نقش آندوتلیوم در اثرات شل کنندگی عروقی عصاره تام میـــــــــوه گیـاه قره قاط (*Ribes biebersteinii*) در آئورت ایزوله رت

حسین بابایی[۱،۲]، افسانه قره باقری*[۱]، طاهره اعتراف اسکویی[۱]، عباس دل آذر[۱،۲]، سولماز اثنی عشر[۱]، صدیقه بامداد مقدم[۱]

[۱]مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. [۲]دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۲۳ ، تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۰/۳

Role of endothelium on Vasorelaxant effect of *Ribes biebersteinii* fruit total extract on rat isolated aorta

Babaei H.[1, 2], Gharehbagheri A. [1]*, Eteraf Oskouei T.[1], Delazar A.[1, 2], Asnaashari S.[1],Bamdad Mogadam S.

[1]Drug Applied Research Center, [2]Faculty of pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Received: 23 Dec. 2008, Accepted: 11 Feb. 2009

Objectives: *Ribes biebersteinii* fruit is used for treatment of hypertension in folk medicine of Azarbaijan. However it's mechanism of action is not studied. This work was aimed to examine the vasorelaxant effect of the *Ribes biebersteinii* fruit total extract (RBE) and role of endothelium in rat isolated aorta. **Methods:** Rings of aorta (3-5 mm length) were prepared and equilibrated in Krebs' solution under 2 g tension. Rings with or without endothelium were contracted by phenylephrine (PHE, 0.1μM) or $PGF_{2\alpha}$ (8 μM) and then exposed to cumulative doses of RBE. In order to asses the role of endothelium in the vasorelaxant effect of RBE, tissues were studied by incubation for 20 min by (L-NAME, 100 μM) or (Methylene blue, 10μM) before contraction by PHE. **Results:** RBE induced relaxation in rat aortic rings pre-contracted with PHE or $PGF_{2\alpha}$ dose–dependently in both intact and endothelium-denuded aortic rings. The differences between the relaxant response of intact and endothelium–denuded rings were not significant (p>0.05). L-NAME and Methylene blue did not affect the RBE-induced relaxant response in rat aortic rings. **Conclusion**: the results indicate that RBE induces relaxation dose-dependently in rat aortic rings precontracted with PHE by a mechanism independent of endothelium function or its productions.

Key Words: *Ribes biebersteinii, Vasorelaxation, Endothelium, Nitric oxide, Rat aorta.*

زمینه و هدف: گیاه قره قاط بطور سنتی برای درمان فشارخون در آذربایجان استفاده می گردد. این تحقیق برای بررسی اثرات شل کنندگی عصاره تام میوه قره قاط در آئورت ایزوله رت و تعیین نقش آندوتلیوم در آن طراحی گردید. **روشها:** آئورت حیوان بعد از ایزوله شدن به قطعات ۵-۳ میلی متری تقسیم و در محلول کربس تحت کشش ۲ گرم قرار گرفت. بافتهای آئورتی با و بدون آندوتلیوم تحت تاثیر فنیل افرین (۰/۱ میکرومولار) و پروستاگلاندین $F_2\alpha$ (۸ میکرومولار) منقبض و سپس با افزایش تدریجی عصاره درصد شلی محاسبه گردید. بمنظور ارزیابی نقش آندوتلیوم دراثر شل کننـدگی عـصاره قـره قـاط، حلقه ها پیش از انقباض به مدت ۲۰ دقیقه در حضور ۱۰۰ میکرومولار L-NAME و یا ۱۰ میکرومولار متیلن بلو انکوبه شدند. **یافته ها:** عصاره تـام میـوه قره قاط به شکل وابسته به دوز باعث ایجاد پاسخ شلی در بافت آئورتی منقبض شده با فنیل افرین ۰/۱ میکرومولار و پروستاگلاندین ۸ میکرومولار شـدند. پاسخ شلی حاصل از عصاره در بافتهای با آندوتلیوم سالم و بدون آندوتلیوم از لحاظ آماری اختلاف معنی داری نداشتند. انکوبه کردن حلقـه هـای آئـورت رت با L-NAME و متیلن بلو تاثیر مهاری بر روی شلی حاصل از عصاره قره قاط نداشتند. **نتیجه گیری:** بر اساس یافته های بدست آمده، عصاره میوه قره قاط بصورت وابسته به دوز، آئورت رت منقبض شده با فنیل افرین را گشاد می کند. این پاسخ شلی مستقل از مسیر نیتریک اکـساید و همچنـین مـستقل از عملکرد آندوتلیوم می باشد.

واژه های کلیدی: *Ribes biebersteinii ، اتساع عروقی، آندوتلیوم، نیتریک اکساید، آئورت رت.*

*نویسنده مسئول: افسانه قره باقری، مرکز تحقیقات کـاربردی داروئـی، دانـشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران، تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۶۳۲۳۴، نـــمابر: ۰۴۱۱-۳۳۶۳۲۳۱

**Corresponding Author: Afsaneh Gharehbagheri, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences,Tabriz, Iran. Tel: +98-411-3363234; Fax: +98-411-3363231; E-mail:garebageri@yahoo.com*

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

در اغلب کشورها بیماریهای قلبی- عروقی علت عمده مرگ ومیر زودرس بوده (۱) و بیش از ۳۰٪ کلیه مرگ و میرها را شامل می شود (۲،۳). این میزان در استان آذربایجانشرقی در سال ۱۳۸۲ ٤٤/٤ درصد(٤) و در سال ۱۳۸٦ ٤۱/۰۸ درصد کل مرگ و میرها را تشکیل می داد (۵). امروزه استفاده از طب سنتی برای درمان بیماریها رواج روزافزونی داشته و شواهد علمی فزاینده ای در مورد تاثیر برخی گیاهان دارویی در درمان ازدیاد فشارخون ارائه می شود. یکی ازاین نوع گیاهان *Ribes biebersteinii* (قره قاط) از خانواده Grossulariaceae می باشد. این گیاه درختچه ای است بدون خار به طول ۱ تا ۲ متر، دارای میوه سته ای، کروی به قطر ۲ تا ٤ میلی متر، قرمز رنگ تا ارغوانی مایل به سیاه و بدون کرک می باشد. این گونه در ارمنستان، قفقاز، جمهوری آذربایجان و ترکیه انتشار دارد. در ایران این گیاه در اهر، جنگلهای ارسباران و کلیبر رشد می کند.

بررسیهای انجام یافته بر روی میوه این گیاه حضور ترکیبات آنتوسیانینی را نشان داده است (٦). آنتوسیانوزیدها خواص وازوپروتکتیو، ضد فشارخون، کاهش تجمع پلاکتی و جلوگیری کننده از اسپاسم عروق کرونری از خود نشان داده اند و از طرفی عاری از هر نوع عارضه جانبی می باشند (۷). عده ای از محققان ژاپنی اخیرا اثرات وازودیلاتوری گونه دیگر از این نوع گیاه، بنام *Ribes nigrum* یا Black currant را بررسی کرده و پی به اثرات شل کنندگی عصاره گونه مزبور در آئورت رت برده اند (۸). اما در خصوص اثرات عروقی قره قاط تاکنون مطالعه ای صورت نگرفته است بنابراین با در نظر گرفتن این امر و نظر به گرایش روز افزان مردم به طب گیاهی و از طرفی مصرف سنتی میوه قره قاط بعنوان ضد فشارخون در آذربایجان، در این مطالعه در وهله اول درصد وزنی آنتوسیانینها و پروآنتوسیانیدینهای موجود در میوه گیاه تعیین و سپس اثرات عروقی میوه گیاه قره قاط *Ribes biebersteinii* بر روی آئورت و نیز نقش آندوتلیوم و نیتریک اکساید در بروز اثر شل کنندگی مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش ها

۲-۱: داروها و مواد مصرفی

کاربـاکول، متـیلن بلـو، L-NAME همگـی از شـرکت Sigma و فنیـــل افـــرین از شـــرکت Cintefina و پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ از شرکت ابوریحان وعصاره قره قاط توسط آزمایشگاه فارماکوگنوزی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی تهیه شدند.

محلول کربس شامل (میلی مول): سدیم کلراید (۱۱۸)، پتاسیم کلراید (٤/۷)، سولفات منیزیم (۱/۲)، فسفات مونوپتاس (۱/۲)، کلسیم کلراید (۱/۲۵)، بیکربنات سدیم (۲۵) و گلوکز است (۱۱).همه ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در تهیه محلول کربس از شرکت Merck بودند.

۲-۲: تهیه نمونه گیاهی

میوه گیاه قره قاط در اواخر فصل تابستان و اوایل پاییز از جنگلهای ارسباران جمع آوری و در آزمایشگاه فارماکوگنوزی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی شناسایی و سپس در دمای آزمایشگاه خشک شدند. میوه های خشک شده توسط آسیاب کاملاً پودر و سپس اقدام به عصاره گیری توسط حلال متانل ۷۰ درصد شد. عمل استخراج ۳ بار تکرار شده و عصاره های حاصل پس از صاف کردن توسط Rotary Evaporator تحت فشار پایین و دمای ۵۰ درجه کاملاً خشک گردید. در نهایت درصد وزنی عصاره تام ۱۷٪ محاسبه شد.

۲-۳: تعیین درصد وزنی آنتوسیانین ها و پروآنتوسیانین ها

به منظور تعیین مقدار آنتوسیانین ها و پروآنتوسیانیدینهای موجود در عصاره تام میوه قره قاط مراحل زیر انجام شد. یک گرم از پودر میوه قره قاط با ۸۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و ۱۵ دقیقه تحت سونیکیت قرار گرفت سپس مخلوط صاف شده به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. از این محلول ۱ میلی لیتر در بالن ژوژه ۲۵ میلی لیتر با بافر pH=۱ به حجم رسانده شد. همچنین همین عمل در خصوص بافر pH=٤/۵ تکرار شد که در نتیجه درصد وزنی آنتوسیانین ها ۳/٤٤ درصد محاسبه گردید. برای تعین درصد وزنی پروآنتوسیانین ها ۱ گرم از پودر میوه توسط ۸۰ میلی لیتر حلال متانول ۵۰ درصد به روش ماسراسیون استخراج شد . عمل استخراج دو بار تکرار گردید. عصاره های صاف شده رویهم جمع آوری و توسط روتاری اواپوراتور اقدام به خارج نمودن متانول آنها شد. باقی مانده توسط آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. بر روی

Archive of SID

www.SID.ir

۵ میلی لیتر از عصاره فوق الذکر ٤٠ میلی لیتر n-بوتانول حاوی ۵ درصد اسید کلریدریک غلیظ افزوده و بلافاصله طیف UV-Visible آن در محدوده ۳۰۰ الی ٦٠٠ نانومتر ترسیم شد . محلول فوق به مدت ۲ ساعت در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از خنک شدن محلول، طیف آن در محدوه ۳۰۰ الی ٦٠٠ نانومتر رسم شد. جذب ماگزیمم این محلول در طول موج ۵۵۰ نانومتر حاصل گردید که در نتیجه عمدتا متشکل از پروسیانیدینها بودند. میزان جذب اولیه (قبل از اعمال گرما) مساوی با ۰/۲٤٦ بود که پس از قرار دادن در دمای ۹۵ درجه ۰/۵۵٦ حاصل شد. اختلاف جذب ۰/۳۱ بوده و درصد پروآنتوسیانیدینها ۱/۸٦ درصد محاسبه شد (۹).

٤-۲: آماده کردن آئورت رت و پاسخهای کنترل

آزمایش بر روی رتهای نر از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم با رعایت کد های بین المللی انجام شد. بعد از بیهوشی حیوان توسط پنتوباربیتال (۵۰ mg/kg) قسمت توراکس حیوان شکافته شده و پس از جدا کردن آئورت رت با احتیاط کامل رگ به قطعات ۵-۳ میلی متری تقسیم و بافت همبند و چربیهای اضافی اطراف شریان جدا شدند. پس از عبور دادن هریک از حلقه ها از بین دو قلاب مثلثی شکل از جنس فولاد زنگ نزن، قلاب مثلثی شکل پایینی در قسمت انتهایی حمام عضو (Organ Bath) حاوی ۱۰ میلی لیتر محلول کربس ثابت گشت. قلاب بالایی نیز توسط نخی، بافت مورد مطالعه را بطور کاملاً عمود به ترانسدیوسر ایزومتریک (Transducer Letica Scientific) متصل می کرد تا پاسخ های عروقی را برای ثبت به دستگاه پاورلب (ADInstrument, Recorder: Power Lab/4Sp, Amplifier:QUAD Brige) منتقل کند. تحت شرایط فوق بافتها در داخل محلول کربس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تحت کشش اولیه ۲ گرم بعنوان کشش اپتیمم قرار گرفتند (۱۱-۱۰) . تنفس بافتی با گاز کاربوژن (٪۵CO_2 + ٪۹۵O_2) تامین گردید. بعد از سپری شدن مدت ٤۵ دقیقه و انطباق یافتن بافتها با شرایط آزمایشگاهی، آزمایشات لازم انجام گرفت در طول زمان انطباق بافتها، از هر ۱۵ دقیقه کشش پایه تنظیم و عمل شستشو انجام می گرفت. قبل از هر آزمایش عملکرد آندوتلیوم در تمام بافتها توسط پاسخ شلی مناسب به کارباکول (۳ میکرومولار) در بافتهای منقبض شده با فنیل افرین (۰/۱ میکرومولار) بررسی شد. برای تهیه محلول عصاره تام میوه قره قاط ۲۰۰ میلی گرم از عصاره خشک شده در یک میلی لیتر آب مقطر حل شده و بمدت ۲ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید سپس مایع رویی از رسوب جزئی آن جدا شده و برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

برای ارزیابی پاسخ شلی محلول عصاره قره قاط منحنی دوز پاسخ به شکل تجمعی نسبت به انقباض حاصل از پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ و فنیل افرین رسم گردید و از روی میزان پاسخ شلی عصاره نسبت به انقباض ناشی از فنیل افرین غلظت مناسب آن (EC_{80}) برای مطالعات بعدی مشخص گردید. برای بررسی نقش آندوتلیوم بر روی شلی حاصل از عصاره، بافتهای عروقی با آندوتلیوم سالم و نیز فاقد آندوتلیوم (تخریب شده) که توسط فنیل افرین (۰/۱ میکرومولار) منقبض شده بودند (۱۲) در معرض EC_{80} عصاره قره قاط قرار گرفتند و در نهایت میزان پاسخ شلی حاصل در هر دو نوع بافت بررسی شد. تخریب آندوتلیوم عروق با سابیدن قسمت داخلی حلقه های رگی بوسیله نخ مناسب بدون تاثیر مهم بر خواص انقباضی ناشی از آگونیست ها انجام گرفت. در بررسی مکانیسم اثر عصاره، بافتها در حضور L-NAME (۱۰۰ میکرومولار) و متیلن بلو (۱۰ میکرومولار) بمدت ۲۰ دقیقه انکوبه (۱۳،۱٤) وسپس با تزریق فنیل افرین(۰/۱ میکرو مولار) منقبض گشتند. بعد از رسیدن انقباض بحالت ثابت و پایدار عصاره قره قاط اضافه گردید و در نهایت درصد کاهش پاسخ انقباضی در حضور عصاره میوه قره قاط محاسبه شده و با گروه کنترل (عدم حضور ترکیبات تاثیر گذار) مقایسه گردید.

۵-۲: روشهای آماری

تمام نتایج بصورت mean ± sem بیان شده اند. در رسم منحنی غلظت – پاسخ، حداکثر پاسخ انقباضی به فنیل افرین و پروستاگلاندین پاسخ صد در صد در نظر گرفته شده و پاسخ شلی به صورت درصد کاهش پاسخ انقباضی بیان شده است. در بررسی مکانیسم، با توجه به اینکه آزمایش کنترل و نیز تست در بافت یکسانی انجام گرفته است، داده ها با Paired – t- test آنالیز شده و در بررسی نقش آندوتلیوم بدلیل انجام آزمایش در ۲ گروه مجزای رت (با آندوتلیوم سالم و تخریب شده) آنالیز آماری با استفاده از Unpaired- t test انجام گرفت. مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در

Archive of SID

www.SID.ir

نظر گرفته شده است. n تعداد حیوانات مورد آزمایش را نشان می دهد.

۳- نتایج

۳-۱ : اثرات عصاره قره قاط بر انقباض ناشی از فنیل افرین

در منحنی دوز - پاسخ حلقه های آئورت رت که با فنیل افرین ۰/۱ میکرومول منقبض شده بودند عصاره قره قاط به شکل وابسته به دوز در فاصله زمانی ۲۵-۲۰ دقیقه اثر شلی نهایی خود را ایجاد کرد که این پاسخ قابل تکرار و برگشت پذیر بود. بر اساس نتایج بدست آمده میزان پاسخ شلی درغلظت های ۱۸۰۰ میکروگرم درمیلی لیتر نسبت به انقباض اولیه ناشی از فنیل افرین، بطور متوسط (۲/۱ ± ۷۶٪) بود. همچنین در غلظتهای کمتر از ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر پاسخ شلی قابل ذکر مشاهده نگردید. میزان پاسخ شلی درغلظت های ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نسبت به انقباض اولیه ناشی از فنیل افرین، بطور متوسط (۳ ± ۵۸/۶٪) بود. با عنایت به اینکه این مقدار در حوالی غلظت موثر ۸۰ در صد (EC_{80}) بود به عنوان دوز استاندارد انتخاب و در مطالعات بعدی برای بررسی مکانیسم اثر، از آن غلظت استفاده گردید (شکل ۲-۱).

۳-۲ : اثرات عصاره قره قاط بر انقباض ناشی از پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$

عصاره قره قاط در آئورت رت منقبض شده با پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ (۸ میکرومول) نیز بصورت وابسته به غلظت اثر شل کنندگی داشته بطوریکه در غلظت µg/ml ۳۰۰۰ بیش از ۹۰ درصد اثر شل کنندگی نسبت به پاسخ انقباضی مشاهده شد این اثرات قابل تکرار وبرگشت پذیر بودند (شکل ۱).

۳-۳ : بررسی نقش آندوتلیوم در اثر شلی ناشی از عصاره میوه قره قاط

آندوتلیوم بطور عمده با تولید و آزادی ترکیبات مختلف می تواند اثر شل کنندگی بر روی عضلات صاف عروق اعمال کند. از جمله این ترکیبات فاکتور شل کننده مشتق از آندوتلیوم (نیتریک اکساید) می باشد در این مطالعه نیز بیشتر نقش نیتریک اکساید مورد توجه بود که با مصرف L-NAME به عنوان مهار کننده نیتریک اکساید سنتتاز و متیلن بلو به عنوان مهارکننده آنزیم گوانیلیل سیکلاز و نیز با تخریب آندوتلیوم مورد مطالعه قرار گرفت. سالم بودن آندوتلیوم عروق توسط پاسخ شلی کارباکول (۳ میکرومولار) در انقباض ناشی از فنیل افرین (۰/۱ میکرومولار) مورد ارزیابی قرار گرفت. در صورتی که پاسخ شلی ناشی از کارباکول بیش از ۵۰ تا ۶۰ درصد بود بافت مورد نظر سالم و آندوتلیوم آن Functional در نظر گرفته شد. لازم بذکر است با تخریب فیزیکی و یا مصرف مهار کننده نیتریک اکساید پاسخ انقباضی به فنیل افرین حفظ و پاسخ شلی به کارباکول از بین می رفت. بدین ترتیب در حلقه های با آندوتلیوم سالم و نیز حلقه های فاقد آندوتلیوم (تخریب فیزیکی) که در معرض ۸۰۰ میکروگرم درمیلی لیتر عصاره قره قاط (EC_{80}) قرار گرفته بودند پاسخ شلی به ترتیب (۱/۷ ± ۵۳٪) و (۳/۱ ± ۵۷/۲٪) بود که از لحاظ آماری اختلاف معنی داری نداشتند (شکل ۳).

۳-۴ : بررسی اثر مهاری L-NAME بر روی شلی ناشی از عصاره میوه قره قاط

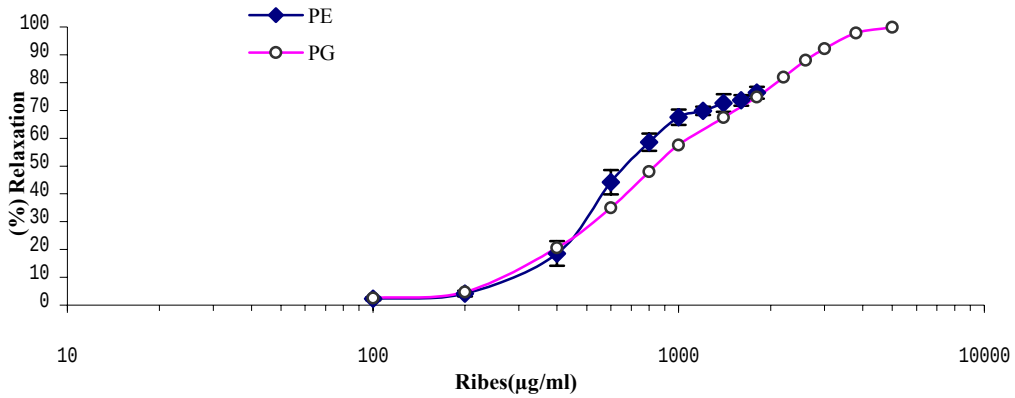
ان- نیترو- ال - آرژنین متیل استر (L-NAME) یک مهار کننده سنتز فاکتور شل کننده مشتق از آندوتلیوم یعنی نیتریک اکساید (NO) از ال – آرژنین در سلولهای آندوتلیال عروق می باشد. برای بررسی نقش نیتریک اکساید حلقه های آئورت رت با آندوتلیوم سالم قبل از انقباض با فنیل افرین (µM ۰/۱) در حضور L-NAME با غلظت µM ۱۰۰ بمدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند. پاسخ شلی ناشی از عصاره قره قاط (µg/ml ۸۰۰) در حضور و عدم حضور L-NAME به ترتیب (۵/۲ ± ۶۳/۳٪) و (۱/۷± ۵۳٪) بود که نه تنها پاسخ شلی عصاره را کاهش نداد بلکه باعث افزایش شلی گردیدکه البته این افزایش معنی دار نبود (۵-۴).

۳-۵ : بررسی اثر مهاری متیلن بلو بر روی شلی ناشی از عصاره میوه قره قاط

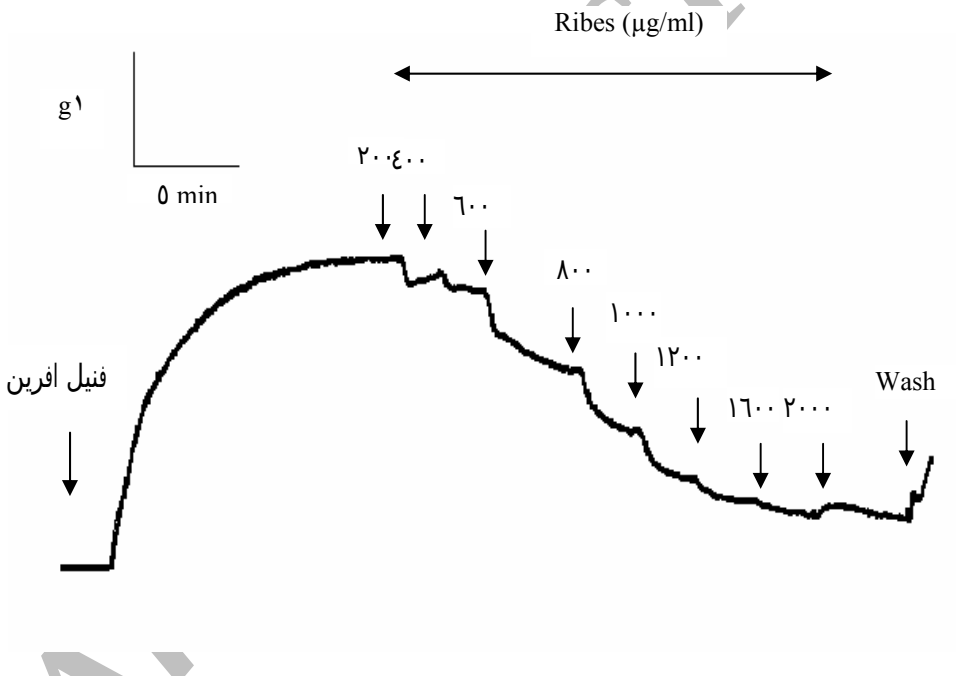
متیلن بلو مانع فعال شدن گوانیلات سیکلاز شده و شلی ناشی از نیتروپروساید، نیتریک اکساید، نیتریتها و نیتراتها را بلوکه می کند (۱۵). انکوبه کردن بافت آئورت رت با آندوتلیوم سالم در حضور متیلن بلو (µM ۱۰) بمدت ۲۰ دقیقه، پاسخ شلی ناشی از عصاره قره قاط (µg/ml ۸۰۰) را از (۱/۷ ± ۵۳٪) به (۴۸ ± ۶۷/۴٪) درحضور متیلن بلو (بطور متوسط ۴۳ ± ۱۴/۵٪) افزایش داد (شکل ۶).

Archive of SID

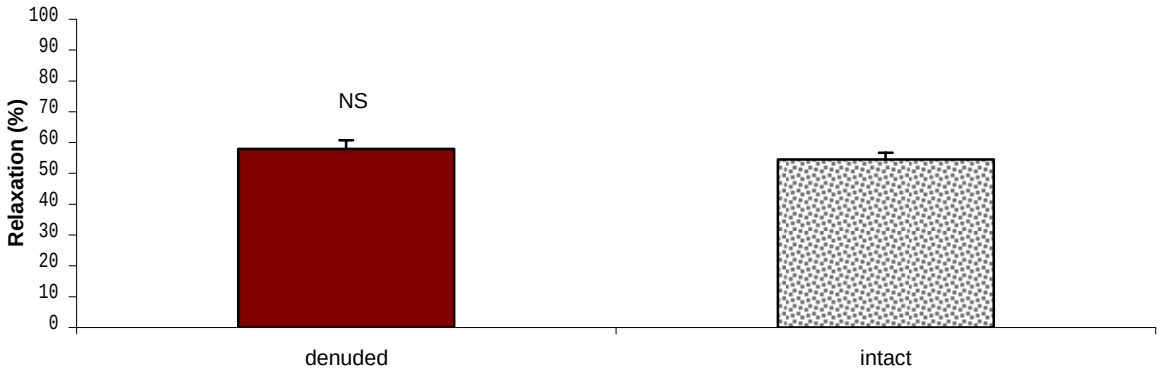
www.SID.ir



شـــــكل ١. اثر شلی غلظتهای فزاینده قره قاط (Ribes) بر روی آئورت ایزوله رت منقبض شده با فنیـل افـرین (PE, ٠/١ µM) و پروسـتاگلاندین $F_{2\alpha}$ (PG, ٨ µM). داده ها (mean ± sem) به صورت درصدی از شلی نسبت به انقباض اولیه ناشی از فنیل افرین، بیان شده است (n =٦).

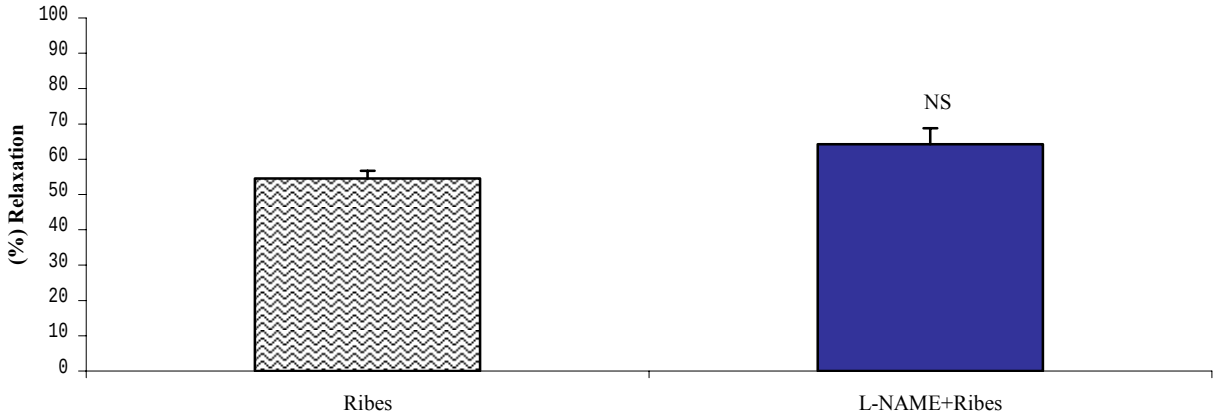


شکل٢. نمونه ای از گراف ثبت شده از اثر شل کنندگی غلظت های فزاینده عصاره قره قاط (Ribes) در انقباض ناشی از فنیل افرین (٠/١ µM) درآئورت رت.

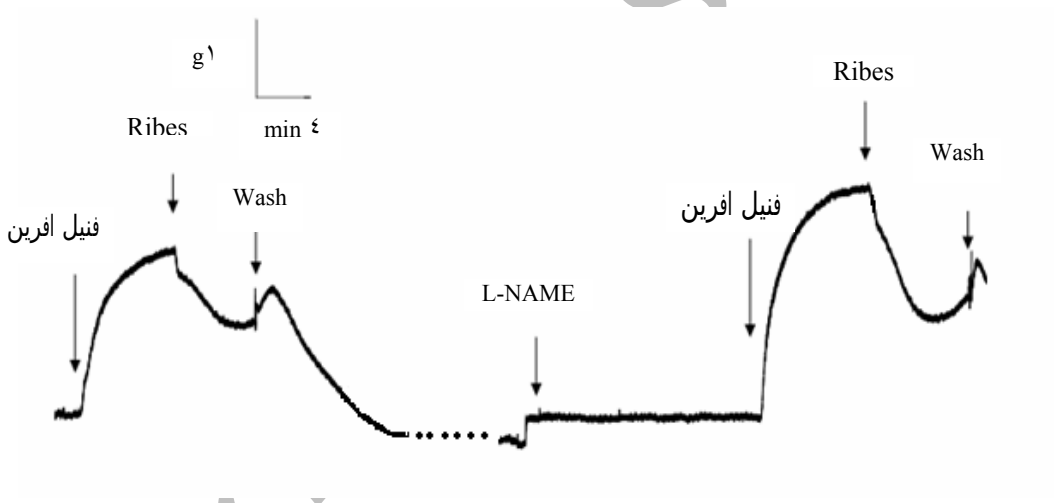


شکل ٣. اثر شلی عصاره قره قاط (Ribes, ٨٠٠ µg/ml) بر انقباض ناشی از فنیل افرین (٠/١ µM) در آئورت رت با آندوتلیوم سالم (intact) و فاقد آندوتلیوم (denuded). داده ها (mean ± sem) بصورت درصدی از شلی نسبت به انقباض اولیه توسط فنیل افرین بیان شده است. (NS: اختلاف معنی دار نیست، $p> ٠/٠٥$) ، (n =٦).

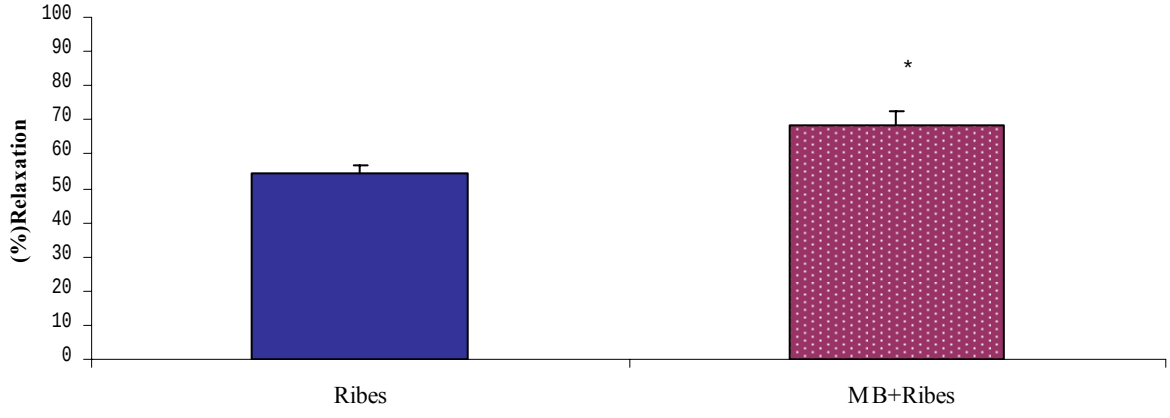
www.SID.ir



شكل ٤. پاسخ شلی ناشی از عصاره میوه قره قاط (Ribes, ٨٠٠ µg/ml) در حضور و عدم حضور L-NAME با غلظت 100 µM بر روی انقباض ناشی از فنیل افرین (٠/١ µM) در آئورت رت. داده ها (mean ± sem) بصورت درصدی از شلی نسبت به انقباض اولیه توسط فنیل افرین بیان شده است (NS: تفاوت معنی دار نیست، ٠/٠٥ <p) ، (n =٦).



شكل ٥. نمونه ای از گراف بررسی اثر L-NAME (١٠٠ µM) بر روی پاسخ شلی عصاره قره قاط (Ribes, ٨٠٠ µg/ml) درانقباض ناشی از فنیل افرین (٠/١ µM) در آئورت رت



شكل ٦. پاسخ شلی عصاره میوه قره قاط (Ribes, ٨٠٠ µg/ml) در زمان حضور و عدم حضور متیلن بلو(MB) با غلظت 10 µM بر روی انقباض ناشی از فنیل افـــرین (٠/١ µM) در آئورت رت. داده ها (mean ± sem) بصورت درصدی از شلی نسبت به انقباض اولیه توسط فنیل افرین بیان شده است (٠/٠٥ <p*) ، (n =٦).

www.SID.ir

٤- بحث

امروزه استفاده از طب سنتی، گیاهان دارویی و نیز مکـــمل های غذایی جهت درمان و پیشگیری در برابر بسیاری از بیماریها در بین عموم مردم دنیا رواج روزافزونی یافته است. عادات غذایی هر منطقه با توجه به نوع محصولات و گیاهان موجود در آن مناطق می تواند عامل مهمی در جلوگیری از ابتلا به بسیاری از امراض از جمله بیماریهای قلب و عروق باشند.

یکی از گیاهانی که مصرف میوه آن بطور سنتی بعنوان داروی ضد فشارخون در مناطق آذربایجان رواج دارد، گیـاه قـره قـاط (*Ribes biebersteinii*) مـی باشـد. بـر اسـاس مطالعـات انجـام شـده روی گونـه دیگـری از جنس Ribes بنـــــام *Ribes nigrum* ثابت شده است که این گونه خاص حاوی ترکیبات پلی فنلی از جمله آنتوسیانین و دارای اثرا ت وازودیلاتوری بارزی بـوده که به صورت وابسته به آندوتلیوم و از طریق افـزایش سنتز نیتریک اکساید در آئورت ایزوله رت اعمال می شـد (٨). امـا در خـصوص گونـه *biebersteinii* (قـره قاط) که در ایران در مناطق ارسـباران رشـد مـی کنـد تاکنون در زمینه اثـرات شـل کننـدگی عروقـی و ضـد فشارخونی این گیـاه بـصورت آزمایـشگاهی و علمـی مطالـــعه ای صورت نگرفته است. لذا برای اولین بار در ایـن مطالعـه در ابتـدا اثبـات و توصـیف علمـی خصوصیات وازو دیلاتوری گیاه قره قاط و در مرحله بعد نقـش آنـدوتلیوم و فـاکتور شـل کننـده مـشتق از آندوتلیوم (نیتریک اکساید) بعنوان مکانیـسم احتمـالی در بروز اثرات شـل کننـدگی عـصاره میـوه قـره قـاط مورد بررسی قرار گرفت.

بر اساس یافته های بدست آمده از تحقیق حاضر عصاره تام میوه قره قاط بر روی حلقه های آئورت رت که در شرایط in vitro با فنیل افرین و یا پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ منقبض شده بودند اثرات شل کنندگی بارزی داشت. همچنین پاسخ فوق الذکر به شکل وابسته به دوز و قابل تکرار و برگشت پذیر اعمال می شد. شایان ذکر است عصاره مورد استفاده بصورت عصاره تام بوده که محتوی چندین ترکیب فـعال می باشند و فقط قسمتی از این ترکیبات قابلیت پاسخگویی بصورت القا اثر شل کنندگی بر روی بافت آئورتی را دارند. این ترکیبات شل کننده با غلظتهای پایین در عصاره تام میوه قره قاط وجود دارند بنابراین برای بروز پاسخ شل کنندگی مناسب، نیاز به استفاده از دوزهای بالای عصاره بود که در صورت آنالیز و جداسازی فراکسیون های مختلف عصاره باحتمال زیاد می توان بجای استفاده از دوزهای بالای عصاره تام از دوزهای پایین ترکیبات موثر جدا شده از فراکسیون های خاص استفاده کرد.

باتوجه به اینکه آندوتلیوم در کنترل تون عروق نقـش دوگانـه ای داشته و فاکتورهای شـل کننـده ای ماننـد نیتریک اکساید، پروستاسایکلین، و فاکتور هیپرپلاریزه کننده مشتق از آنـدوتلیوم و نیـز فاکتورهـای منقـبض کننده مانند آندوتلین و ترومبوکسان A_2 را ترشح مـی نماید، بنابراین تون عـروق بـه تعـادل در ترشـح ایـن فاکتورهـا و همچنـین بـه پاسـخ دهـی عـضله صـاف وابسته اسـت ولـی در ایـن تحقیـق مـشاهده شـد کـه تخریب فیزیکی آنـدوتلیوم حلقـه هـای آئـورتی، اثـر مهاری بـر پاسـخ شـلی حاصـل از عـصاره قـره قـاط نداشته و در مقایسه با حلقه های بـا آنـدوتلیوم سـالم تغییر معنی داری در پاسـخ شـلی، مـشاهده نگردیـد. برای بررسی کاملتر در خـصوص نقـش آنـدوتلیوم در ایجاد پاسخ شـلی حاصـل از گیـاه مزبـور، عـلاوه بـر حذف فیزیکی آندوتلیوم عـواملی ماننـد فـاکتور شـل کننده مـشتق از آنـدوتلیوم (NO) مـورد بررسـی قـرار گرفـت و از ان- نیتـرو ال- آرژینـین متیـل اسـتر (L-NAME) بعنـوان مهـار کننـده سـنتز نیتریـک اکـساید استفاده شد ترکیب فوق آنزیم eNOS را مهار می کند. انکوباسیون حلقه ها در حضور L-NAME بر روی اثـر شلی عصاره میوه قـره قـاط تـاثیر مهـاری نداشـت از اینرو به نظر می رسد که افـزایش سـنتز و آزادسـازی NO نقشی در پاسخ شلی ناشـی از عـصاره قـره قـاط نداشته باشد. همچنین انکوباسـیون بافـت در حـضور متیلن بلو نه تنها باعث کاهش در میزان شلی ناشی از قره قاط نشد، بلکه بصورت معنی داری باعث افزایش میزان شـلی گردیـد کـه نیـاز بـه بررسـیهای بیـشتر و تحقیقات کـاملتر در ایـن خـصوص مـی باشـد. البتـه مسیرها و مکانیسم های متعـدد مـستقل از cGMP مـی تواند باعث ایجاد شلی در عضله صاف عروق شود که از این مـسیرها مـی تـوان بـه مـسیر نیتریـک اکـساید (NO)، پراکـــسی نیتریـــت ($ONOO^-$) و یـــا فـــاکتور هیپرپلاریـزه کننـد مـشتق از انـدوتلیوم اشـاره کـرد. بررسی های الکتروفیزیولوژیک و فارماکولوژیک نقش مهـــم کانالهـــای پتاســـیم را در شـــلی ناشـــی از

Archive of SID

www.SID.ir

هیپرپلاریزاسیون در سلولهای عضلات صاف عروق نشان داده است (١٦) و همچنین اثبات شده است که NO یا -ONOO از طریق فعال کردن کانالهای پتاسیم منجربه شلی عروق می شود (١٧). فعال کردن آنزیم میوزین فسفاتاز یکی دیگر از مکانیسمهای ایجاد شلی در عضلات صاف عروق است که مستقل از مسیر cGMP عمل کرد (١٨) و تحریک احتمالی آن توسط متیلن بلو می تواند مکانیسم دیگری برای افزایش شلی ناشی از عصاره قره قاط در آئورت رت باشد. ولی آنچه که شایان توجه است اینکه کلیه احتمالات فوق برای توجیه اثر متیلن بلو در افزایش شلی ناشی از عصاره قره قاط در آئورت رت زمانی معنی و مفهوم پیدا می کند که احتمال تداخل اثر متیلن بلو با یک یا چند ترکیب موجود در عصاره تام قره قاط مطرح باشد چرا که نه در مطالعات ما (١٩،١،٢٠) و نه در بررسیهای مشابه چنین اثری از متیلن بلو گزارش نشده است (١٦،١٧،٢١) . در مجموع نتایج این بررسی حاکی از این موضوع بود که به احتمال زیاد اثر شل کنندگی عصاره میوه قره قاط از طریق آزادسازی نیتریک اکساید و نیز فعالیت گوانیلیل سیکلاز واسطه گری نمی شود چراکه با تخریب فیزیکی آندوتلیوم اثر شل کنندگی مذکور حذف نمی گردد لذا امکان دارد که اثر شل کنندگی قره قاط ناشی از تاثیر مستقیم بر روی عضلات صاف جدار عروق باشد.

به دنبال آنالیزهای فیتوشیمیایی انجام شده در این مطالعه بر روی میوه قره قاط مشخص شد که عصاره مذکور حاوی آنتوسیانین ها و بطور عمده پروآنتوسیانیدین ها (تانن های کاتشیک و اپی کاتشیک) می باشد. شایان ذکر است فلاونوئیدها ترکیبات پلی فنلی هستند و از ساب کلاسهای مختلفی تشکیل شده اند که ترکیبات آنتوسیانوزیدی، تانن های کاتشیک و اپی کاتشیک و تانن های متراکم (پروآنتوسیانین ها) از جمله آنها محسوب می گردند (٢٢). این ترکیبات بطور گسترده در طیف بزرگی از گیاهان و میوه ها یافت می شوند و دارای اثرات فارماکولوژیکی وسیعی از جمله تنظیم و تعدیل تونیسیته عروق و پاک کننده رادیکالهای آزاد می باشند. تحقیقات نشان داده است یک رژیم غذایی غنی از فلاونوئیدها باعث کاهش ریسک ابتلا به بیماریهای قلبی و عروقی می گردد (٢٣). آنتوسیانینها دارای اثرات دارویی گوناگون بوده که می توان به خصوصیات آنتی اکسیدانی، ضد التهاب، آنتی میکروبیال، آنتی کارسینوژنیک و نیز کاهش ریسک ابتلا به بیماریهای عروق کرونری، اثر وازو دیلاتوری و در نتیجه آنتی هیپرتانسیو اشاره کرد که این اثرات عروقی درترکیبات آنتوسیانوزیدی و نیز الیگومرهای متراکم تانني، بارز می باشد (٧). بر اساس گزارشی ثابت شده است که اثرات شل کنندگی غلظتهای پایین فلاونوئیدها احتمالا توسط ریلیز NOو PGI_2 از آندوتلیوم انجام می پذیرد. علاوه بر این، یافته ها نشان می دهد اثرات شل کنندگی غلظتهای بالاتری از فلاونوئیدها توسط مکانیسم های دیگری اعمال می گردد از جمله می توان به مهار پروتئنهای انقباضی مانند پروتئین کینازC، مهار آنزیمهای مثل فسفودی استراز cAMP، مهار ریلیز کلسیم از منابع داخل سلولی اشاره کرد (٢٤). در تایید این موضوع مشخص شده است که تاننهای کاتشیک و اپی کاتشیک مثبت در غلظتهای بالا دارای اثر شل کنندگی غیر وابسته به آندوتلیوم می باشند که احتمالا از طریق مکانیسمهای دیگری از جمله مهار پروتئین کیناز C، مهار نوکلئوتید فسفودی استراز حلقوی و یا کاهش برداشت Ca^{2+} در سلولهای عضلات صاف جدار عروق اثر خود را اعمال می نمایند (٢٢). در یک مطالعه دیگر نیز ثابت شده است که اثرات وازودیلاتوری کاتشین ها توسط مکانیسم وابسته به آندوتلیوم و نیز مسیرهای غیر وابسته به آندوتلیوم اعمال می گردد مشاهدات حاکی از احتمال اضافه شدن تاثیر بلوک کانال های کلسیمی به سایر پروفایل های شل کنندگی این ترکیب است اما این تفاوت مکانیزم ها جدا از همدیگر به نظر نمی رسند و یک ارتباط متقابل مابین cAMP و مسیرهای polyphosphoinositide وجود دارد که منتهی به ریلیز کلسیم از منابع داخل سلولی و نیز تاثیر آن از طریق کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ می گردد چنانچه cAMP عامل شناخته شده ای برای القا اثر شل کنندگی عضلات صاف می باشد که توسط مهار فسفولیپاز C و اینوزیتول تری فسفات سنتتاز (IP_3)، تبدیل IP_3 به IP_4 و نیز مهار حرکت و نفوذ Ca^{2+} داخل سلولی اعمال می گردد (٢٣). با عنایت به اینکه بر اساس آنالیز انجام شده عصاره میوه قره قاط عمدتاً حاوی تاننهای کاتشیک و اپی کاتشیک و آنتوسیانینها (ساب کلاسهای فلاونوئیدی) می باشند و مطابق چندین گزارش اعلام شده این ترکیبات با

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت های بالا اثر شل کنندگی خود را از طریق مسیرهای غیر وابسته به آندوتلیوم اعمال می کنند لذا می توان پیشنهاد کرد که شاید مکانیسمهای ذکر شده از جمله مهار پروتئین های انقباضی مانند پروتئین کیناز C، مهار آنزیمهای مثل فسفودی استراز cAMP، مهار ریلیز کلسیم از منابع داخل سلولی در خصوص مکانیسم اثرات شل کنندگی عصاره قره قاط نیز صادق باشد که البته نیاز به بررسی و تحقیقات بیشتری می باشد. بر اساس جمع بندی نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر مشخص شد که اثر ضد فشارخونی میوه قره قاط که در طب سنتی استفاده می شود احتمالاً از طریق وازودیلاتاسیون عروقی غیر وابسته به آندوتلیوم اعمـــال می گردد.

۵- تشکر وقدردانی

بدینوسیله از مرکز تحقیقات کاربردی داروئی بخاطر تامین منابع مالی این مطالعه و از آقای دکتر یدالله آذرمی و آقای منصور وطن خواه که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند صمیمانه تشکر می نماییم.

References:

1. Babaei H., Azarmi Y. Effect of Potassium Channels and Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor on Vasorelaxant Effect of 17β-Estradiol in Human Saphenous Vein. Pharmaceutical Sciences. 2008, 14(4): 55-66.
2. Cene C.W., Cooper L.W. Death Toll From Uncontrolled Blood Pressure in Ethnic Populations: Universal Access and Quality Improvement May Not Be Enough. Annals of family medicine, 2008, 6: 486-489
3. Greenland P., Knoll M.D., Stamler J., Neaton J.D., Dyer A.R., Garside D.B., Wilson P.W. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. JAMA, 2003, 290: 891–897.
4. Nagavi M, Death causes in 23 provinces of Iran in 2003. Health Deputy, Iranian Ministry of Health, Tehran, 2005, p 257.
5. Personal Communication, Health Vice Chancellor, Tabriz University of Medical Sciences, Letter No. 5/9/5377 date: 27 Nov. 2008.
6. Delazar A., Afshar D.J., Resazadeh H. Investigation on Anthocyanins of Ribes bieberstinii BERL. From Arasbaran region of Azarbaijan (Iran), 9th ACCB and 28th Annual conference of ACBI, New Dehli, India, 2002, 9-11 March.
7. Mazza G. Anthocyanins and Cardiovascular Health. World of Food Science, 2007, July: 1-6.
8. Nakamura Y., Matsumoto H., Todoki K. Endothelium-dependent vasorelaxation induced by Black currant concentrate in Rat thoracic aorta. Jpn. J. Pharmacol., 2002, 89: 29-35.
9. Bate-Smith E.C. Phytochemistry of proanthocyanidins. Phytochemistry, 1975, 14: 1107–1975.
10. Zhang L., Peng S., Wang S. Influence of lead (Pb^{+2}) on the reaction of in vitro cultured rat aorta to 5- hydroxytryptamine. Toxicology Letters, 2005, 159: 71-82.
11. Tanaka M., Tokuyasu M., Matsui T., Matsumoto K. Endothelium-independent vasodilation effect of di- and tri-peptides in thoracic aorta of Sprague-Dawley rats. Life Sciences, 2008, 82: 869-875.
12. Leblais V., Krisa S., Valls J., Courtos A., Abdelouhab S., Vila AM., Merillon JM., Muller B. Relaxation induced by red wine polyphenolic compounds in rat pulmonary arteries: Lake of inhibition by NO- synthase inhibitor. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2008, 22: 25-35.
13. Morrello S., Vellecco V., Alfieri A., Mascolo N., Cicala C. Vasorelaxant effect of the flavnoid galangin on isolated rat thoracic aorta. Life Sciences, 2006, 78: 825-830.
14. Ajay M., Chai H.J, Mustafa A.M., Gilani A.H., Mustafa M.R. Mechanisms of the anti-hypertensive effect of Hibiscus Sabdariffa L. Calyces. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 109: 388-393.
15. Rattman Y.D., Cipriani T.R., Sassaki G.L., Iacomini M., Rieck L., Marques M.C., Dasilva-Santos J.E. Nitric oxide – dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of Maytenus ilicifolia Mart ex Reissek (Celastraceae) leavs. J. Ethnopharmacol., 2006, 104(3): 328-335.
16. Wilson A.J., Clapp L.H. The molecular site of action of K (ATP) channel inhibitors determines their ability to inhibit iNOS-mediated relaxation in rat aorta. Cardiovasc. Res., 2002, 56: 154-163.
17. Balotina V.M., Najibi S., Palacino J.J., Pagano P.J., Cohen R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular Smooth muscle. Nature, 1994, 368: 850-853.
18. Horowitz A., Menice C.B., Laporte R., Morgan K.G. Mechanism of Smooth muscle Contraction, physiol. Rev. 1996, 76: 967-1003.
19. Babaei H., Azarmi Y. 17beta-estradiol inhibits calcium-dependent and -independent contractions in isolated human saphenous vein. Steroids, 2008, 73(8): 844-50.
20. Babaei H., Evans A.T., Irving G., McCurrie J.R. Protein kinase inhibition and the oestrogen-like relaxant effects of genistein on

Archive of SID

www.SID.ir

isolated rat aorta. Biochem. Soc. Trans., 1997, 25(1): 111S.
21. Vidrio H., Fernandez G., Medina M., Alvarez E., Orallo F. Effects of hydrazine derivatives on vascular smooth muscle contractility, blood pressure and cGMP production in rats: comparison with hydralazine. Vascular Pharmacology, 2003, 40: 13-21.
22. Andriambeloson E., Magnier Celine., Haan – Archipoff G., Lobstein A., Anton R., Beretz A., Stoclet J.C., Andriantsitohaina R. Natural Dietary polyphenolic compounds cause Endothelium- Dependent vasorelaxation in rat thoracic Aorta. The Journal of Nutrition, 1998, 128(12): 2324-2333.
23. Ghayur M.N., Khan H., Gilani A.H. Antispasmodic, Bronchodilator and Vasodilator Activities of (+) – catechin, anaturraly occurring flavonoid. Arch Pharm. Res., 2007, 30 (8): 970-975.
24. Ajay M., Gilani A.H., Mustafa M.R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. Life Sciences, 2003, 74: 603–612.

Archive of SID

www.SID.ir