف کرده و آن را به سمت هدایت در مسیر سریع منتقل کند و به همین علت زمان تحریک ناپذیری

کارکردی افزایش و زمان هدایت حداکثر کاهش یافت (شکل شماره ۱). همچنین اندازه گیری ناحیه پنهان در مطالعه حاضر نشان داد که مقادیر به دست آمده در مورد این ناحیه در خرگوش با مطالعه بوچون در سال ۲۰۰۶ مطابقت دارد (۱۵). ناحیه پنهان با استفاده از یک پروتکل اختصاصی مشخص شد، در این پروتکل اختصاصی ناحیه پنهان از طریق اعمال سرعت‌های مختلف و اندازه گیری اختلاف زمان تحریک ناپذیری بین دهلیزها و گره دهلیزی - بطنی مشخص شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که همزمان با افزایش سرعت تحریک، میزان ناحیه پنهان بصورت معناداری افزایش می‌یابد. وابسته بودن میزان ناحیه پنهان به سرعت تحریکات پایه در مطالعه آقای تالاجیک و نایب پور در سال ۱۹۸۹ نیز نشان داده شده است (۱۶). عصاره هیدروالکلی بهارنارنج سبب کاهش معنی دار ناحیه پنهان شد. با مراجعه به منحنی اثرات این گیاه روی تعداد ضربانات بطنی (میانگین فاصله H-H) کاهش در ناحیه پنهان تحت تاثیر عصاره گیاه ثابت می‌شود زیرا میانگین فاصله H-H به عنوان شاخص میزان ناحیه پنهان در گره می‌باشد و این کاهش می‌تواند سبب تندتر شدن ضربانات بطن‌ها در هنگام فیبریلاسیون دهلیزی شود. بنابراین از این نظر عصاره گیاه اثرات محافظتی چندانی در برابر حفاظت بطن‌ها ندارد، از طرف دیگر یکی از شاخص‌های اصلی در مکانیسم محافظتی گره دهلیزی - بطنی خواص تحریک ناپذیری گره دهلیزی - بطنی است که در این تحقیق عصاره گیاه توانست FRP و WBCL را کوتاه کند و بنابراین از نظر عملی کمتر شدن هر دو فاکتور، به معنی کاهش نقش گره در هنگام آریتمی دهلیزی است که می‌تواند تعداد ضربانات بطن‌ها را در هنگام آریتمی کاهش دهد.

در مطالعات مختلف اثرات اینوتروپ مثبت و شبه سمپاتیک عصاره بهارنارنج، به طور عمده روی بطن‌ها گزارش شده است (۱۷-۲۲). این اثرات را بیشتر به دلیل وجود فلاونوئیدها و گلیکوزیدهای موجود در بهارنارنج

می‌دانند (۱۹،۸،۷)، مکانیسم اثرات اینوتروپ مثبت بهارنارنج را در ارتباط با افزایش تولید ATP در میتوکندری سلول‌های قلبی، مهار پمپ سدیم - پتاسیم وابسته به انرژی (۷،۱۹،۱۷)، باز شدن کانال کلسیم و افزایش کلسیم داخل سلولی و مهار پمپ کلسیم وابسته به انرژی می‌دانند (۱۸،۱۷). در تمامی این مطالعات به اثرات اینوتروپ مثبت و شبه سمپاتیک عصاره بهارنارنج اشاره شده است. نتایج تحقیق حاضر در تائید مطالعات یاد شده بیانگر اثرات شبه سمپاتیک عصاره هیدروالکلی بهارنارنج می‌باشد. مطالعات مختلفی در ارتباط با اثرات دو فازی یا سه فازی عصاره بهارنارنج گزارش شده است. عصاره بهارنارنج در غلظت 1×10^{-1} - 4×10^{-3} gr/ml باعث باز شدن کانال‌های کلسیم L.type سلول‌های قلب کوچک و در غلظت 4×10^{-1} - 2×10^{-1} gr/ml سبب بسته شدن کانال‌های L.type کلسیم بطن قلب کوچک شد (۸). همچنین در بهارنارنج ماده‌ای به نام Murrayaquinane A وجود دارد که می‌تواند سبب اثر اینوتروپ سه فازی شود (۲۳). این نتایج با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد زیرا در تحقیق حاضر نشان داده شد که یک نقش دو فازی وابسته به غلظت، در عصاره هیدروالکلی بهارنارنج دیده می‌شود بنابراین با توجه به غلظت بالای فلاونوئید به کار رفته در بهارنارنج در تحقیق حاضر، احتمالاً می‌توان اثرات دیده شده روی خواص محافظتی گره دهلیزی - بطنی را به علت جزء فلاونوئیدی عصاره دانست. با توجه به مطالعات جدید در مورد اثرات ضد آریتمی و آریتمی زای فلاونوئیدهای موجود در مرکبات (نارنجین) و تاثیر بالای آنها در انسداد کانال‌های یونی HERG در قلب و ایجاد آریتمی سندرم QT طولانی (۲۴)، نتایج این تحقیق در ایجاد اثرات شبه سمپاتیک عصاره بهارنارنج می‌تواند دلیل دیگری بر عدم تاثیر محافظتی این گیاه در آریتمی‌های قلبی باشد. عصاره بهارنارنج می‌تواند در یک مدل وابسته به غلظت عمل کند به طوری که این عصاره در غلظت کم

ضربانات بطن‌ها در هنگام تاکی آریتمی‌های فوق بطنی ظهور پیدا کرد. مکانیسم این اثرات مهاری مشخص نشده و نیاز به تحقیقات بیشتری جهت تعیین مکانیسم اثرات آن و تعیین اثرات سلولی عصاره بهارنارنج لازم می‌باشد.

سپاسگزاری

از معاونت‌های محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و گلستان جهت تصویب و در اختیار گذاشتن اعتبار مالی جهت انجام طرح تشکر و قدر دانی می‌شود.

References

1. Chen SA, Chiang CE, Tai CT, Lee SH, Chiou CW, Ueng KC, et al. Transient complete atrioventricular block during radiofrequency ablation of slow pathway for atrioventricular nodal reentrant tachycardia. *Am J Cardiol* 1996; 77: 1367-1370.
2. Zhang Y, Mazgalev TN. Ventricular rate control during atrial fibrillation and AV node modifications: past, present, and future. *Pacing Clin Electrophysiol* 2004; 27(3): 382-393.
3. Dhein S, Tudyka T. Therapeutic potential of antiarrhythmic peptides. Cellular coupling as a new antiarrhythmic target. *Drugs* 1995; 49(6): 851-855.
4. Zargari A. Medicinal plant, seventh edition. Tehran: Tehran publication university; 1997. P 485-478.
5. Fleming T. PDR for herbal medicines. Citrus aurantium. Section edition. 2001. P 86-87.
6. Joshi S.G. Medicinal plant, First edition. New Delhi: Oxford & IBN publishing co. 2003. P 342-343.
7. Umarova F.T, Khushbactova Z.A, Batirov E.H, Mekler V.M. Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase by flavonoids and their inotropic effect. Investigation of the structure-activity relationship. *Membr Cell Biol* 1998; 12(1): 27-40.
8. Takeya K, Itoigawa M, Furukawa H. Structure-activity relationship of cardiotonic flavonoids in guinea-pig papillary muscle. *J Ethnopharmacol* 1999; 65(3): 267-272.
9. Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem* 2008; 56(15): 6185-6205.
10. Díaz-Juárez JA, Tenorio-López FA, Zarco-Olvera G, Valle-Mondragón LD, Torres-Narváez JC, Pastelín-Hernández G. Effect of Citrus paradisi extract and juice on arterial pressure both in vitro and in vivo. *Phytother Res* 2009; [Epub ahead of print].
11. Khor V, Nayeypour M, Rakhshan E, Mirabbasi A. The effect of essence of Citrus aurantium on the electrophysiological properties of isolated perfused rabbit AV-node. *J Gorgan Univ Med Sci* 2006; 8(2): 1-7.
12. D'Alonzo AJ, Zhu JL, Darbenzio RB. Effects of class III antiarrhythmic agents in an in vitro rabbit model of spontaneous torsades de

- pointe. *Eur J Pharmacol* 1999; 369(1): 57-64.
13. Blanck Z, Dhala AA, Sra J, Deshpande SS, Anderson AJ, Akhtar M, et al. Characterization of atrioventricular nodal behavior and ventricular response during atrial fibrillation before and after a selective slow-pathway ablation. *Circulation* 1995; 91(4): 1086-1094.
 14. Garrigue S.X, Mazgalev T.N. Role of the AV Nodal inputs for Modulation of the ventricular Rate during atrial fibrillation. In: *Atrial-AV Nodal Electrophysiology: A view from the M: llnennium*. Mazgalev T.N, Tchou. P.J. Futur a publishing company Armonk. NY 2000; 269-273.
 15. Xu B, Billette J, Lavallée M. Concealed conduction in nodal dual pathways: depressed conduction, prolonged refractoriness, or reset excitability cycle? *Heart Rhythm* 2006; 3(2): 212-221.
 16. Talajic M, Nayebpour M, Jing W, Nattel S. Frequency-dependent effects of diltiazem on the atrioventricular node during experimental atrial fibrillation. *Circulation* 1989; 80(2): 380-389.
 17. Bruni A, Carpenedo F, Santi R. Inhibition by quercetin of magnesium-, sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase. *Br J Pharmacol* 1968; 34(3): 673P-674P.
 18. Shoshan V, Campbell KP, MacLennan DH, Frodis W, Britt BA. Quercetin inhibits Ca²⁺ uptake but not Ca²⁺ release by sarcoplasmic reticulum in skinned muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77(8): 4435-4438.
 19. Hirano T, Oka K, Akiba M. Effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on Na⁺, K⁺-ATPase: aspects of the structure-activity relationship and action mechanism. *Life Sci* 1989; 45(12): 1111-1117.
 20. Wu J, Yu XJ, Li XG, Liu D. Electrophysiologic effects of total flavones of *Hippophae rhamnoides* L on guinea pig papillary muscle and cultured rat myocardial cells. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1994; 15(4): 341-343.
 21. Chen X, Liu LY, Deng HW, Fang YX, Ye YW. [The effects of *Citrus aurantium* and its active ingredient N-methyltyramine on the cardiovascular receptors (author's transl)] *Yao Xue Xue Bao* 1981; 16(4): 253-259.
 22. Itolgawa M, Takeyak furukawa H. Cardiogenic flavonoids from citrusplants (Rutaceae) *Biol pharm Bull* 1994; 17(11): 1519-1521.
 23. Takeya K, Itoigawa M, Furukawa H. Triphasic inotropic response of guinea-pig papillary muscle to murrayaquinone-A isolated from Rutaceae. *Eur J Pharmacol* 1989; 169(1): 137-145.
 24. Zitron E, Scholz E, Owen R.W, Luck S, Kiesecker C, Thomas D, et al. QTc prolongation by grapefruit juice and its potential pharmacological basis: HERG channel blockade by flavonoids. *Circu* 2005; 111(7): 835-838.