[Article in Persian] Physiology and Pharmacology Vol. 10, Spring 2006, 71-77

Study on mechanism of vasorelaxatory effect of Vitis vinifera leaf extract in rat aorta

Gharib Naseri MK[1*] and Heidari A[2]

[1]Dept. of Physiology, Medical School, Ahwaz Jundshapur University of Medical Sciences, Ahwaz, Iran. [2]Faculty of Pharmacy, Ahwaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahwaz, Iran.

Abstract

Introduction: Our previous studies showed that hydroalcoholic extract of leaf of *Vitis vinifera* relaxes the phenylephrine-induced contraction in rat thoracic aorta. This effect was dependent on endothelial integrity and NO-cGMP system. The vasorelaxant effect of extract was much lesser on KCl-induced contraction. We, therefore, postulated that K^+ channels are involved. The main aim of the present study was to determine the type of K^+ channels involved in this vasorelaxant effect.

Methods: Thoracic aorta with intact endothelium was removed from adult male Wistar rats (170-220g). The aorta was mounted in an organ bath containing Krebs-Henseleit (37 ºC, pH 7.4) bubbled with O_2. Aortic contractions were recorded isometrically under 1 g resting tension. The aorta endothelium was considered intact if acetylcholine (1 μM) could induce more than 70% aorta relaxation on 1μM phenylephrine-induced contraction. Extract was prepared by maceration method using 70% alcohol and the solvent was then evaporated.

Results: The results showed that in the presence of tetraethylammonium (10 mM), the vasorelaxant effect of extract (0.25, 0.5, 1 and 2 mg/ml) was reduced ($P<0.001$, n=7). In contrast, glibenclamide (1 μM) had no effect. In calcium-free (plus 0.1 mM of EDTA) Krebs-Henseleit solution, the vasorelaxant effect of extract (0.25, 0.5 and 1 mg/ml) was reduced ($P<0.0001$, n=8). Furthermore, the vasorelaxant effect of extract was unaffected by indomethacin (1 μM).

Conclusion: These results suggest that *Vitis vinifera* leaf hydroalcoholic extract induces relaxation in rat aorta possibly by opening the Ca^{2+}-operated K^+ channels but, not ATP- sensitive K^+ channels and extracellular calcium was essential for inducing vasorelaxation by extract. Furthermore, cyclooxigenase was not involved in this vasorelaxant effect.

Keywords: *Vitis vinifera*, Rat, Aorta, K^+ channels.

* Corresponding Author Email: gharibnaseri_m@yahoo.com

فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۸۵

بررسی مکانیسم شل کنندگی عروقی عصاره برگ انگور در آئورت موش صحرایی

محمد کاظم غریب ناصری[۱*] و اکبر حیدری[۲]
۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز. ۲- دانشجوی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز.

دریافت: مهر ۱۳۸۴ بازبینی: بهمن ۱۳۸۴ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۵

چکیده

هدف: مطالعات قبلی ما نشان داد که، عصاره آبی‌الکلی برگ انگور انقباض ناشی از فنیل‌افرین را در آئورت موش صحرایی و در حضور اندوتلیال سالم و با دخالت سیستم NO-cGMP کاهش داد، در حالی که اثر کمتری بر انقباض ناشی از کلرورپتاسیم داشت. لذا به نظر می‌رسد که افزایش پتاسیم خارج سلولی به طریقی موجب کاهش عملکرد مهاری عصاره شده است. هدف اصلی تحقیق حاضر تعیین نقش احتمالی کانالهای پتاسیم در عملکرد مهاری این عصاره می‌باشد.

روش کار: در موشهای صحرایی نر و بالغ از نژاد Wistar (۱۷۰ تا ۲۲۰ گرم) آئورت سینه‌ای جدا شد و در حمام بافت حاوی محلول کربس ـ هانسلیت (pH ۷/۴ و ۳۷ ^{o}C) با جریان دائم اکسیژن قرار گرفت و انقباضات آن تحت ۱ گرم کشش اولیه به روش ایزومتریک ثبت شد. سلامت اندوتلیال با بروز شلی (بیش از ۷۰%) ناشی از استیل‌کولین (۱ μM) بر انقباض ناشی از فنیل‌افرین (۱ μM) مشخص گردید. عصاره برگ انگور به روش خیساندن پودر برگ خشک انگور در الکل ۷۰% تهیه گردید.

یافته ها: نتایج نشان داد که تترااتیل آمونیوم (۱۰ mM) عملکرد مهاری عصاره (۰/۲۵ تا ۲ mg/ml) را کاهش می‌دهد (n=۷ و P<۰/۰۰۱) ولی گلیبنکلامید (۱ μM) اثری بر عملکرد مهاری عصاره (۱ mg/ml) ندارد. در محیط فاقد کلسیم (همراه با EDTA)، اثر مهاری عصاره (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ mg/ml) بر انقباض آئورت ناشی از فنیل افرین، کاهش یافت (n=۷ و P<۰/۰۰۱). علاوه بر این، حضور ایندومتاسین (۱ μM) اثری بر عملکرد مهاری عصاره نداشت.

نتیجه گیری: بر اساس این نتایج می‌توان پیشنهاد نمود که، عملکرد مهاری عصاره بدون دخالت پروستاسیکلین بوده و در محیط بدون کلسیم این اثر مهاری تضعیف می‌گردد. احتمال داده میشود که عصاره آبی‌الکلی برگ انگور با دخالت کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم (calcium-operated K^+ channels)، موجب شل شدن آئورت موش صحرایی شده است.

واژه های کلیدی: برگ انگور، آئورت، موش صحرایی، کانالهای پتاسیمی.

مقدمه

انگور (*Vitis vinifera*) گیاهی است از خانواده Vitaceae که منشاء آنرا شمال غربی ایران می‌دانند [۱]. برگ انگور در بعضی از کشورها از جمله ایران به مقدار کم در رژیم غذایی (دلمه برگ انگور) مصرف می‌شود. در کتب گیاهان داروئی به اثرات ضد اسهال ، ضد استفراغ و ضد واریس برگ انگور اشاره شده است [۹]. از جمله ترکیبات مهم شناخته شده در انگور، فلاوونوئیدها (از گروه پلی فنلها) و آنتوسیانیدینها می‌باشند [۱]. اخیراً نشان داده شده است که آئورت جدا شده انسان بصورت وابسته به اندوتلیال بوسیله پروسیانیدینهای (از انواع دیگر پلی فنلها) موجود در دانه انگور نیز شل می‌شود [۶] و تحقیقات در این مورد پیشنهاد می‌کنند که این شلی از طریق NO و با افزایش cGMP انجام می‌شود [۱۶و۲۵]. همچنین احتمال داده شده است که بازشدن کانالهای پتاسیمی حساس به ترا اتیل‌آمونیوم بوسیله پروسیانیدینها مسئول شل شدن آئورت باشد [۲۵]. فلاوونوئید quercetin که در برگ انگور وجود دارد [۱۵] نیز با افزایش cGMP در آئورت، سبب شلی وابسته به اندوتلیال می‌شود [۷]. اثرات حفاظتی پروسیانیدینهای دانه انگور در برابر استرس اکسیداتیو نیز گزارش شده است [۳۳]. مفید بودن برگ انگور در درمان عدم کفایت مزمن وریدی (chronic venous insufficiency) در انسان [۲۱] و بهبود نفروتکسیکوزیس ناشی از citrinin در موش کوچک آزمایشگاهی گزارش شده است [۸]. در مورد اثرات عصاره آبی الکلی برگ انگور می‌توان به اثر مهاری این عصاره بر انقباضات ایلئوم ناشی از کلرورپتاسیم و استیل‌کولین [۴] و انقباضات ناشی از اکسی‌توسین در رحم در موش صحرایی [۳] و اثر مهاری بر نیروی انقباضی و ضربان قلب جدا شده

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبات:
gharibnaseri_m@yahoo.com

قورباغه [۲] اشـاره نمود و پیشـنهاد شده اسـت که اثرات مهاری عصاره نتیجه مسدودشـدن کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ می‌باشد [۳و۴]. از طرف دیگر، تحقیقات اخیر نشـان داده است که عصاره برگ انگور سبب کاهش انقباض آئورت ناشـی از فنیل افرین در موش صحرایی می‌گردد و این اثر وابسته به سلامت اندوتلیال و با دخالت NO و cGMP است [۵] ولی عملکرد مهاری عصاره بر انقباض ناشی از کلروپتاسیم کمتر بود. این نکته نشـان می‌دهد که غلظت پتاسـیم خارجی بر عملکرد مهاری عصاره تأثیر دارد. بر اساس همین نکات، هدف اصلی تحقیق حاضر، بررسی نقش کانالهای پتاسیمی در عملکرد مهاری عصاره برگ انگور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف ـ تهیه عصاره

برگهـای جوان انگور تهیه شـده از مرکز تحقیقات انگور شهرسـتان شـیراز در فصل بهار تهیه شده بودند توسط آقای دکتر سیاهپوش از گروه فارماکوگنوزی دانشـکده داروسازی اهواز شناسـایی و با شماره هرباریوم A06390001M در هرباریوم آن دانشکده نگهداری میشود. برگها پس از خشک شدن در سایه، آسیاب شده و بصورت پودر ریز درآمد. پودر برگ به مدت ۷۲ ساعت در الکل ۷۰٪ خیسانده شد [۵] و هر روز در چند نوبت مخلوط بهم زده شـد. سپس، مخلوط از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده و با گسـتردن محلول عصاره روی سـطح شیشـه، حلال عصاره در دمای اتاق تبخیر شـد. پودر عصاره با نسبت استخراج ۱۹٪ بدست آمـد که تا زمان استفاده در دمای ۴ °C نگهداری می‌گردید.

ب- حیوانات و آماده سازی آئورت

موشـهای صحرایی بالغ نر از نژاد Wistar (با محدوده وزنی ۱۷۰ تا ۲۲۰ گرم) تهیه شـده از انسـتیتو رازی حصارک در قفس‌های پلی‌کربنات بصورت چند تایی و در دمای ۲۰ تا ۲۴°C و سـیکل روشـنایی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ سـاعت روشـنایی نگهداری شـدند. موشـها دسترسی آزاد بـه آب و غذا داشـتند. شـرایط نگهـداری و مراحل کار روی موشـهای صحرایـی در این تحقیـق به تأییـد کمیته اخلاق در پژوهش دانشـگاه علوم پزشـکی جندی شـاپور اهواز رسـیده است. موشـها با دی اتیل اتر بیهوش شـده، قفسـه سینه باز شد و از آئورت سـینه‌ای حدود ۲ cm جدا گردید و بلافاصله در محلول سـرد و اکسـیژنه کربس ـ هانسـلیت قـرار داده و بافتهـای پیوندی بـا دقت از آن جدا گردید. آئـورت به چند قطعه به طول ۵ mm تقسـیم شـد. در تمام مراحل آماده سـازی آئورت، دقت فـراوان گردید تـا به لایه اندوتلیال آن آسـیب وارد نشـود. قطعه آئورت آماده شـده بلافاصله به درون حمام بافـت (۱۰ ml) و بین دو میله افقی ازجنس اسـتیل زنگ نزن قرار داده شـد که یکی بطور ثابت در ته حمام بافت قرار داشـت و دیـگـری از طریق نخ به ترانسدیوسـر ایزومتریک (UF1 Harvard Transducer, UK) متصـل شـده بـود و انـقـباضـات آئـورت بـوسـیـلـه دسـتـگـاه ثـبـات (Universal Harvard Oscillograph, UK) بـر روی کاغـذ با سـرعت ۰/۱ mm/s ثبـت گردید. محلول کربس – هانسـلیت حمام pH ،۳۷°C برابر ۷/۴ و ترکیب آن (برحسب mM) به قرار زیر می‌باشد [۵]: NaCl (۱۱۸)، KCl (۴/۷)، $CaCl_2$ (۲/۵۲)، $MgSO_4$ (۱/۶۴)، KH_2PO_4 (۱/۱۸)، $NaHCO_3$ (۷) و گلوکز (۵/۵). جریان دائم حبابهای کوچک اکسـیژن از ته حمام برقرار بود. میزان کشش اولیه ۱ گرم و مدت دوره سازگاری ۶۰ دقیقه بود که طی این مدت هر ۱۵ دقیقه محلول حمام تعویض می‌گردید.

ج- روش کار

در ابتدای تمام پروتکلهای مختلف این تحقیق، پس از دوره سازگاری، جهت تعیین سلامت لایه اندوتلیال، فنیل‌افرین [۱۹و۲۲] با غلظت نهایی ۱ μM به حمام اضافه می‌شـد و پس از رسـیدن انقباض به حالت کفه، اسـتیل‌کولین (۱ μM) اضافه شد. اگر شـلی آئورت ناشی از استیل‌کولین بیش از ۷۰% بود، قطعه آئورت بعنوان دارای اندوتلیال سـالم تلقی گردید [۳۵]. پـس از اسـتراحت بافت بعد از هر بـار اضافه‌کـردن فنیل افرین (۱ μM) غلظـت معینـی از عصاره برگ انگور اضافـه می‌گردید و میزان شـلی حاصله پس از رسـیدن انقباض به حال کفه اندازه‌گیری شـد. پس از اجـرای هـر مرحله، محلول حمام سـه بار تعویض و بـه مدت حداقل ۱۰ دقیقه و در نهایت، برگشـت تون به حالـت پایه، پروتکل بعدی انجام می‌شـد. در هر گروه، نیروی انقباضی (بر حسب گرم) و یا درصد تغییرات نیروی انقباضی آئورتها (با احتساب انقباض ناشی از فنیل افرین به عنوان ۱۰۰٪) بصورت mean±SEM محاسبه و ارائه شده‌اند. نتایج گروه‌های مختلف با اسـتفاده از آزمونهـای آماری t-test (مقایسـه دو میانگین) و ANOVA (مقایسه چند میانگین) از نظر آماری مقایسه شده و با مقادیر P کوچکتر از ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار تلقی گردید. تعداد موشـهای استفاده شـده در هر پروتکل بصورت n در متن نتایج و نمودارها مشخص گردیده است. کلیه نمکها، EDTA و الکل محصول شرکت مرک (آلمان) و فنیل افرین، استیل‌کولین، ایندومتاسین، تترااتیل‌آمونیوم (مسدود کننده کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم) و گلیبنکلامید (مسدود کننده کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP) از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شده‌اند. جهت حل کردن گلیبنکلامید از کربنات سـدیم و برای حل کـردن تترااتیل‌آمونیوم از آب مقطر استفاده شد و حلال عصاره محلول کربس– هانسلیت بود. ضمناً هر بافت فقط برای بررسی یک مسدود کننده و یا مهار کننده استفاده شد.

نتایج

الف ـ اثر حضور گلیبنکلامید بر عملکرد مهاری عصاره

ابتدا با ایجاد شـلی ناشی از اسـتیل‌کولین (۱ μM) بر انقباض ناشی از فنیل افرین (۱ μM) به میزان ۷۰/۸±۴/۲٪، میزان سـلامت اندوتلیال مشخص گردید. بعد از اسـتراحت، ابتدا فنیل افرین با غلظت قبلی اضافه شـد و پس از رسـیدن انقباض به حالت کفه عصاره (۱ mg/ml) اضافه شـد. در پایـان دوره اثـر عصاره، میزان شـلی آئورت بـه ۹۹/۳±۴/۲٪

رسـید (P<۰/۰۰۰۱ و n=۷). بعد از شستشـو و اسـتراحت ۱۵ دقیقه‌ای، گلیبنکلامید (مسدود کننده کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP) با غلظت نهایی ۱ μM [۳۶] به حمام اضافه شـد و پس از ۳۰ دقیقه [۲۴] حضور آن، مجـدداً فنیل افریـن و عصاره با غلظتهای ذکر شـده به حمام بافت اضافه شد. مقایسـه مقدار نیروی انقباضی برحسب گرم در شکل ۱ نشان می‌دهـد که ۳۰ دقیقـه حضور گلیبنکلامید موجـب افزایش مختصر ولی معنی‌دار (P<۰/۰۵) در نیروی انقباضی ناشـی از فنیل افرین شـده است. امـا، عصاره در حضور گلیبنکلامید همچنان بطور معنی‌دار سـبب کاهش انقباض ناشـی از فنیل‌افرین شـده اسـت (P<۰/۰۰۰۱). عملکرد عصاره در هـر دو حالت اختلاف معنی‌داری بـا هم ندارند. نمونه ثبت حقیقی این پروتکل در شکل ۵ (A1 و A2) نشان داده شده‌اند.

ب ـ اثر حضور تترااتیل‌آمونیوم بر عملکرد مهاری عصاره

ابتدا طبق روشـهای ذکر شـده، درصد سـلامت اندوتلیال به میزان ۸۷/۸ ± ۷/۴٪ تعییـن گردید. پس از ۱۵ دقیقه اسـتراحت و شستشـوی مکـرر، بافت مجدداً بوسـیله فنیل افرین منقبض گردیـد و در حالت کفه آن، غلظتهای تجمعی ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ mg/ml عصاره به حمام اضافه شـد. پس از ۱۵ دقیقه استراحت و شستشـوی مکرر، تترا اتیل آمونیوم با غلظـت [۱۱] ۱۰ mM به حمام اضافه شـد. پـس از ۳۰ دقیقه [۲۵] و در حضور تترا اتیل آمونیوم مشـابه مرحله قبـل، فنیل افرین و عصاره به حمام اضافه گردید. شـکل ۲ نشـان می‌دهد که حضور تترا اتیل آمونیوم سـبب افزایش مختصر (ولی غیر معنی‌دار) در نیروی انقباضی آئورت شده امـا بطور معنی‌دار عملکرد مهاری عصاره را کاهش داده اسـت بطوریکه، اثر مهاری عصاره در بیشـترین غلظت ۵۰٪ کاهش یافته اسـت (n=۷ و P<۰/۰۰۰۱). نمونـه ثبت حقیقی این پروتکل در شـکل ۵ (B1 و B2) نشان داده شده‌اند.

ج ـ بررسـی نقش کلسیم خارج سـلولی در عملکرد مهاری عصاره

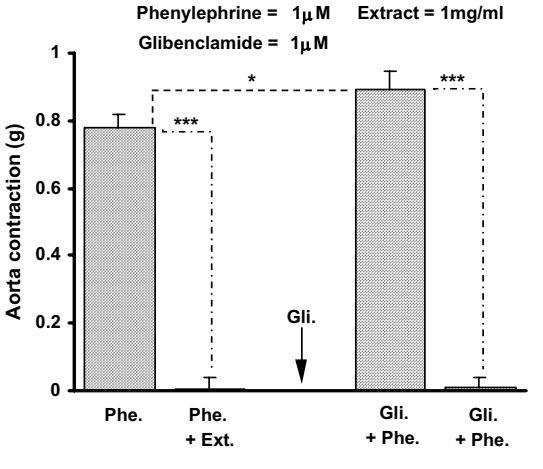
در حمـام بافت حاوی محلول کربس ـ هانسـلیت با کلسـیم نرمال، ابتدا درصد سـلامت اندوتلیال (۷۷/۳±۴/۵٪ شلی ناشی از استیل‌کولین) ثبت گردید. بعد از اسـتراحت، مجدداً بوسـیله فنیل افرین (۱ μM) بافت منقبـض شـد و در حالت کفه، عصـاره با غلظت تجمعـی ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱ mg/ml اضافـه شـد و نتایـج ثبـت گردیـد. در مرحله بعـد، محلول حمـام بـا محلول کربس ـ هانسـلیت بـدون کلسـیم و دارای EDTA (۰/۱ mM) تعویض گردید و پس از ۱۵ دقیقه [۳۱] مراحل قبلی با همان غلظتهای عصاره تکرار شـد. همانطوریکه در شکل ۳ مشاهده می‌شود با حذف کلسـیم محیط، تغییـرات درصد نیروی انقباضی ناشـی از عملکرد مهـاری عصاره در تمام غلظتهای بکار رفته به طور معنی‌دار کاهش یافته اسـت. همچنیـن، عصاره در بیشـترین غلظت در حضور کلسـیم موجب ۹۳/۴٪ کاهش در نیروی انقباضی شـده در حالیکه در غیاب کلسـیم این اثر مهاری ۵۸/۱٪ و اختلاف این دو اثر ۳۵/۳٪ می‌باشـد (n=۷ و در هر سـه غلظت P<۰/۰۰۱). نمونه ثبت حقیقی این پروتکل در شکل ۵ (C1 و C2) نشان داده شده‌اند.

د ـ بررسی نقش پروستاسیکلین در عملکرد مهاری عصاره

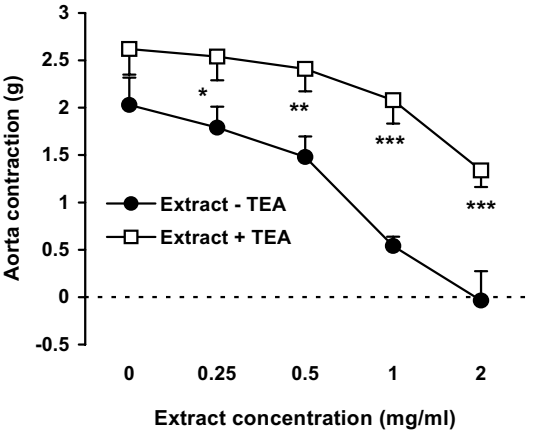
پـس از اطمینـان از سـلامت اندوتلیال و بروز ثبت شـلی ناشـی از اسـتیل‌کولین (۱ μM) بر انقباض ناشی از فنیل افرین (۱ μM) به میزان ۷۵/۸±۴/۹٪ ، فنیل افرین با غلظت قبلی اضافه شـد و پس از رسـیدن انقباض به حالت کفه، عصاره (۱ mg/ml) اضافه شد. عصاره سبب کاهش نیروی انقباضی ناشی از فنیل افرین گردید (n=۸ و P <۰/۰۰۰۱). بعد از شستشو و استراحت ۱۵ دقیقه‌ای، به حمام بافت ایندومتاسین (مهار کننده آنزیم سیکلواکسـیژناز) با غلظت نهایی۱ μM [۲۰] به حمام اضافه شد و پـس از ۳۰ دقیقه حضور آن مجدداً فنیل افرین و عصاره (۱ mg/ml) به حمام بافت اضافه شـد. همانطوریکه در شـکل ۴ مشاهده می‌شود عصاره در هر دو حالت (در غیاب و در حضور ایندومتاسـین) قادر به مهار انقباض ناشی از فنیل افرین است (n=۷ و P <۰/۰۰۰۱) ولی این دو حالت تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند. نمونه ثبت حقیقی این پروتکل در شـکل ۵ (D1 و D2) دیده می‌شوند.

بحث

نتایج این تحقیق نشـان داد که عصاره آبی الکلی برگ انگور سـبب کاهـش معنـی‌دار در انقباض آئورت ناشـی از فنیل افریـن گردید ضمن آنکه، این عملکرد مهاری به حضور کلسـیم محیط وابسـته بود اما تحت تأثیر مسـدود کننده کانالهای پتاسـیمی وابسـته به ATP و مهار سـنتز پروستاسـیکلین قـرار نگرفت. ولی با مسـدود کردن کانالهای پتاسـیمی وابسته به کلسیم، عملکرد مهاری عصاره بشدت کاهش یافت.

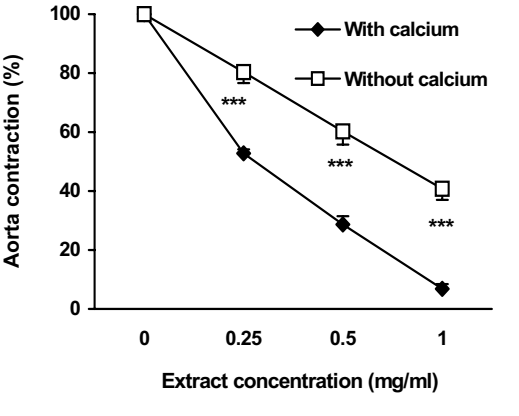


شکل ۱ـ مقایسه عملکرد مهاری عصاره برگ انگور بر انقباض ناشی از فنیل افرین در غیاب و در حضور گلیبنکلامید در آئورت موش صحرایی. در هر دو حالت عصاره موجب کاهش انقباض آئورت شده است. حضور گلیبنکلامید (۳۰ دقیقه) سبب تقویت تأثیر انقباضی فنیل افرین شده ولی اثری بر عملکرد مهاری عصاره نداشته است (n= ۷ ، P< ۰/۰۵ * و P< ۰/۰۰۰۱ ***).



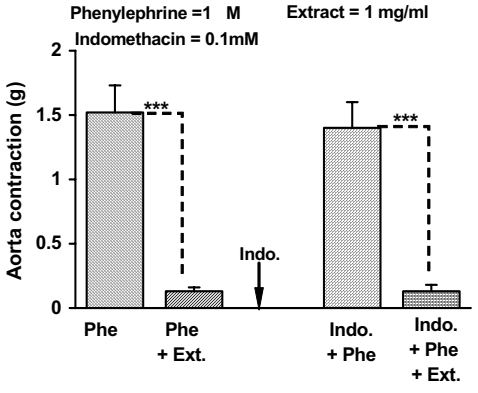
شکل ۲ ـ مقایسه اثر مهاری غلظتهای تجمعی عصاره برگ انگور بر انقباض ناشی از فنیل افرین (۱ μM) در غیاب و در حضور تترا اتیل آمونیوم (TEA ،۱۰ mM) در آئورت موش صحرایی. اگر چه در هر دو حالت عصاره موجب کاهش انقباض آئورت شده است ولی در حضور تترا اتیل آمونیوم (۳۰ دقیقه)، تأثیر مهاری عصاره در همه غلظتهای آن کاهش معنی‌داری یافته است (n= ۷ ، P< ۰/۰۵ *، P< ۰/۰۱ ** و P< ۰/۰۰۱ ***).

فنیل افرین یک آگونیست انتخابی (selective-adrenergic agonist) رسپتور α_1 بوده ولی این رسپتور در سلولهای اندوتلیال وجود نداشته و لذا موجب آزاد شدن وابسته به رسپتور مواد مؤثر عروقی (vasoactive substance) از سلولهای اندوتلیال نمی‌شود [۱۲]. استیل‌کولین نیز از طریق یک مکانیسم وابسته به اندوتلیوم، موجب شل شدن عروق می‌شود [۱۷]. با اتصال استیل‌کولین به رسپتورهای موسکارینیک، نیتریک اکساید (NO) از اندوتلیوم آزاد شده [۱۳] و با انتشار آن به سلولهای عضلانی صاف مجاور و فعال شدن آنزیم soluble guanylyl cyclase سبب افزایش cGMP و در نتیجه، شل‌شدن عضله صاف آئورت می‌شود [۲۳و۲۹]. در تحقیق قبلی گزارش گردید که عصاره آبی الکلی برگ انگور انقباض آئورت ناشی از فنیل‌افرین را در حضور اندوتلیال سالم کاهش داده و این اثر مهاری در



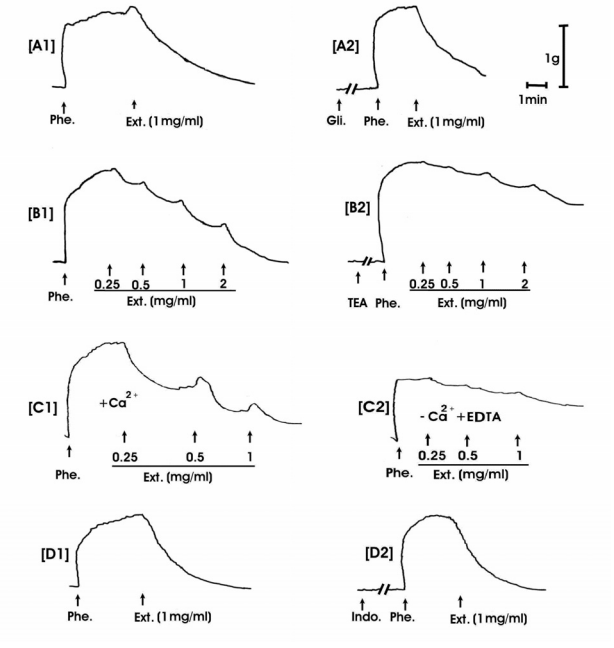
شکل ۳ ـ مقایسه اثر مهاری غلظتهای تجمعی عصاره برگ انگور بر انقباض ناشی از فنیل افرین (۱μM) در محلول کربس ـ هانسلیت دارای کلسیم (With calcium) و محلول فاقد کلسیم همراه با (EDTA) Without calcium در آئورت موش صحرایی. این شکل نشان می‌دهد که در محیط بدون کلسیم، تأثیر مهاری عصاره در هر سه غلظت آن کاهش معنی‌دار یافته است (n=۷ و P< ۰/۰۰۱ ***).

حضور مهار کننده نیتریک اکساید سنتاز (توسط L-NAME) و نیز مهار سنتز cGMP (توسط آبی متیلن) کاهش یافت [۵]. از طرف دیگر، در همین تحقیق مشخص شد که میزان عملکرد مهاری عصاره بر انقباض آئورت ناشی از کلرورپتاسیم به مراتب کمتر بود [۵]. این نکته نشان داد که افزایش غلظت پتاسیم خارج سلولی از اثر بخشی مطلوب عصاره جلوگیری می‌کند. لذا به نظر رسید که خروج پتاسیم و در نهایت بروز شلی در آئورت ناشی از عصاره مختل شده است. در پاسخ به این سؤال که کدام نوع کانال پتاسیمی در این امر دخالت دارد، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP که توسط گلیبنکلامید مسدود می‌شوند در عملکرد مهاری عصاره دخالتی ندارند. گزارش شده است که کانالهای پتاسیمی حساس به ATP در آئورت موش صحرایی وجود داشته و این کانالها به گلیبنکلامید حساس هستند [۲۸]. لذا به نظر می‌رسد که علیرغم وجود این کانالها در آئورت، در تحقیق حاضر، عصاره برگ انگور بدون دخالت آنها، عمل مهاری خود را انجام داده است. گزارش شده است که پروسیانیدینها که در انگور وجود دارند [۱۶] موجب شل شدن وابسته به اندوتلیال و وابسته به NO در آئورت موش صحرایی می‌شوند و همچنین این اثر پروسیانیدینها بدون دخالت کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP انجام می‌شود [۲۵]. این گزارش نیز با نتایج این تحقیق در مورد عدم تأثیر گلیبنکلامید همخوانی دارد. تترااتیل‌آمونیوم (TEA) مسدود کننده کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم (Ca^{2+}-operated potassium channel inhibitor) و یا (Ca^{2+}- activated K^+ channel inhibitor) می‌باشد [۳۰] ولی بعضی از منابع این ماده را مسدود کننده غیر انتخابی کانالهای پتاسیمی معرفی کرده‌اند [۲۵]. در تجربه حاضر TEA موجب کاهش معنی‌دار عملکرد مهاری عصاره گردید. این نتیجه با گزارش ارائه شده در مورد تأثیر TEA در کاهش شل کنندگی عروقی پروسیانیدینها مطابق دارد [۲۵]. زیرا گزارش شده است که پروسیانیدینهای (از انواع دیگر پلی فنلها) موجود در دانه انگور موجب شل شدن آئورت گردیده [۶] و احتمال داده شده است که بازشدن کانالهای پتاسیمی حساس به تترااتیل‌آمونیوم بوسیله پروسیانیدینها مسئول شل شدن آئورت باشد [۲۵]. کلسیم نقش مهمی در سنتز و رهایش NO از سلولهای اندوتلیال دارد [۲۷]. گزارش شده است که حذف کلسیم محیط موجب کاهش شلی ناشی از متاکولین در آئورت خرگوش می‌شود [۳۴] و لذا به نظر می‌رسد، حذف کلسیم موجب جلوگیری از رهایش NO وابسته به کلسیم شده باشد. همچنین پیشنهاد شده است که اتساع عروقی وابسته به اندوتلیال موجب افزایش رهایش کلسیم وابسته به اینوزیتول تری فسفات (IP_3) از منابع درون سلولی شده [۱۴] که به نوبه خود، موجب بازشدن کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم و افزایش جریان خروجی پتاسیم و وقوع هیپرپولاریزاسیون می‌گردد [۱۰] و این مطلب با نتایج ارائه شده در این تحقیق همخوانی دارد. زیرا همانطوریکه در بخش نتایج مطرح گردید، حذف کلسیم محیط موجب کاهش معنی‌دار در عملکرد مهاری عصاره گردید و بنابراین دخالت کلسیم را در بروز اثر مهاری عصاره تأیید می‌کند. همانطوریکه



شکل ۴ ـ مقایسه تأثیر مهاری عصاره برگ انگور بر انقباض ناشی از فنیل افرین در غیاب و در حضور ایندومتاسین (۳۰ دقیقه) در آئورت موش صحرایی. در هر دو حالت، عصاره موجب کاهش معنی‌دار انقباض آئورت شده است (n= ۷ ، P< ۰/۰۰۰۱ ***).

قبلاً نیز گزارش گردید [۲]، عملکرد مهاری عصاره نتیجه وجود مواد شبه استیل‌کولینی در عصاره نمی‌باشد. زیرا، اولاً اثر مهاری دیده شده در قلب تحت تأثیر آتروپین قرار نمی‌گرفت و ثانیاً این عصاره انقباض ایلئوم را کاهش می‌دهد [۴]. گزارش شده است که علاوه بر نیتریک اکساید، مواد شل‌کننده دیگری مانند پروستاسیکلین نیز از اندوتلیال آزاد می‌شود [۱۸و۳۲] و لذا مهار سنتز پروستاسیکلین بوسیله ایندومتاسین (مهارکننده سیکلو اکسیژناز) می‌تواند سبب حذف این عمل شل‌کننده شود. ولی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بکار بردن ایندومتاسین نتوانست اثر شل‌کننده عصاره برگ انگور را از بین ببرد و لذا می‌توان نتیجه گرفت که عملکرد مهاری مشاهده شده با دخالت پروستاسیکلین انجام نشده است. در همین



شکل ۵ ـ نمونه ثبت حقیقی از پروتکلهای مختلف در این تحقیق. فنیل افرین Phe =۱ μM ، گیبنکلامید Gli =۱ μM. تترا اتیل آمونیوم TEA =۱۰ mM، با حضور کلسیم Ca^{2+} = ۲/۵۲ mM + ، بدون حضور کلسیم همراه با EDTA (- Ca^{2+}+ EDTA). مدت اینکوباسیون بافت با گلیبنکلامید، تترا اتیل آمونیوم و ایندومتاسین ۳۰ دقیقه بوده است.

ارتباط گزارش شده است که عملکرد شل کنندگی عروقی پروسیانیدینها که بصورت وابسته به NO و اندوتلیال در آئورت در موش صحرایی می‌باشد، تحت تأثیر حضور ایندومتاسین قرار نمی‌گیرد [۲۵] که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. اگر چه در این تحقیق ترکیبات برگ انگور استخراج نگردیده و اثر این ترکیبات بررسی نشده است ولی با توجه به گزارش اثر شل‌کنندگی ماده quercetin (از فلاوونوئیدها) موجود در برگ انگور [۱۵] که از طریق فعال کردن نیتریک اکساید سنتاز موجب شل شدن آئورت گردیده و نیز از بین رفتن این اثر توسط L-NAME [۲۶]، شاید بتوان پیشنهاد نمود که quercetin موجود در برگ انگور یکی از عوامل مؤثر در عملکرد مهاری عصاره باشد. در نتیجه گیری کلی از این تحقیق می‌توان گفت که ترکیبات موجود در عصاره آبی الکلی برگ انگور (احتمالاً پلی فنلها) با فعال کردن کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم موجب وقوع هیپرپولاریزه شدن در عضله صاف آئورت و شل شدن آن گردیده است. باید اضافه نمود که، مقایسه تحقیقات انجام شده بر اجزاء گیاه انگور نشان می‌دهد که خواص برگ انگور در مقایسه با دانه انگور، کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. با توجه به اثرات مطلوب مشاهده شده از عصاره برگ انگور، طولانی‌تر بودن دوره دسترسی به برگ انگور، سهولت تهیه آن، سهولت عصاره گیری و ارزان تر بودن آن، لذا می‌توان از برگ انگور و مواد استخراج شده آن در تحقیقات بطور گسترده استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز اجراء گردیده و مجریان در این مورد از مسئولین محترم آن دانشگاه تشکر می‌نمایند. ضمناً از آقای دکتر سیاهپوش به جهت شناسایی علمی گیاه قدردانی میگردد.

منابع

[۱] زرگری علی، گیاهان داروئی، چاپ هفتم، تهران، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۶.

[۲] غریب ناصری محمد کاظم، اثر عصاره آبی الکلی برگ انگور بر قلب پرفیوز شده قورباغه. ***طبیب شرق*** ۴ (۱۳۸۲) ۲۲۷ تا ۲۳۵.

[۳] غریب ناصری محمد کاظم، احسانی پروین، اثر ضد انقباضی برگ انگور (Vitis vinifera) بر رحم جدا شده موش صحرایی. ***فیزیولوژی و فارماکولوژی*** ۲ (۱۳۸۲) ۱۰۷ تا ۱۱۴.

[۴] غریب ناصری محمد کاظم، نجفی اردکانی زلیخا، اعتماد ندا، اثر عصاره برگ انگور بر فعالیت مکانیکی ایلئوم موش صحرایی. ***مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد*** ۳ (۱۳۸۳) ۳۵ تا ۴۱.

[۵] غریب ناصری، محمد کاظم، نوید حمیدی مژده، حیدری اکبر. اثر شل کننده عروقی عصاره برگ انگور بر آئورت جدا شده موش صحرایی. ***فصلنامه گیاهان دارویی*** ۹ (۱۳۸۲) ۳۴ تا ۵۴.

[6] Aldini G, Carini M, Piccoli A, Rossoni G, Maffei Facino R, Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. ***Life Sci*** 73 (2003) 2883-2898.

[7] Benito S, Lopez D, Saiz MP, Buxaderas S, Sanchez J, Puig-Parellada P, Mitjavila MT, A flavonoid-rich diet increases nitic oxide production in rat aorta. ***Br J Pharmaco***, 135 (2002) 910-916.

[8] Bilgrami KS, Jeswal P, Control of citrinin caused nephrotoxicosis through aqueous leaf extract of Vitis vinifera L. mercurious corrossivus and cortisone. ***Indian J Exp Biol*** 31 (1993) 482-484.

[9] Bombardelli E, and Morazzoni P, Vitis vinifera L. ***Fitoterapi*** 66 (1995) 291-317.

[10] Chen G, Cheung DW, Characterization of acetylcholine-induced membrane hyperpolarization in endothelial cells. ***Circ Res*** 70 (1992) 257-263.

[11] Chiu CC, Wu JR, Lee CH, Liou SF, Dai ZK, Chen IJ, Yeh JL, Anti-hypertension effect of vanylidilol: a phenylaldehyde alpha/beta-adrenoceptor blocker with endothelium-dependent and K^+ channels opening-associated vasorelaxant activities. ***Pharmacology*** 70 (2004) 140-151.

[12] Cocks TM, Angus JA, Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. ***Nature*** 305 (1983) 627-630.

[13] Dauphin F, Hamel E, Muscarinic receptor subtype mediating vasodilation feline middle cerebral artery exhibits M_3 pharmacology. ***Eur J Pharmacol*** 178 (1990) 203-213.

[14] Derian CK, Moskowitz MA, Polyphosphoinositide hydrolysis in endothelial cells and carotid artery segments. Bradykinin-2 receptor stimulation is calcium-independent. ***J Biol Chem*** 261 (1986) 3831-3837.

[15] Diaz Lanza AM, Elias R, Maillard C, Faure R, de Sotto M, Balansard G, Flavonoids of 3 cultivars vine leaves, Vitis vinifera L. var. tinctoria (Alicante, Carignan, Garnd noir). Value in chemical control. ***Ann Pharm Fr*** 47 (1989) 229-234.

[16] Fitzpatrick DF, Bing B, Maggi DA, Fleming RC, O'Malley R.M, Vasodilating procyanidins derived from grape seed. ***Ann N Y Acad Sci*** 957 (2002) 78-89.

[17] Furchgott RF, Zawadzki JV, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. ***Nature*** 299 (1980) 373-376.

[18] Giardina JB, Green GCM, Rinewalt AN, Granger JP, Khalil, RA, Role of endothelin B receptors in enhancing endothelium-dependent nitric oxide-mediated vascular relaxation during high salt diet. ***Hypertension*** 37 (2001) 516-523.

[19] Guerrero MF, Puebla P, Carron R, Martin ML, Arteaga L, San Roman L, Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. ***J Ethnopharmacol*** 80 (2002) 37-42.

[20] Huang Y, Influence of endothelium in contraction induced by phorbol ester in isolated rat aortic rings. ***Life Sci*** 60 (1997) 1749-1756.

[21] Kiesewetter H, Koscielncy J, Kalus U, Vix JM, Peil H, Petrini O, van Toor BS, deMey C, Efficacy of orally administered extract of red vine leaves AS 195 (folia Vitis vinifera) in chronic venous insufficiency (stages I-II). A randomized, double-blind-placebo-controlled trial. ***Arzneimittelforschung*** 50 (2000) 109-117.

[22] Kim JH, Hong Y, Shim CS, Mechanism of UV light-induced photorelaxation in isolated rat aorta. ***J Vet Sci*** 1 (2000) 81-86.

[23] Kim ND, Kang KW, Kang SY, Vanhoutte PM, Alpha2-adrenoceptor antagonists evoke endothelium-dependent and –independent relaxations in the isolated rat aorta. ***J Cardiovasc Pharmacol*** 34 (1999) 148-152.

[24] Kim ND, Kang SY, Park JH, Schini-Kerth VB, Ginsenoside Rg_3 mediates endothelium-dependent relaxation in response to ginsenosides in rat aorta: Role of K^+ channels. ***Eur J Pharmacol*** 367 (1999) 41-49.

[25] Kim SH, Kang KW, Kim KW, Kim ND, Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. ***Life Sci*** 67 (2000) 121-131.

[26] Kubota Y, Tanaka N, Umegaki K, Takenaka H, Mizuno H, Nakamura K, Shinozuka K, Ginkgo biloba extract-induced relaxation of rat aorta is associated with increase in endothelial intracellular calcium level. ***Life Sci*** 69 (2001) 2327-2336.

[27] Laskey RE, Adams DJ, Purkerson S, Van Breemen C, Cytosolic calcium ion regulation in cultured endothelial cells. ***Adv Exp Med Bio*** 304 (1991) 257-271.

[28] Martinez C, Sanchez M, Hidalgo A, Garcia de Boto MJ, Involvement of K_{ATP} channels in diethylstilbestrol-induced relaxation in rat aorta. ***Eur J Pharmacol*** 413 (2001) 109-116.

[29] Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA, Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. ***Pharmacol Rev*** 43 (1991) 109-142.

[30] Nishida S, Satoh H, Mechanisms for the vasodilations induced by Ginkgo biloba extract and its main constituent, bilobalide, in rat aorta. ***Life Sci*** 72 (2003) 2659-2667.

[31] Noguer MA, Madrero Y, Ivorra MD, D'Ocon P, Characterization of two different Ca^{2+} entry pathways dependent on depletion of internal Ca^{2+} pools in rat aorta. ***Naunyn- Schmiedeberg's Arch Pharmaco*** 357 (1998) 92-99.

[32] Rubanyi GM, The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. ***J Cardiovasc Pharmacol*** 22 (1993) S1-S14.

[33] SatoM, Maulik G, Ray PS, Bagchi D, Das DK, Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidins against ischemic reperfusion injury. ***J Mo. Cell Cardiol*** 31 (1999) 1289-1297.

[34] Singer HA, Peach MJ, Calcium- and endothelial-mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta. ***Hypertension*** 4 (1982) 19-25.

[35] Sung JM, Low KS, Khoo HE, Characterization of the mechanism underlying stonustoxin-mediated relaxant response in the rat aorta in vitro. ***Biochem Pharmacol*** 63 (2002) 1113-1118.

[36] Testai L, Chericoni S, Calderone V, Nencioni G, Nieri P, Morelli I, Martinotti E, Cardiovascular effects of Urtica dioica L. (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. ***J Ethnopharmacol*** 81 (2002) 105-109.

متن کامل این مقاله از طریق وب سایت مجله قابل دسترسی است www.phypha.ir/ppj