

اثر عصاره آبی - الکلی میوه کنار (سدر) (Zizyphus spina christi) بر نیروی انقباضی و ضربان قلب پرفیوز شده قورباغه

دکتر محمد کاظم غریب ناصری *

چکیده

مقدمه: در مورد خواص آرامبخشی و ضد اضطرابی میوه عناب گزارشهای فراوانی وجود دارد، و در طب گیاهی از مخلوطهای گیاهی حاوی این میوه برای درمان تپش قلب استفاده می‌شود، ولی در مورد کنار، که از همین تیره است مطلب کمتری یافت می‌شود. به همین دلیل، تحقیق حاضر با هدف تعیین اثر عصاره آبی الکلی میوه کنار بر قلب پرفیوز شده قورباغه انجام گردید.

مواد و روشها: گوشت میوه خشک کنار به روش پرکلاسیون و با حلال الکل ۷۰٪ عصاره‌گیری شد. قلب ۱۹ قورباغه نر و ماده بوسیله عصاره حل شده در محلول رینگر با غلظت های نهائی ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر از طریق ورید اجوف به مدت ۱/۵ تا ۲ دقیقه پرفیوز شده و تغییرات نیروی انقباضی و ضربان قلب با استفاده از ترانسدوسر ایزومتریک ثبت و محاسبه گردید.

نتایج: در غلظت‌های کم، افزایش غلظت عصاره، نیروی انقباضی را افزایش می‌داد ($P < 0/0001$) ولی غلظت‌های زیاد عصاره سبب کاهش نیروی انقباضی قلب می‌شد ($P < 0/0001$). بطوریکه در غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر اغلب موجب ایست قلبی می‌گردید که با شستشوی قلب با رینگر تازه ایست قلبی برطرف می‌شد ولی تحریک الکتریکی قلب قادر به برطرف کردن ایست قلبی نبود. هم چنین عصاره بصورت وابسته به غلظت سبب کاهش ضربان قلب گردید. بعلاوه غلظت زیاد عصاره، ضربان و نیروی افزایش یافته بوسیله اپی نفرین را از بین می‌برد ($P < 0/0001$).

نتیجه‌گیری: با توجه به مشابهت عناب و کنار و نیز وجود ماده jujuboside A در عناب که سبب اختلال در اعمال درون سلولی کالمودولین می‌گردد، می‌توان پیشنهاد نمود که میوه کنار نیز از طریق این ماده و یا مشابه آن، موجب کاهش تحریک پذیری قلب و کاهش نیروی انقباض در قلب قورباغه گردیده است.

واژه‌های کلیدی: میوه کنار، قلب قورباغه، نیروی انقباضی، تعداد ضربان قلب

* استادیار فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز، اهواز، مؤلف مسئول

تحریک الکتریکی (E.S.) ۱۰ ولت، ۱ هرتز، ۱ هزارم ثانیه و ۱۵ ثانیه قبل و بعد از مصرف غلظت ۲۰ mg/ml عصاره، [E] اثر مهاری عصاره (۲۰ mg/ml) بر تأثیر تحریکی اینفرین ۲۰۰ μg/ml.

اثر عصاره میوه کنار بر نیروی انقباضی قلب قورباغه:

شکل ۲، نتایج میانگین \pm خطای معیار اثر غلظتهای مختلف عصاره آبی الکلی میوه کنار را بر نیروی انقباضی قلب نشان می‌دهد. صرف نظر از عدم تأثیر غلظت ۰/۶۲۵ mg/ml، غلظتهای ۱/۲۵ mg/ml، ۲/۵ mg/ml و ۵ mg/ml، اثر تحریکی از خود نشان داده‌اند. مقایسه نتایج غلظتهای فوق نشان می‌دهد که اختلاف اثر

غلظتهای ۰/۶۲۵ mg/ml و ۱/۲۵ (P<۰/۰۵) و اثر ۰/۶۲۵ mg/ml تا ۲/۵ (P<۰/۰۵) معنی دار هستند. اختلاف اثر غلظتهای ۵ mg/ml و ۱۰ و نیز ۱۰ mg/ml و ۲۰ معنی دار هستند (به ترتیب P<۰/۰۰۰۱ و P<۰/۰۰۵). مقایسه آماری اثر همه غلظتهای عصاره نشان دهنده اختلاف بسیار قابل ملاحظه می‌باشد (P<۰/۰۰۰۱).

پس از دوره ۱۰ دقیقه‌ای recovery (۲۰)، محلول عصاره به ستون رینگر اضافه می‌شد تا غلظت‌های نهایی در آن ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باشد. مدت پرفیوزن هر غلظت ۱/۵ تا ۲ دقیقه و فاصله بین غلظتها ۵ تا ۱۰ دقیقه بود.

ثبات انقباضات بمدت ۱۰ تا ۲۰ ثانیه قبل از اضافه کردن عصاره تا ۲-۱/۵ دقیقه بعد از اضافه کردن عصاره ادامه داشت.

پس از پایان اثر هر غلظت عصاره، محلول ستون ۳ بار با رینگر تازه تعویض می‌شد. در تمام مدت آزمایش، با قطرات رینگر، سطح خارجی قلب مرطوب نگهداشته می‌شد.

د) روش بررسی آماری نتایج: در این تحقیق، هدف اندازه‌گیری نیروی انقباضی نبوده است بلکه، هدف اندازه‌گیری تغییرات نیروی انقباضی و تغییرات تعداد ضربان قلب بوده است. لذا تغییرات دامنه انقباضات و ضربان قلب ۲۰-۱۰ ثانیه قبل از اضافه کردن عصاره و به همین مدت در پایان ۲-۱/۵ دقیقه با هم مقایسه شده و بصورت میانگین \pm خطای معیار ارائه شده‌اند.

با استفاده از نرم افزار Microsoft excel نتایج اثر دو یا چند غلظت به ترتیب با روشهای T-test و ANOVA مقایسه و P<۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

شکل ۱، ثبت حقیقی تأثیر غلظتهای ۲۰ mg/ml و ۲/۵ عصاره آبی الکلی میوه کنار را بر نیروی انقباضی و ضربان قلب پرفیوز شده قورباغه نشان می‌دهد (قسمتهای A و B). همانطوریکه مشاهده می‌شود، این عصاره با غلظتهای کم سبب افزایش (قسمت A) و در غلظت زیاد، سبب کاهش شدید نیروی انقباضی گردیده است و در اکثر موارد موجب توقف ضربان و ایست قلبی شد (قسمت B). در حالت اخیر، ایست قلبی با شستشوی قلب (Wash) و استفاده از رینگر تازه از بین رفت (قسمت C).

شکل ۲- اثر غلظتهای مختلف عصاره آبی الکلی میوه کنار بر نیروی انقباضی قلب پرفیوز شده قورباغه (n=۱۹). (مقایسه های آماری در متن اشاره شده‌اند).

اثر عصاره میوه کنار بر تعداد ضربان قلب قورباغه:

همانطوریکه در شکل ۳، دیده می‌شود عصاره کنار بصورت وابسته به غلظت سبب کاهش ضربان قلب شده است (P<۰/۰۰۰۱). همچنین اختلاف اثر غلظتهای ۲/۵ mg/ml و ۵، ۱۰ و نیز ۲۰ mg/ml قابل ملاحظه هستند (به ترتیب P<۰/۰۰۰۱ و P<۰/۰۰۰۱ و P<۰/۰۰۵). مقایسه شکلهای ۲ و ۳ نشان می‌دهد که عصاره میوه کنار در غلظت کم (برخلاف نیروی انقباضی) اثر تحریکی بر ضربان قلب ندارد.

شکل ۱- ثبت حقیقی اثرات عصاره آبی الکلی میوه کنار بر

ضربان و نیروی انقباضی قلب پرفیوز شدن قورباغه.

[A] اثر غلظت ۲/۵ mg/ml، [B] اثر غلظت ۲۰ mg/ml و بروز ایست قلبی، [C] اثر شستشو (Wash) در بر طرف کردن ایست قلبی، [D] اثر

حیوانی می‌باشد. هم چنین استفاده از هوا و یا اکسیژن خالص (۹۹/۵٪) بر عملکرد آن تفاوتی نداشته (۲۱)، دستکاری آن سبب تاکیکاردی نشده و مدت کوتاهی برای recovery آن کفایت می‌کند (۲۰). توانایی تحمل در برابر ایست قلبی، صرف نظر از قابلیت نفوذ اکسیژن هوا از سطح آن، احتمالاً ناشی از جریان آرام محلول رینگر حتی طی ایست قلبی می‌باشد. در مورد انقباض قلب باید اشاره کرد که روند انقباض به دنبال دیپولاریزاسیون رخ می‌دهد که خود ناشی از افزایش نفوذپذیری و ورود سریع سدیم از کانالهای Fast Na⁺ channel و کاهش نفوذپذیری به پتاسیم در فاز صفر دیپولاریزاسیون است (۲۳، ۲۲). فاز ۲ یا کفه آن در نتیجه ورود کلسیم از کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع L می‌باشد (۲۲) که وجود آنها در قلب قورباغه ثابت شده (۲۷، ۲۶، ۲۵، ۲۴) و نیز آزاد شدن کلسیم از رتیکولوم سارکوپلاسمیک (۲۹، ۲۸) طی روند Ca²⁺ induced Ca²⁺ release (۳۱، ۳۰) می‌باشد. سیستم اخیر می‌تواند کلسیم مورد نیاز انقباض را تا حدی تأمین کند (۲۸). کاهش نیروی انقباضی قلب و ضربان در تجربه حاضر را می‌توان به سه موضوع مربوط دانست. الف) تغییر در تحریک پذیری وابسته به ورود سدیم و کلسیم، ب) کاهش رهائش کلسیم از منابع داخل سلولی و ج) اختلال در مکانیسم انقباض. با این وجود، اثر مهاری مشاهده شده، ممکن است به مجموعه دو و یا سه مورد فوق الذکر مرتبط باشد. اشاره شد که برگ عناب قادر به از بین بردن موقت حس چشائی است (۱۰، ۹). حس چشائی نتیجه دیپولاریزاسیون و ورود کلسیم (از طریق کانالهای وابسته به ولتاژ) و آزاد شدن نروترانسمیتر تحریکی از گیرنده چشائی است (۳۲). احتمال دارد عناب با داشتن (Ju A) و باتوجه به اثر این ماده بر کالمودولین که خود در تأمین کلسیم برای رهائش نروترانسمیتر ضروریست، موجب از بین رفتن حس چشائی گردد. در تجربه حاضر نیز میوه کنار با داشتن احتمالی همین ماده و یا مشابه آن، مانع از تأمین کلسیم برای تحریک و انقباض شده است. در تجربه حاضر، اندازه‌گیری pH محلول عصاره حل شده در رینگر نشان داد که محلول عصاره بصورت وابسته به غلظت، اسیدی می‌باشد. لذا احتمال دارد، قسمتی از اثر مهاری مشاهده شده در این تجربه، نتیجه اسیدی بودن محلول عصاره باشد. زیرا، اسیدوز مایع خارج سلولی سبب خروج پتاسیم از سلولها و هیپرپولاریزه شدن آنها (۳۳، ۳۴، ۳۵) و مانع از تحریک خودبخودی سلولهای قلب می‌گردد. از سوی دیگر عدم دیپولاریزاسیون، مانع جریان کلسیم از کانالهای وابسته به ولتاژ نوع L و نیز رهائش کلسیم از رتیکولوم سارکوپلاسمیک می‌گردد (۳۶) و در نهایت از تأمین کلسیم کافی برای انقباض جلوگیری و نتیجتاً سبب ایست قلبی گردیده است (۳۵). از سوی دیگر مشخص شده است که یکی از مواد فعال در عناب (Ju A) است که به نسبت ۲ به ۱ با ملکول کالمودولین کمپلکس تشکیل میدهد (۱۶). با توجه به نقش طبیعی 4Ca²⁺ - calmodulin در فعالیت آنزیمهای درون سلولی مانند فعال کردن میوزین کیناز زنجیر سبک و دخالت آن در انقباض عضله صاف، فعال کردن پروتئین کیناز

شکل ۳- اثر غلظتهای مختلف عصاره آبی الکی میوه کنار بر ضربان قلب پرفیوز شده قورباغه (n = ۱۹) (نتایج مقایسه‌های آماری در متن اشاره شده‌اند).

اثر تحریک الکتریکی قلب قورباغه: تحریک دیواره دهلیز قلب (۱۰ ولت، ۱ هرتز، ۱ هزارم ثانیه بمدت ۱۵ ثانیه) قبل از تأثیر عصاره سبب تغییر نیروی انقباضی (و احیاناً اکستراسیستول) و پیروی قلب از فرکانس تحریک گردید. ولی پس از تأثیر عصاره با غلظت ۲۰ mg/ml که سبب ایست قلبی گردیده بود، اجرای تحریک با همان مشخصات، اثری بر قلب نداشت (قسمت D در شکل ۱).

تأثیر عصاره آبی الکی میوه کنار بر تأثیر تحریکی اپی‌نفرین: همانطوریکه در شکل ۴ دیده می‌شود، غلظت ۲۰ μg/ml اپی‌نفرین در محلول رینگر سبب افزایش نیروی انقباضی بمیزان ۱۹/۳۲٪ گردید. با اینحال، غلظت ۲۰ mg/ml عصاره میوه کنار توانست آنرا بمیزان ۱/۴۳ ± ۹۸/۳۴٪ کاهش دهد (P < ۰/۰۰۰۱). علاوه بر این، اپی‌نفرین با غلظت یادشده توانست ضربان قلب را بمیزان ۶/۱۷ ± ۲۴/۰۸٪ افزایش دهد. غلظت ۲۰ mg/ml عصاره تعداد ضربان قلب را بمیزان ۹/۰۹ ± ۸۶/۳۷٪ کاهش داد (P < ۰/۰۰۰۱). شکل ۱ (قسمت E) نشان‌دهنده اثر تحریکی اپی‌نفرین (۲۰ μg/ml) بر قلب است که بوسیله غلظت ۲۰ mg/ml عصاره کاملاً از بین رفته و بجای آن مهار ضربان و حتی ایست قلبی ظاهر شده است.

شکل ۴- تغییرات نیروی انقباضی و ضربان قلب پرفیوز شده قورباغه پس از پرفیوزیون اپینفرین (۲۰ μg/ml) و تأثیر مهاری غلظت ۲۰ mg/ml عصاره بر آن (n = ۹). مقایسه‌های آماری در متن اشاره شده‌اند.

بحث

روش پرفیوزن قلب قورباغه، همچون گذشته مدل مناسبی جهت بررسی اثرات فارماکولوژیک مواد مختلف میباشد (۲۱). سهولت کانیوله کردن، تحمل مدت طولانی آزمایش و نیز تحمل در برابر ایست کامل قلبی از نکات مثبت این مدل

علمی دانشگاه کرمان، دوره سوم شماره ۳، ۱۳۷۵: صفحه ۱۲۲-۱۱۵.

5. Ali - Shtayeh MS, Yagmour RM, Faidi YR, et al. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J Ethnopharmacol*, 1998, 60:265-271.
6. Adzu B, Amos S, Wambebe C, Gamaniel K. Antinociceptive activity of *Zizyphus spina-christi* root bark extract. *Fitoterapia*, 2001, 72: 344-350.
7. Effraim KD, Osunkwo UA, Onyeyilli P, Ngulde A. Preliminary investigation of the possible antinociceptive activity of aqueous leaf extract of *zizyphus spina christi* (LINN) Desf. *Indian Journal of Pharmacology*, 1998, 30: 271-272.
8. Huang L, Ye W, Cai B, et al. A preliminary study on the pharmacology of the compound prescription *huangqin tang* and its component drugs. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 1990, 15:115- 117.
9. Meiselman HL, Halpern BP, Dateo GP. Reduction of sweetness judgements by extracts from the leaves of *zizyphus jujuba*. *Physiol Behav*, 1976, 17: 313-317.
10. Yamada H, Imoto T. Inhibitory effect of the extract from *Zizyphus jujuba* leaves on sweet taste responses of the chorda tympani in the rat and hamster. *Comp Biochem Physiol*, 1987, 88:355-360.
11. Anand KK, Singh B, et al. Effect of *Zizyphus Sativa* leaves on blood glucose levels in normal and alloxan-diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 1989, 27:121-127.
12. Glombitza KW, Mahran GH, Mirhom YW, et al. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of *Zizyphus spina christi* in rats. *Planta Med*, 1994, 60: 244-247.
13. Tsuda T, Kubota K, Yasuda K, et al. Effect of Chinese herbal medicine "kanbaku-taiso-to" on transmembrane ionic currents and its local anesthetic action. *J Ethnopharmacol*, 1986, 17:257-261.
14. Tsuda T, Kubota K, Yasuda K, et al. Effect of Chinese herbal medicine "kanbaku - taiso-to" on neuropharmacological tests. *J Ethnopharmacol*, 1986, 16: 289-296.
15. Peng WH, Hsieh MT, Lee YS, et al. Anxiolytic effect of seed of *Zizyphus jujuba* in mouse models of anxiety. *J Ethnopharmacol*, 2000, 72: 435-441.
16. Zhou Y, Li Y, Wang Z, et al. IH NMR and spin - labeled EPR studies on the intraction of calmodulin with *jujuboside A*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 202:148-154.
۱۷. مصمص شریعت ه. عصاره گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهان داروئی و روشهای شناسائی و ارزشیابی آنها. چاپ اول، اصفهان، انتشارات مانی، ۱۳۷۱: صفحه ۱۶-۱۴.

های وزیکولهای سیناپسی (۳۷) و نیز نقش کالمودولین در فعال کردن کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع L (۳۸) و نیز رهایش کلسیم از رتیكولوم ساركوپلاسمیک (۳۶) میتوان نتیجه گرفت که (Ju A) با پیوستن به کالمودولین عملاً مانع از اجرای وظایف آن در تأمین کلسیم و نیز اجرای انقباض می‌گردد. بطوریکه گزارش شده است که مهار کالمودولین کیناز سبب بهبود آریتمی قلبی می‌گردد (۳۹). اگر چه اثر کمپلکس کلسیم-کالمودولین در فعال شدن پروتئین کیناز ۲ در تولید ضربان توسط گره SA ضروری است (۴۰) اما با دخالت احتمالی (Ju A) میوه کنار، این روند مختل شده است و سبب کاهش ضربان قلب گردید. ولی، عدم تأثیر تحریک الکتریکی در حضور غلظت بالای عصاره میوه کنار در تجربه حاضر می‌تواند بیانگر آن باشد که تأثیر عصاره فقط مربوط به جلوگیری از تولید ضربان نبوده بلکه به دلیل عدم تأمین کلسیم آزاد کافی از منابع مختلف جهت انقباض است. بنا به گزارشی، تحریک گیرنده‌های بتا آدرنرژیک قلب بوسیله اپی‌نفرین سبب فعال شدن کانالهای کلسیمی نوع L در قلب قورباغه می‌گردد (۴۱) و نظر به دخالت کالمودولین در فعال کردن این کانالها (۳۸) و نیز در رهایش کلسیم از رتیكولوم ساركوپلاسمیک (۳۶،۲) و تأثیر JuA بر کالمودولین می‌توان پیشنهاد نمود که میوه کنار با داشتن همین ماده و یا مشابه آن، سبب مهار اثر تحریکی اپی‌نفرین شده است. آنچه که بعنوان نتیجه‌گیری نهایی می‌توان مطرح کرد آنست که، عصاره آبی الکی میوه کنار احتمالاً بوسیله JuA و از طریق کاهش ورود کلسیم از خارج، کاهش رهایش کلسیم از منابع داخل سلولی و یا اختلال در مکانیسم انقباض سبب کاهش ضربان و نیروی انقباضی قلب قورباغه می‌شود.

سپا سگزاری

بدینوسیله از همکاریهای همه دست اندرکاران دانشکده پزشکی اهواز در اجرای این پژوهش صمیمانه تشکر می‌نمایم.

منابع

۱. میر حیدر ح. معارف گیاهی، کاربرد گیاهان در پیشگیری و درمان بیماریها. جلد سوم، چاپ اول، تهران، دفتر نشر فرهنگ اسلامی، ۱۳۷۳: صفحه ۱۳۰-۱۳۲.
۲. زرگری ع. گیاهان داروئی. جلد اول، چاپ ششم، تهران، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۶۸: صفحه ۶۰۱-۶۰۵.
۳. حبیب بیگی ف. بررسی آزمایشگاهی اثرات ضد قارچی گیاهان اوکالیپتوس و سدر. پایان نامه دکترای داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز، ۱۳۷۳: صفحه ۳۱-۲۸.
۴. آیت اللهی موسوی ا، عبداللهی ح، کاظمی پور ن. بررسی اثرات ضد درماتوفیتی عصاره متانولی ده گیاه داروئی. مجله

35. Souhami RL, Moxham J. Textbook of Medicine. Hong Kong: Churchill Livingstone, 1990: 855.
36. Meissner G, Tripathy A, Xu L. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel: regulation by cytosolic and lumenal Ca^{2+} and calmodulin. *J Physiol*, 1997, 499: P2 S.
37. West JB. Best and Taylor's Physiological basis of medical practice 12th edition, USA, Williams and Willkins, 1990: 788.
38. Wu Y, MacMillan LB, McNeill RB, et al. CaM kinase augments cardiac L-type Ca^{2+} current: a cellular mechanism for long Q-T arrhythmias. *A J Physiol*, 1999, 276: H2168- H2178.
39. Wu Y, Roden DM, Aderson ME. Calmodulin kinase inhibition prevents development of the arrhythmogenic transient inward current. *Circ Res*, 1999, 84: 906-912.
40. Vinogradova TM, Zhou YY, Bogdanov KY, et al. Sinoatrial node pacemaker activity requires Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II activation. *Circ Res*, 2000, 87: 760-767.
41. Frace AM, Mery PF, Fischmeister R, Hartzell HC. Rate-limiting in the beta-adrenergic stimulation of cardiac calcium current. *J Gen Physiol*, 1993, 101: 337-353.
42. Bray JJ, Cragg PA, Macknight ADC, Mills RG. Human Physiology. 4th edition, UK, Blackwell Science, 1999: 339-340.
18. Andrew BL. Experimental Physiology. 9th ed, UK: Churchill Livingstone, 1972:155-157.
19. Basle R, Stuttgart H, Hugstetten H. HSE Biological measuring techniques: Experiments on isolated smooth muscle preparations. English edition prepared by IM Burden 1980: 6,178.
20. Cabanac A, Cabanac M. Heart rate response to gentle handling of frog and lizard. *Behav Processess*, 2000, 52: 89-95.
21. Acierno R, Gattuso A, Cerra MC, et al. The isolated and perfused working heart of the frog, *Rana esculenta*: an improved preparation. *Gen Pharmacol*, 1994, 24:521-526.
22. Bray JJ, Cragg PA, Macknight ADC, Mills RG. Human Physiology. 4th edition, UK, Blackwell Science, 1999: 326-327.
23. Costanzo LS. Physiology. USA, W.B. Saunders Company, 1998: 115-117.
24. Frace AM, Hartzell HC. Opposite effects of phosphatase inhibitors on L-type calcium and delayed rectifier currents in frog cardiac myocytes. *J Physiol*, 1993, 472: 305-326.
25. Goaillard JM, Vincent PV, Fischmeister R. Simultaneous measurements of intracellular cAMP and L-type Ca^{2+} current in single frog ventricular myocytes. *J Physiol*, 2001, 530: 79-91.
26. Petit - Jacques J, Hartzell HC. Effect of arachidonic acid on the L-type calcium current in frog cardiac myocytes. *J Physiol*, 1996, 1493: 67-81.
27. Skeberdis VA, Jurevicius J, Fischmeister AR. Beta-2 adrenergic activation of L-type Ca^{2+} current in cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 283: 452-461.
28. Ozgul M, Silan C, Yillar O, Kucukhuseyin C. 4-aminopyridine can induce release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of frog heart. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2000, 11:57-62.
29. West TB. Best and Taylor's Physiological basis of medical practice. 12th edition, USA, Williams and Willkins, 1990: 204-205.
30. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. Physiology. 4th edition, USA, Mosby, 1998:365.
31. Patton HD, Fuchs AF, Hille B, et al. Textbook of Physiology. 21st edition, USA, W.B. Saunders Company, 1982: 65.
32. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. Physiology. 4th edition, USA, Mosby, 1998:178.
33. Metheny NM. Fluid and electrolyte balance nursing considerations. 4th edition, Philadelphia, Lippincott, 2000:104.
34. Patton HD, Fuchs AF, Hille B, Schar AM, Steiner R. Text book of Physiology. 21st edition, USA, W.B. Saunders Company, 1982:1109.