نقش آنزیم سازنده نیتریک اکسید در خواص ضدآریتمی زعفران (Crocus Sativus) بر گره دهلیزی- بطنی قلب جدا شده خرگوش

دکتر وحید خوری*- دکتر محسن نایب پور**- الناز رخشان*** عباس میر عباسی***

*دانشیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات قلب وعروق گلستان، دانشکده پزشکی فلسفی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

**دانشیار فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی دانشکده داروسازی تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران

***دانشجوی پزشکی مرکز تحقیقات قلب وعروق گلستان، دانشکده پزشکی فلسفی دانشگاه علوم پزشکی گلستان

تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/۳/۲۸

تاریخ پذیرش: ۸۶/۱/۱۸

چکیده

مقدمه: اکسید نیتریک به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم قادر است خواص الکتروفیزیولوژی قلب را متأثر کند. از طرف دیگر آنزیم‌های سازنده اکسید نیتریک در گره دهلیزی- بطنی نشان داده شدند. بررسی‌های مختلف نشانگر اثر کاهنده فشار خون و ضد ایسکمی زعفران است.

هدف: تعیین اثرات عصاره هیدرو الکلی زعفران بر خواص پایه و کارکردی گره دهلیزی- بطنی و نقش نیتریک اکسید در مکانیسم اثرات زعفران

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی خرگوش‌های نر نژاد نیوزیلندی با روش پرفوزیون گره دهلیزی- بطنی ایزوله در شرایط آزمایشگاهی مناسب و در ۳ گروه جداگانه بررسی شدند. در گروه اول(N= ۲۰) به صورت قبل و بعد، عصاره هیدرو الکلی گیاه زعفران (Crocus sativus) با غلظت 19×10^{-2} mg/l برای بررسی خواص الکتروفیزولوژی گره دهلیزی- بطنی خرگوش مورد مطالعه قرار گرفت. در گروه دوم زعفران در حضور l-name با غلظت ۷۵ میکرومول(N=۶) و در گروه سوم وراپامیل ۰/۱ میکرومول(N= ۶) آزمایش شدند. متغیرهای اصلی در این آزمایش شامل زمان هدایت دهلیزی-گره‌ای، ونکباخ و زمان تحریک ناپذیری مؤثر وکارکردی بودند. تغییر متغیرهای فوق به صورت فعال و دیجیتال با بورد آنالوگ به دیجیتال و با نرم افزار(AV node pack) اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج نشانگر اثرمهارکننده عصاره هیدرو الکلی زعفران بر پارامترهای الکتروفیزولوژی پایه(زمان هدایت دهلیزی-گره‌ای، ونکباخ و زمان تحریک ناپذیری کارکردی) و کارکردی(تسهیل و خستگی) گره دهلیزی- بطنی است. به‌طوریکه زمان هدایت دهلیزی-گره ای از ۴±۳۲/۴ به ۴±۴۱/۷ و زمان FRP از ۳±۱۵۷/۶ به۴±۱۶۳/۷ میلی ثانیه افزایش معنی‌دار نشان داد. همچنین میزان تسهیل از ۰/۹ ±۶/۲ به ۱/۱±۹/۸ و میزان خستگی از ۰/۳ ± ۵/۹ به ۱±۱۱/۱ افزایش معنی‌دار داشت. مهارکننده آنزیم NOS (L-Name) اثر زعفران را بر زمان هدایت گره دهلیزی-گره ای و تحریک ناپذیری کارکردی از بین می‌برد.

نتیجه گیری: عصاره هیدرو الکلی زعفران با افزایش زمان هدایت و تحریک نا پذیری کارکردی می‌تواند به عنوان داروی ضد آریتمی بکار رود. مکانیسم اثر این گیاه حداقل در بخشی از مسیر نیترینرژیک اعمال می‌شود.

کلید واژه‌ها: آریتمی/ اکسید نیتریک/ زعفران/ گره دهلیزی بطنی

مقدمه

ترکیب‌های بیولوژی با منشاء گیاهی شاخه مهمی از درمان‌های دارویی محسوب می‌شود. در بسیاری موارد داروهای با منشاء گیاهی ارزان‌تر هستند و با عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی همراهند(۱). درمان‌های گیاهی برای نارسایی احتقانی قلب، فشارخون بالا، آنژین صدری، ایسکمی قلب و آریتمی موجود است(۲). سابقه تجویز دیژیتال از گیاه گل انگشتانه به بیش از صد سال می‌رسد یا کینیدین در درمان فیبریلاسیون دهلیزی توسط لویس و ویکو در اوایل دهه ۱۹۹۰ بکار رفت(۳).

زعفران Crocus sativus گیاهی چند ساله و کم ارتفاع است، برگ‌های آن دراز و خطی به رنگ سبز زیبا به طول حدود ۱۰ سانتی‌متر است که مستقیماً از یک پیاز که غده زیرزمینی زعفران است خارج می‌شوند. زعفران در آب و هوای گرم بهتر رشد می‌کند. در کشمیر هندوستان و در ایران در بخش‌هایی از خراسان و قائنات و برخی مناطق دیگر کاشته می‌شود(۵و۶). از ترکیب‌های موجود در اسانس روغنی زعفران، می‌توان ازکروسین، سافرانول و فلاونال نام برد(۵و ۷).

تأثیر قلبی زعفران در رساله ادویه قلبیه فیلسوف ایرانی

نویسنده مسئول: دکتر وحید خوری؛ گلستان- دانشکده پزشکی فلسفی - مرکز تحقیقات قلب وعروق گلستان

vaph99@yahoo.com

بوعلی سینا شرح داده‌شده‌است.حکیم احمدالله خان ترجمه‌ی کتاب را به نام تفریح القلوب چاپ کرد و در مورد زعفران از قول بوعلی‌سینا می‌نویسد:" حار در ثانیه و یابسه در اولی است با قبض و تحلیل و انضاج که تابع ان هر دو بود و در تقویت جوهر روح و تفریح او خاصیت عظیمه دارد"(٤).

گزارش‌هایی از خاصیت ضدفشارخون و ضدایسکمی زعفران وجود دارد(٨و٩). در مطالعه فاتحی عصاره هیدروالکلی و آبی زعفران توانست سبب کاهش فشار خون در موش‌های صحرائی شود. همچنین عصاره آبی زعفران توانست تأثیر اپی نفرین(١ میکرو مولار) را در افزایش انقباض ماهیچه وازودفران موش صحرائی از بین‌ببرد(٨). در بررسی قبلی ما اثر عصاره آبکی زعفران مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج آن، دال بر خاصیت کاهش‌دهنده به‌صورت افزایش زمان هدایت و زمان تحریک‌ناپذیری کارکردی و ونکباخ و خستگی در مدل وابسته به غلظت وزمان و غیر وابسته به سرعت عمدتاً بر مسیر سریع گره دهلیزی-بطنی بود(٢٥).

نیتریک اکساید با غلظت بالا در سلول‌های قلبی وجود دارد و آنزیم‌های سازنده نیتریک اکساید(NOS)؛ هر دو نوع اندوتلیال(eNOS) و قابل القاء(iNOS) در گره دهلیزی-بطنی یافت شده‌است(٢٢). نیتریک اکساید قادر است واسطه نقش مهاری آدنوزین بر جریان کلسیم درسلول‌های β گره دهلیزی-بطنی خرگوش شود(٢٣). در واقع متعاقب تأثیر آدنوزین، آزاد شدن NO و مهار کانال کلسیم صورت گرفته‌است(٢١). کروستین که ترکیبی از زعفران است توانسته ساخت mRNA مسئول تولید آنزیم‌های سازنده نیتریک اکساید را در کبد موش مهار کند(٢۴).

تا کنون کمتر مطالعه‌ای بوده که اثر زعفران ونقش سیستم نیترینرژی آن را بر خاصیت الکتروفیزیولوژی گره دهلیزی- بطنی و نقش ضد آریتمی یا آریتمی‌زای آن بررسی نکرده باشد.

مواد و روش‌ها

عصاره گیری زعفران:

زعفران(Sativus Crocus) ازنمونه تجارتی و کشت شده در استان خراسان تهیه شد. نمونه‌ها بعد از تشخیص و تعیین گونه(هر باریومر دانشگاه علوم پزشکی مشهد) به‌صورت پودر(تهیه شده توسط شرکت نوین زعفران) از الک با مش ٣ میکرون عبور داده شد و پس از افزودن آب مقطر ٦٠ درجه سانتیگراد(٠/١) به مدت ٤ روز در تاریکی قرار داده شده و هر روز هم زده می‌شد. محلول حاصل با استفاده ازپالایه فیلتر، صاف شده و در دستگاه روتاری در خلاء در حرارت ٣٠ تا ٤٠ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. درصد استخراج ٥ و غلظت عصاره هیدروالکلی ٥٦ بود. آنالیز عصاره زعفران در دستگاه HPLC و ستون ODS و دتکتور UV با طول موج ٣٠٨ نانومتر وجود اسانس سافرانول٥/٠٩٪ را در آن نشان داد. تمام مراحل جمع‌آوری، عصاره‌گیری و تعیین مقدار در بخش تحقیق و توسعه شرکت نوین زعفران انجام شد.

آزمایش‌های فارماکولوژی:برای آزمایش، از خرگوش‌های نر نژادنیوزیلندی در محدوده وزنی٢-١/٥ کیلوگرم استفاده شد.پس از پیش درمانی با هپارین(5mg/kg/IV) و پنتوباربیتال سدیم (٣٥mg/kg/IV)، آنها را بیهوش کرده و سپس با ضربه‌ای به پشت سر کشته و پس از باز کردن قفسه سینه و جدا کردن قلب، گستره بافتی شامل دهلیز راست نواحی گره دهلیزی- بطنی و سپتوم بین بطنی را از آن جدا کردیم. آنگاه آنها به کمک سوزن‌هایی بر روی توری داخلی تیرود در مدار داخلی ثابت شده و توسط محلول تیرود به‌طور پیوسته با سرعت ٢٠٠ میلی‌لیتر در دقیقه تغذیه می‌شدند. تمام اصول اخلاق طبق اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی گلستان انجام شد. پرفیوژن کرونر با کانولی با فشار٨٠-٧٠ میلی‌لیترجیوه به صورت

جریان ۱۲-۱۰ میلی لیتر در دقیقه بر قرار شد. جریان نواحی گره سینوسی- دهلیزی و دسته هیس توسط الکترود دو قطبی ثبت شد. پایه قلب را مشخص کرده، سپس به کمک الکترود تحریکی درحاشیه گره سینوسی دهلیزی در دهلیز راست، قلب را با سرعتی بالاتر از سرعت پایه تحریک کردیم. بعد از تطبیق قلب با محیط جدید(حداقل به مدت یک ساعت) با و بدون تجویز دارو تحریک را تکرارکرده و نتایج را مقایسه کردیم. بافت از دو طریق در یک مدار بسته توسط پمپ پریستالتیک‌پیوسته با محلول تیروداکسیژنه بااکسیژن۹۵٪ و دی‌اکسیدکربن۵٪ در حرارت۱/۰±۳۷ درجه‌سانتیگراد و ۰/۱ ±۷/۴ =pH با حجم ۶ لیتر تغذیه می‌شد. ترکیب محتوای محلول بر حسب میلی‌مول شامل: (mM/L):

NaCl (۱۲۸), KCl (۴/۷) , CaCl2(۲), MgCl2(۱), aHCo3,(۲۵), NaH2Po4 (۰/۷), Dextrose (۱۱/۱)

بود.

راهکارهای تحریکی:

مفاهیم پایه عبارتند از :

طول چرخه پایه (Basic cycle length = BCL) : طولانی‌ترین فاصله دو تحریک متوالی است که در خلال آزمایش بر نمونه وارد می‌شود و معمولاً ۵۰-۳۰ ثانیه سریع‌تر از ضربان خودبخودی قلب تعیین می‌شود.

چرخه نارس(Premature cycle): ضربانی است که وضعیت گره در هر موقعیت نسبت به آن سنجیده می‌شود و می‌تواند از فاصله تحریکی خیلی زیاد (BCL) تا خیلی کم (AV-ERP) در نوسان باشد.

شاخص ونکباخ (Wenckbach cycle length) : بلوک درجه سوم دهلیزی - گره‌ای ناشی از افزایش در سرعت تحریک دهلیزهاست و شروع بلوک به عنوان زمان ونکباخ ثبت می‌شود.

پروتکل بازیابی (Recovery): پس از ۱۰ تحریک پایه (BCL)، یک تحریک نارس(آزمایشی) بر بافت اعمال شده و پاسخ آخرین تحریک پایه نسبت به تحریک تأخیری به صورت فاصله A2H2 (زمان هدایت) در برابر A1A2 (زمان ریکاوری) رسم می‌شود. هنگامی که یک تحریک تاخیری به گره دهلیزی - بطنی وارد می‌شود، گره تحریک فوق را حس کرده و به صورت افزایش در زمان هدایت و کاهش در مدت ریکاوری پاسخ می‌دهد، بتدریج با پیشرفت پروتکل هرچه فرکانس تحریک نارس بیشتر باشد ، زمان هدایت طولانی‌تر می‌شود تا سرانجام گره دهلیزی - بطنی از هدایت موج تحریکی ناتوان شده(زمان تحریک ناپذیری موثر) و از دسته هیس موجی ثبت نمی‌شود.

زمان تحریک‌ناپذیری مؤثر (Effective refractory period =ERP) : طولانی‌ترین فاصله دو ثبت متوالی ازدهلیزها (A1A2) قبل از رسیدن به بلوک دهلیزی- گره‌ای.

زمان تحریک نا پذیری کارکردی (Functional refractory period =FRP): کوتاه‌ترین فاصله دو ثبت متوالی از دسته هیس(H1H2) که در طی یک پروتکل تحریکی به دست می‌آید.

قلب‌ها، قبل از شروع آزمایش باید از نظر جریان عروق کرونر، زمان انتقال دهلیزی - گره‌ای و شاخص ونکباخ دست کم به مدت۳۰ دقیقه پایدار شده‌باشند.

در صورت تغییر معنی‌دار در هر یک از پارامترهای مذکور، آن قلب کنار گذاشته می‌شد. پروتکل و نکباخ به عنوان شاخص پایداری الکتروفیزیولوژی قلب در طول آزمایش در نظر گرفته شد. این پروتکل پیش و پس از افزودن دارو و در انتهای آزمایش بعد از شستشوی قلب اجرا می شد. میانگین تغییر از ۲±۷/٤ میلی ثانیه نباید تجاوز می‌کرد.

بر اساس آزمایش‌های مقدماتی، اثر عصاره گیاه بر زمان ونکباخ، زمان هدایت گره ای و تعداد ضربان قلب، آزمایش شد. عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت mg/l ۱۹×۱۰^{-۲} برای آزمایش بعدی انتخاب شد. طراحی آزمایش شامل مراحل کنترل و تجویز دارو در ۳ مجموعه به‌صورت جداگانه بود؛ در مرحله کنترل،

پروتکل‌های تحریکی در حضور تیرود انجام شد، سپس در سری اول، عصاره هیدروالکلی زعفران(غلظت mg/l ۱۹×۱۰^{-۲}) به مدار اضافه گردید که به مدت حداقل ۵۰ دقیقه در تماس با قلب قرار گرفت(N=۲۰). در سری دوم غلظت، mg/l ۱۹×۱۰^{-۲} در حضور مهارکننده اختصاصی آنزیم NOS (L-Name) با غلظت ۷۵ میکرومول بررسی شد(N= ۶). کلیه این مراحل در سری سوم در مورد وراپامیل(۰/۱ میکرو مولار) تکرار شد(N= ۶). برای رقیق‌کردن عصاره هیدروالکلی زعفران از حلال تیرود استفاده شد. تمام نتایج با میانگین± خطای استاندارد نشان داده شده است. برای مشخص‌کردن توزیع نرمال و غیرنرمال داده‌ها، از آزمون بارتلت و نرم افزار spss استفاده شد و برای مقایسه بین‌گروه‌کنترل‌ودارو، آزمون Wilcoxon Signed Ranks بکار رفت. آنالیز منحنی‌های غیرخطی نیز با کمک نرم‌افزار Statgraph و روش Marquardt انجام شد.

نتایج

عصاره هیدروالکلی زعفران با غلظت mg/l ۱۹×۱۰^{-۲} باعث تخفیف پارامترهای پایه و وابسته به سرعت گره می‌شود(جدول۱ و شکل ۱). همچنین الگوی وابسته به زمان تاثیر این عصاره پس از حدود ۴۵ دقیقه ظاهر شده و بتدریج در یک محدوده زمانی ۹۰ دقیقه‌ای به حداکثر می رسد.

زمان هدایت حداقل (AHmin) به صورت معنی‌دار افزایش یافت(P< ۰/۰۵). در صورتیکه زمان هدایت حداکثر (AHmax) افزایش غیر معنی داری نشان داد(P> ۰/۰۵). همچنین آنالیز منحنی ریکاوری با استفاده از مدل تک توانی (Mono Exponential) نشان‌دهنده افزایش غیر معنی دار منحنی زمان ثابت ریکاوری (τ) است(P> ۰/۰۵) و مربوط به تاثیر غیروابسته به سرعت گیاه است(جدول۲وشکل۲).

بنابراین نتایج نشانگر اثر غیروابسته به سرعت عصاره زعفران و تاثیر تقریباً یکنواخت آن در سرعت های پایین و بالای تحریک قلب است. این اثر به صورت انتقال به سمت بالای منحنی ریکاوری تظاهر کرد. همچنین غلظت mg/l ۱۹×۱۰^{-۲} سبب افزایش معنی دار WBCL (از ۱۴۱/۴±۴ به۱۴۸/۷±۵) و FRP(از۱۵۷/۶±۳ به ۱۶۳/۷±۴) و کاهش در زمان تحریک‌ناپذیری مؤثر می‌شود(شکل۳).

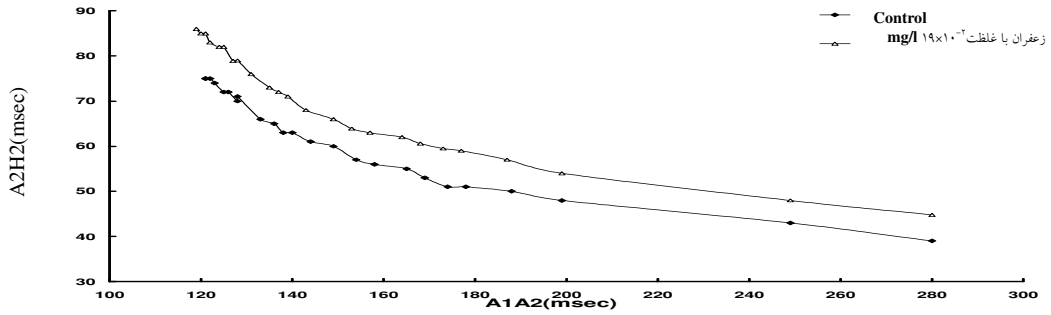
در حضور L-Name با غلظت ۷۵ میکرومول اثر تخفیفی زعفران کاهش چشمگیری یافت که به صورت افزایش غیرمعنی‌دار در زمان هدایت دهلیزی گره‌ای و WBCL بود(جدول۱).

نتایج حاصل از افزودن وراپامیل با غلظت ۰/۱ میکرومولار نشان‌دهنده این نکته است که این غلظت سبب افزایش معنی‌دار در شاخص های زمان هدایت دهلیزی- بطنی، زمان تحریک ناپذیری مؤثر، زمان تحریک‌پذیری کارکردی و ونکباخ می‌شود. عصاره الکلی زعفران در مقایسه با وراپامیل اثر مهاری کمتری ایجاد کرده به عنوان مثال، اثر تخفیفی عصاره زعفران(غلظت mg/l ۱۹×۱۰^{-۲}) بر پارامتر زمان هدایت دهلیزی - گره‌ای، ۱۱/۶٪وراپامیل است. مقایسه عصاره هیدروالکلی زعفران با وراپامیل نشان داد که با تاثیر این گیاه، زمان هدایت دهلیزی- بطنی، ونکباخ و زمان تحریک ناپذیری کار کردی در مقایسه با غلظت ۰/۱ میکرومولار وراپامیل افزایش می‌یابد ولی این افزایش فوق قابل توجه نیست(جدول ۱). به هر حال وراپامیل توانست رفتار وابسته به سرعت از خود نشان دهد(جدول۱).

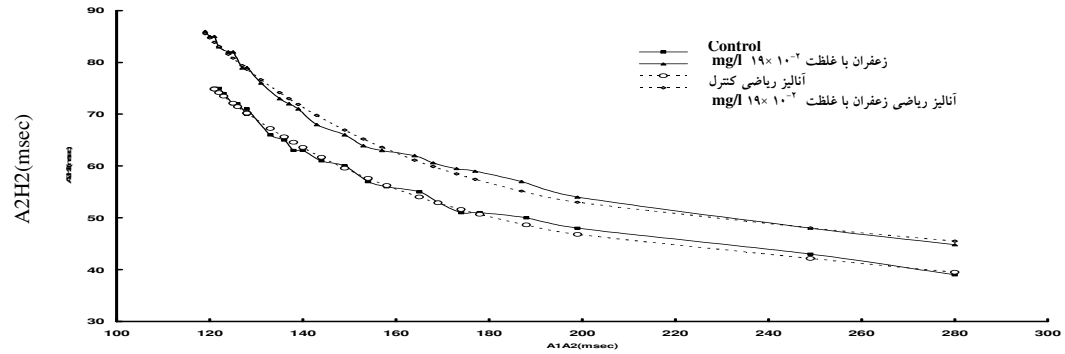
عصاره زعفران سبب افزایش معنی‌دار میزان تسهیل از ۰/۹ ± ۶/۲ به ۹/۸±۱/۱ و همچنین اجرای پروتکل خستگی در حضور عصاره الکلی زعفران سبب افزایش میزان خستگی شد، به‌طوری‌که با غلظت mg/l ۱۹×۱۰^{-۲} افزایش معنی‌دار در میزان خستگی از ۵/۹±۰/۳ به ۱۱/۱±۱ بوجود آمد(شکل۴). در حضور L-Name اثر

مهاری عصاره هیدروالکلی زعفران بر میـزان تسـهیل و خستگی از بین رفت. به‌طـوری‌کـه میـزان خسـتگی از ۱۲/۵±۱/۹ به ۱۲/۸±۲ تغییر غیرمعنی‌داری یافت که در مقایسه با گروه اول کاهش چشـمگیری داشـته اسـت.

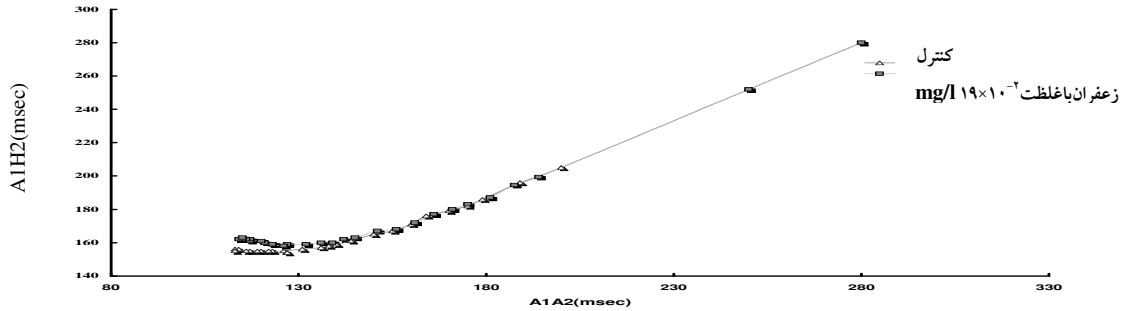
L-Name بتنهایی به‌صورت رابطه وابسته به غلظت‌سبب دپرسیون اثر پایه گره دهلیزی – بطنی شد. به‌طوری‌کـه با غلظت۱۰۰میکرومولار زمان هدایت وتحریک‌ناپذیری کارکردی و ونکباخ را افزایش داد(جدول۳).



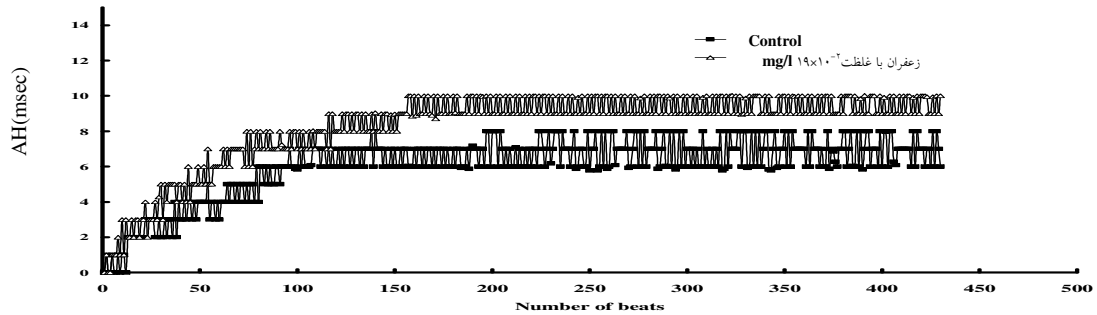
شکل۱: ثرات غلظت ۱۹×۱۰-۲ mg/l عصاره هیدرو الکلی زعفران برروی منحنی ریکاوری سبب شیفت به سمت بالامنحنی ریکاوری شده است.



شکل۲: متد regression fitting nonlinear با استفاده از تکنیک Marquardt که نشاندهنده دقت داده های به دست آمده و تطابق آن با آنالیز ریاضی منحنی ریکاوری است.



شکل۳:اثرات غلظت غلظت ۱۹×۱۰⁻² mg/l عصاره هیدروالکلی زعفران برروی منحنی تحریک ناپذیری گره دهلیزی بطنی. زعفران سبب افزایش در زمان تحریکناپذیری کارکردی می شود.



شکل٤: اثرات غلظت ۱۹×۱۰⁻² mg/l عصاره هیدروالکلی‌زعفران در افزایش خستگی(AH). زعفران سبب افزایش خستگی‌می‌شود.

جدول۱: اثرات عصاره هیدروالکلی زعفران بر روی پارامترهای پایه گره دهلیزی بطنی در مقایسه با کنترل *P<0.05, **P<0.01

		AH	ERP	ERP	WBCL
زعفران 19×10^{-2} mg/l	کنترل	۳۸/۸±٤	۱۲۲/٦±٦	۱۵۷/٦±۳	۱٤۱/٤ ±٤
	مورد	٤۱/۷±٤**	۱۲۱/۳±٦	۱٦۳/۷±٤*	۱٤۸/۷±٥**
زعفران 19×10^{-2} mg/l در حضور 75µ Molar L-name	کنترل	٤٦±۸	۱۱٦/۳±۱٦	۱٦۳/۳±٤	۱٥٥/۳±۳
	مورد	٤٦/۳±۹	۱۱٤/٦±۱٦	۱٦۸/۳±۱	۱٥٦±۳
وراپامیل ۰/۱ µ Molar	کنترل	٤۲	۱۰۸	۱٦۰	۱٤۳
	مورد	٦۷	۱۳۹	۲۱۳	۲۲٥
Δ وراپامیل ۰/۱ µ Molar		٪۱۱/٦	٪۰	٪۱۱/٥	٪٦/٤

ERP: زمان تحریک ناپذیری موثر WBCL: زمان ونکباخ FRP: زمان تحریک ناپذیری کارکردی

Δوراپامیل: اختلاف اثرات وراپامیل با غلظت 19×10^{-2} mg/l زعفران بر حسب درصد

جدول۲: اثرات غلظت 19×10^{-2} mg/l عصاره هیدرو الکلی زعفران بر روی پارامترهای منحنی ریکاوری در مقایسه با کنترل *P<0.05, **P<0.01

		AH min	AH max	τ rec
زعفران $9/3\times10^{-2}$ mg/l	کنترل	۳۲/۸±۳/۲	۸/۸±۷٥/٦	۲۹/۸±٥/٦
	مورد	۳/٥ ±۳٤/۳*	۷/۳±۷۸	٤/٦±۳۱/۱

AH min: حداقل میزان هدایت در سرعت های آهسته ضربانات قلبی AH max: حداقل میزان هدایت در سرعت های سریع ضربانات قلبی

τ rec: زمان ثابت منحنی ریکاوری

جدول۳: اثرات غلظت ۱۰۰میکرو مولارL-Name بر روی متغیرهای پایه. L-Name سبب افزایش میزان AH,WBCL,ERP,FRP شده است. تمامی اعداد بر حسب Mean±SE بیان شده است (n=٦).

دارو	AH(msec)	AHmax (msec)	AH min(msec)	WBCL (msec)	ERP (msec)	FRP (msec)
کنترل	٤۱/٤±۲/۳	٤/٦±۱۱۰	۰/٥±۳۹/٦	۲±۱٤٥/۲	٤/٤±۱۰۷/٥	۲±۱٦۲/۲
l-Name (100Mm)	۲/۹±٤۳/۷	٤/۸±۱۱٥/۱	۳/۸±٤۲/۹	٤/٦±۱٥۱/۸	٦/۷±۱۱٤/۸	٥±۱۷۱/۸
P	۰/۳	۰/۲	۰/۱	۰/۰٥	۰/۱	۰/۰٥

AH=زمان هدایت گره دهلیزی بطنی AHmax=حداکثر زمان هدایت گره دهلیزی بطنی AHmin=حداقل زمان هدایت گره دهلیزی بطنی

WBCL=زمان شروع بلوک۲:۱ دهلیزی-بطنی در طول اجرای پروتکل WBCL ERP= زمان تحریک ناپذیری موثر (دهلیزی)

FRP=زمان تحریک ناپذیری عملکردی (بطنی)

با توجه به توزیع غیر نرمال داده ها از تست ویلکوکسون ($p<0.05$) جهت مقایسه بین گروه های کنترل و مورد استفاده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

بطور کلی نتایج این تحقیق نشان‌دهنده اثر تخفیفی عصاره هیدروالکلی زعفران بر پارامترهای پایه و کارکردی گره دهلیزی- بطنی خرگوش است. این تاثیر در یک مدل وابسته به مسیر گره ای وغیر وابسته به سرعت اعمال می‌شود. بررسی‌های اخیر نشان داده اند که منحنی هدایت گره دهلیزی- بطنی از دو قسمت کاملاً مجزا تشکیل شده است: قسمت صاف منحنی در ضربان آهسته دهلیزی نشان دهنده هدایت در مسیر سریع و قسمت با شیب تند در ضربان سریع دهلیزی نشانگر هدایت درمسیر آهسته است(۱۰). در شکل یک،

اثر تخفیفی عصاره زعفران بر مسیر سریع (قسمت ابتدای منحنی) نسبت به مسیر آهسته (شیب تند منحنی) دیده می‌شود. افزایش معنی دار مقدار هدایت حداقل (AHmin) منعکس‌کننده اثر بر مسیر سریع(سلول‌های ترانزیشنال قسمت قدامی گره فشرده) است، در حالی‌که که افزایش غیرمعنی‌دار زمان هدایت حداکثر (AHmax) و کاهش غیر معنی دار در زمان ERP به مفهوم نداشتن تاثیر عصاره گیاه بر مسیر آهسته و سلول‌های ترانزیشنال قسمت خلفی گره است. همچنین نداشتن تاثیر عصاره زعفران بر افزایش معنی دار زمان ثابت ریکاوری نشانگر تأثیر غیروابسته آن به سرعت است.

مطالعات قبلی نشان داده‌ند که خواص الکتروفیولوژی کانال‌های یونی در سلول‌های‌فشرده‌گره (Compact node) تعیین کننده خواص تحریک‌ناپذیری، کارکردی و ونکباخ است(۱۱). بنابراین زعفران با تأثیر بر سلول‌های فشرده گره سبب افزایشWBCL و FRP می‌شود.

گره دهلیزی- بطنی(AV-node) مرکز کنترل سرعت ضربان بطن در تاکی‌آریتمی‌ست(۱٤). مکانیسم تأخیر در هدایت امواج در طول گره دهلیزی-بطنی هنوز شناخته نشده است(۱۱). در مدل کارکردی (Functional) علت این تاخیر نقش اختصاصی سه رفتار الکتروفیزیولوژی ویژه گره شامل ریکاوری، تسهیل و خستگی دانسته شده است. این رفتارها تحت تاثیر عوامل خارجی و ذاتی خود گره قرار می‌گیرند. بنابراین با درک سازوکار این پدیده ها می‌توان اثر ضدآریتمی مواد درون زا و داروها را تشخیص داد(۱٤).

تأثیر زعفران بر افزایش خستگی می‌تواند تأییدکننده نقش این گیاه در جلوگیری از آریمتی تلقی شود. در پروتکل خستگی، نمونه بافت با سرعت‌های مختلف، مشابه تاکی‌آریتمی فوق بطنی تحریک می‌شود. افزایش خستگی نشانه کاهش تحریک‌پذیری سلول‌های دیستال گره و افزایش نقش محافظتی گره دهلیزی- بطنی می‌باشد. با توجه به آنکه مطالعات قبلی بیانگر نقش سلول‌های ترانزیشنال قسمت پروگزیمال گره در مکانیسم ایجاد تسهیل بوده است(۱۲)، می‌توان احتمال تاثیر عصاره هیدروالکلی زعفران بر بخش پروگزیمال یا ابتدایی گره را مطرح کرد. در حالی‌که خستگی را به علت زمان تحریک ناپذیری طولانی سلولهای کامپکت نود در قسمت دیستال گره دهلیزی-بطنی میدانند(۱۱). افزایش خستگی بیانگر تاثیر عصاره هیدروالکلی زعفران در قسمت دیستال و بر روی سلولهای گره‌ای(N) در قسمت کامپکت نود میباشد،مهار پمپ سدیم-پتاسیم وابسته به انرژی را نیز به عنوان مکانیسم محتمل خستگی مطرح میکنند(۱۱)، بنابراین ممکن است زعفران با مهار این پمپ سبب افزایش خستگی شده باشد. مکانیسم ایجاد تحریک ناپذیری در سلولهای گره دهلیزی بطنی همچنان ناشناخته باقی مانده است(۱٤). نقش جریانهای کلسیم و سدیم و پتاسیم در ایجاد تحریک‌ناپذیری در سلول‌های گره دهلیزی بطنی مطرح می‌باشد(۱٦). با توجه به اثرات مهاری عصاره زعفران میتوان اثرات این گیاه را بر روی جریانهای فوق الذکر محتمل دانست.

شواهد زیادی نشان‌دهنده ارتباط قطعی نیتریک اکسید و گره دهلیزی- بطنی از نظر آناتومی و کارکرد است(۱۸-۱۵). غلظت بالایی از نیتریک اکساید در میوسیت‌ها وجود دارد(۱۵، ۱٦و۱۹). در اثبات سنتز و متابولیسم آن در قلب این نکته قابل تأمل است که غلظت آن در آسیب‌های مختلف قلب بخصوص ایسکمی، آریتمی و بالارفتن تعداد ضربان قلب افزایش می‌یابد(۱۵و۱٦). همچنین حداقل قسمتی از تأثیر آدنوزین بر گره دهلیزی- بطنی در افزایش زمان هدایت و زمان تحریک‌ناپذیری از مسیر نیتریک اکسید اعمال می‌شود(۲۰).

نتایج این تحقیق نشان داد که تأثیر عصاره هیدروالکلی

زعفران حداقل از مسیر نیتریک اکسید در گره دهلیزی- بطنی اعمال می‌شود. همچنین مهارکننده اختصاصی آنزیم NOS (L-Name) توانست به تنهایی اثر کاهنده بر گره داشته باشد که ممکن‌ست مربوط به تأثیر ذاتی خود مهارکننده باشد که در بررسی‌های قبلی نیز به آن اشاره شده است(۲۱). با توجه به سنتز و متابولیسم NO و تأثیر واسطه ای NO در مکانیسم اثار آدنوزین می‌توان این احتمال را مطرح کرد که عصاره هیدروالکلی زعفران با افزایش نیتریک اکسید اثر تخفیفی خود را بر گره دهلیزی- بطنی اعمال می‌کند.

این تحقیق برای اولین بار توانست نقش عصاره هیدروالکلی زعفران را از مسیر نیترینرژی در مکانیسم محافظتی گره دهلیزی بطنی در برابر آریتمی‌های فوق بطنی نشان دهد، نتایج نشانگر اثرات اختصاصی گیاه در سلولهای ناحیه فوقانی و انتهایی گره است که به‌صورت افزایش غیروابسته به سرعت پارامترهای پایه و کارکردی (تسهیل و خستگی) ظاهر می‌شود.

تحقیق بیشتری برای شناخت مکانیسم سلولی عملکرد زعفران و تأثیر سیستم‌های آدرنرژیک، کلی‌نرژیک و نیترینرژیک برعملکرد زعفران لازم است.

تشکر وقدردانی: ازمدیریت و بخش تحقیق و توسعه شرکت نوین زعفران برای تهیه عصاره و آنالیزدستگاهی عصاره زعفران قدردانی می‌کنیم.

منابع

1. .Petkov V, Manlov P. Pharmacological Studies on Substances of Plant Origin With Coronary Dilatating and Antiarrhythmic Action. Comp Med East West 1978; Vol, N: 131- 135.

2. Nick H, Ma Shour, George I, Lin MD, William H, Frishman MD. Herbal Medicine for the Treatment of Cardiovascular Disease. Archive of Internal Medicine.1998:158,9.

3. 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.

۴- خان احمدالله : تفر یح‌القلوب . ترجمه رساله ادویه قلبیه شیخ ابوعلی سینا . چاپ اول ، مشهد؛ انتشارات آستان قدس رضوی، ۱۳۷۸، صص:۱۷۰-۱۶۰.

۵- زرگری، علی: گیاهان دارویی .جلد اول . چاپ هفتم. تهران؛ انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۶، صص: ۴۷۸-۸۵ .

۶- میرحیدر، حسین : معارف گیاهی (کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان) .جلد دوم . چاپ اول.تهران؛ دفتر نشر فرهنگ اسلامی.صص: ۵-۲۳۲.

7. Fleming F. PDR for Herbal Medicine. Croucus sativus. Second Ed. Montvale Newjersey. Medical Economics Company. 2001; pp: 653-654.

8. Fatehi M , Rashidabady T, Fatehi-Hassanabad Z. Effects of Crocus Sativus Petals' Extract on Rat Blood Pressure and on Responses Induced by Electrical Field Stimulation in the Rat Isolated Vas Deferens and Guinea-Pig Ileum. J. Ethnopharmacol 2003; 84:199-203.

9. Abdullaev F I. (1993). Biological effects of Saffron. Biofactors 1993;4: 83-86.

10.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.

11.Billette J, Shrier A.Atrioventricular nodal activation and functional properties. In Zipes DP, Jalife J, eds. Cardiac Electrophysiology.From Cell to Bedside. WB Saunders, Philadelphia; WB Saunders, 1995: 216-228.

12.Mazgalev T, Mowrey K, Efimov I, et al. Mechanism of Atrioventricular Nodal Facilitation in Rabbit Heart:role of Proximal AV Node. Am J Physiol 1997; 272(HCP42):H1658-H1668.

13. Hoshino K,Anumonow J,Delmar M,Jalife J. Wenckebach Periodicity in Single Atrioventricular Nodal Cells from the Rabbit Heart. Circulation 1990; 82:2201-2216.

14. Billette J, Nattle S. Dynamic behavior of the Atrioventicular Node: A Functional model of in Interaction between Recovery, Facilitation and Fatigue. J Cardiovascular Electrophysiol 1994; 90-102 .

15. Balligand JL, Cannon P J .Nitric Oxide Synthesis and Cardiac Muscle, Autocrine and Paracrine Influences Arteriosclerosis. Thrombosis and Vascular Biology 1997; 17:1846-1858.

16. Kelly RA, Balligand JL ,Smith TW. Nitric Oxide and Cardiac Function .Circulation Research 1996; 79: 363-380 .

17. Paterson D J. Nitric Oxide and the Autonomic Regulation of Cardiac Excitability . Experimantal Physiology 2001; 86:1-12 .

18. Rakhit RD ,Marber MS. Nitric Oxide : an Emerging Role in Cardioprotection.Heart 2000; 86:368-372 .

19. Pinsky DJ, Patton S, Mesaros S, Brovkovych V , Kubaszawski E, Grunfeld S & Malinski T . Mechanical Transduction of Nitric Oxide Synthesis in the Beating Heart. Circulation Research 1997; 372-379.

20.Martynyuk A E , Kane K A, Cobbe S M , Rankin A C. Role of Nitric Oxide, Cyclic GMP and Superoxide in Inhibition by Adenosine of Calcium Current in rabbit Arioventricular Nodal Cells.Cardivascular Research 1997; 360-367.

21. Zima A, Martynyuk AE, Seubert CN, Morey TE, Sumners C, Cucchiara RF, Dennis DM. Antagonism of the Positive Dromotropic effect of Isoproterenol by Adenosine:role of Nitric Oxide, cGMP-Dependent cAMP-Phosphodiesterase and Protein Kinase G.J Mol Cell Cardiol 2000; 32(9):1609-19.

22. Han X, Kobzik L, Balligand J L, Kelly R A, Smith T W, Michel T. Nitric Oxide Synthase (NOS_3) Mediated Cholinergic Modulation of Ca Current in Adult rabbit Atrioventricular Nodal Cells. Circ Res 1996; 78:998-1008.

23. Martynyuk A E, Kane K A, Cobbe S M, Rankin A C. Role of nitric Oxide, Cyclic GMP and Superoxide in Inhibition by Adenosine of Calcium Current in Rabbit Atrioventricular Nodal Cells. Cardiovascular Research 1997; 34(2):360-367.

24.Yang R, Tan X, Thomas AM, Shen J, Qureshi N, Morrison DC, Crocetin Inhibits mRNA Expression for Tumor Necrosis Factor-Alpha,Interleukin-1Beta, and Inducible Nitric Oxide Synthase in Hemorrhagic Shock. J Parenter Enteral Nutr 2006; 30(4):297-301.

۲۵- خوری وحید، نایب‌پور محسن، میرعباسی عباس، رخشان‌الناز: تاثیر عصاره‌آبی‌زعفران (Croucus sativus) **روی خواص الکتروفیزیولوژیک پایه و کارکردی گستره جدا شده گره دهلیزی- بطنی خرگوش. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان، ۱۳۸۵،سال هشتم شماره ۳، صص: ۷-۱.**

The Role of Nitric Oxide Syntase Enzyme Inhibitor on Antiarrhythmic Effects of Crocus Sativus on Isolated Rabbit Atrioventricular Node

Khori V.(Ph. D.), Nayebpour M.(Ph. D.), Rakhshan E.(Stu.), Mir Abbasi A.(Stu.)

Abstract

Introduction: Nitric oxide, directly or indirectly, can modulate electrophysiological parameters of the heart. On the other hand Nitric Oxide Syntase enzymes were founded in the Av-node. .Various studies pointed to Anti-ischemic and Hypotensive effects of the Crocus Sativus(Saffron).

Objective: To determine the effects of Hydroalcholic extract of Saffron on the tonic and functional properties of Atrioventricular Node and the role of Nitic Oxide in the mechanism of Saffron.

Materials and Methods: In this experimental study, We used isolated Newlands male rabbits with the method of isolated perfused AV-node in the suitable experimental condition, in three separate groups, in the first group (N=20), we assessed effect of hydroalcoholic extract of Crocus Sativus(19×10-2 mg/l) in order to survey its Electrophysiological effects on AV-node (before and after). In the second group (N=6) Saffron in presence of L-Name (75μmol) and in the third group (N=6) Verapamil (0/1μmol) were examined. The primary characteristics are including: Nodal Conduction Time (AVCT), Wenckebach Time (WBCL), Effective & Functional Refractory Period(ERP&FRP).All changes in the variables were detected on line by A/D board and Av node pack software.

Results: The results have shown an inhibitory effects of Crocus Sativus on basic (AVCT, WBCL, FRP) and Functional Electrophysiological Parameters of AV -node including an increasing AVCT (32.4±4 to 41.7±4 msec) and FRP (157.6 ± 3 to 163.7 ± 4 msec). Also we had significant increased in the amount of facilitation and magnitude of fatigue (5.9 ± 0.3 to 11.1 ± 1 msec). NOS inhibitor (L-Name) has preventing effect on depressant effect of Crocus Sativus on AVCT and FRP.

Conclusion: The hydroalcholic extract of Crocus Sativus can use as Anti -Arrhythmic drug by increasing (AVCT) and (FRP). A part of its effects mediated by Nitrigic pathway.

Key words: Arrhythmia/ Nitric Oxide/ Saffron/ AtrioVentricular Node.