اثر ضد انقباضی عصاره آبی الکلی برگ انگور درکولون موش صحرایی

*[1]دکتر محمد کاظم غریب ناصری، [2]سید محمد زارعی، امید امیری

تاریخ دریافت: ۸۴/۵/۱۲
تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۱/۱۲

چکیده

هدف

تاکنون اثر شل‌کننده عصاره برگ انگور بر انقباضات آئورت، رحم و ایلئوم در موش صحرایی گزارش شده است. اثر ضد انقباضی این عصاره در آئورت وابسته به اندوتلیال و عمدتا با دخالت نیتریک اکساید انجام می‌شود و در ایلئوم و رحم انسداد کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ دخالت دارد. هدف از این تحقیق بررسی اثر این عصاره بر انقباضات ناشی از چند محرک شناخته شده در کولون موش صحرایی و بررسی مکانیسم این اثر می‌باشد.

مواد و روش کار

عصاره برگ انگور به روش خیساندن پودر برگ انگور به مدت ۷۲ ساعت در الکل ۷۰٪ تهیه شد. بخش دیستال کولون موشهای صحرایی نر بالغ (Sprague Dawley) در حمام بافت حاوی محلول تایرود (۳۷°C) تحت ۱ گرم کشش قرار داده شد و انقباضات آن به کمک ترانسدیوسر ایزوتونیک ثبت گردید.

نتایج

نتایج نشان داد که، عصاره آبی الکلی برگ انگور (به صورت تجمعی ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ mg/ml) انقباض ناشی از کلرور پتاسیم (۶۰ mM)، کلرور باریم (۴ mM) و استیل‌کولین (۱ μM) را به صورت وابسته به غلظت کاهش می‌دهد (p<۰/۰۰۱). اثر شل کننده عصاره توسط نالوکسون (۱ μM) کاهش نیافت. از طرف دیگر مهار کننده آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (۳۰۰ μM، L-NAME) و پروپرانولول (۱ μM) و فنتولامین (۱ μM) اثری بر عملکرد مهاری عصاره نداشتند. کاهش کلسیم محیط موجب کاهش عملکرد مهاری عصاره شد. حضور گلیبنکلامید (۳ μM) اثری بر عملکرد عصاره نداشت اما تترا اتیل آمونیوم (۵ mM) سبب بروز انقباض ایلئوم گردید.

نتیجه گیری

این نتایج نشان می‌دهند که بخشی از عملکرد مهاری عصاره برگ انگور با دخالت کانالهای کلسیم وابسته به ولتاژ و بخشی دیگر این عملکرد مهاری با دخالت کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم انجام می‌شود. همچنین این نتایج نشان دادند که عملکرد مهاری این عصاره بدون دخالت نیتریک اکساید و گیرنده های بتا آدرنرژیک، آلفا آدرنرژیک و اوپیوئیدی انجام می‌شود. این نتایج می‌توانند مؤید مصرف سنتی برگ انگور جهت درمان اسهال باشد.

کلمات کلیدی : برگ انگور، موش صحرایی، انقباضات کولون.

۱- دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۳۳۰۰۷۴-۰۶۱۱ ، نمابر : ۳۳۳۲۰۳۶-۰۶۱۱، gharibnaseri_m@yahoo.com
۲- دانشجوی دوره دکترای داروسازی

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

انگور (*Vitis vinifera*) گیاهی است از خانواده Vitaceae که منشا آنرا شمال غربی ایران می‌دانند (۱) و برگ آن در ایران به مقدار کم در رژیم غذایی (دلمه برگ انگور) مصرف می‌شود. برگهای جوان انگور به صورت جوشانده در رفع دیسانتری، خونرویها، عدم دفع ادرار، اختلالات گردش خون در زمان بلوغ و یا یائسگی مصرف می‌شود (۲). از جمله ترکیبات مهم شناخته شده در انگور، پروسیانیدینها از گروه پلی فنلها می‌باشند (۱). عصاره دانه انگور سبب کاهش غلظت لیپیدهای خون خرگوشهای مبتلا به هیپرلیپیدیمیا شده (۳) و پروسیانیدینهای دانه انگور سبب شل شدن وابسته به اندوتلیال در آئورت جدا شده انسان شده (۴) و گزارش شده است که این شلی از طریق NO و با افزایش cGMP انجام می‌شود (۵، ۶).

اثرات حفاظتی پروسیانیدینهای دانه انگور در برابر کاتاراکت (۷)، سرطان پستان و کولون (۸) نیز ذکر شده است. از طرف دیگر گزارش شده است که برگ انگور جهت درمان عدم کفایت مزمن وریدی (chronic venous insufficiency) در انسان (۹) و بهبود نفروتوکسیکوزیس ناشی از citrinin مفید می‌باشد (۱۰). بنا به تحقیقات جدید، عصاره آبی الکلی برگ انگور سبب مهار انقباض ایلئوم ناشی از کلرورپتاسیم و استیل‌کولین (۱۱)، مهار انقباض ناشی از اکسی‌توسین در رحم موش صحرایی (۱۲)، کاهش نیروی انقباضی و ضربان قلب جدا شده قورباغه (۱۳) می‌شود. همچنین گزارش شده است که عصاره برگ انگور با دخالت نیتریک اکساید و cGMP موجب کاهش انقباض ناشی از فنیل افرین در آئورت با اندوتلیال سالم می‌شود (۱۴).

مقایسه تعداد تحقیقات روی دانه انگور و برگ آن نشان می‌دهد که خواص برگ انگور کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. با توجه به نقش تحریک کولون در بروز اسهال و همچنین ضرورت شناخت اثرات فارماکولوژیک گیاهان، هدف این تحقیق تعیین اثرات و نیز بررسی مکانیسم(های) اثر عصاره آبی الکلی برگ انگور بر فعالیت انقباضی ناشی از محرکهای شناخته شده در عضله صاف کولون موش صحرایی می‌باشد.

مواد و روش کار

تهیه عصاره : برگهای سبز و تازه انگور در خرداد ماه ۱۳۸۳ از مرکز تحقیقات انگور شهرستان شیراز تهیه و خرد گردید و پس از خشک کردن در سایه، آسیاب شده و به صورت پودر ریز درآمد. پودر برگ به مدت ۷۲ ساعت در الکل ۷۰٪ و در دمای آزمایشگاه خیسانده شد (۱۴) و هر روز در چند نوبت مخلوط هم زده شد. سپس، مخلوط از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده و محلول عصاره روی سطح شیشه گسترده شد تا حلال در دمای اتاق تبخیر شود. با تراشیدن عصاره خشک شده از روی سطح شیشه، پودر عصاره با نسبت استخراج ۱۹٪ به دست آمد که تا زمان استفاده در دمای ۴ °C نگهداری می گردید.

حیوانات و آماده سازی کولون: موشهای صحرایی نر از نژاد Sprague Dawley (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) تهیه شده از اتاق حیوانات دانشکده پزشکی اهواز در دمای ۲۰ تا ۲۴ °C و سیکل روشنایی ـ تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شده و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند اما ۲۴ ساعت قبل از آزمایش، با قرار دادن موشها در قفسهایی با کف توری ضمن دسترسی آزاد به آب، از غذا محروم می‌شدند. موشها با دی‌اتیل اتر عمیقاً بیهوش شده، شکم باز شده و از بخش دیستال کولون، قطعه‌ای به طول حدود ۱۵ mm جدا نموده و بلافاصله با محلول سرد و اکسیژنه تایرود درون آن شسته شده و سپس درون حمام بافت (۱۰ml) و بین دو قلاب استیل زنگ نزن قرار داده شد. قلاب تحتانی در ته حمام بافت ثابت بود و دیگری به وسیله نخ به ترانسدیوسر ایزوتونیک (Harvard IsotonicTransducer) متصل بود. پاسخ انقباضی به وسیله دستگاه ثبات (Universal Harvard Osilloghraph) بر روی کاغذ ثبت می‌شد. ترکیب محلول تایرود (۳۷ °C ، ۷/۴ =pH) برحسب mM به قرار زیر بود (۱۵): NaCl (۱۳۶)، KCl (۲/۷)، $CaCl_2$ (۱/۸)، $MgCl_2$ (۱/۸)، NaH_2PO_4 (۰/۳)، $NaHCO_3$ (۱۲) و گلوکز (۵/۶). جریان دائم حبابهای کوچک هوا از ته حمام برقرار بود. میزان کشش اولیه ۱ گرم و مدت دوره سازگاری ۶۰ دقیقه بود (۱۵) که طی این مدت هر ۱۵ دقیقه محلول حمام تعویض می‌گردید. کلیه نمکها و گلوکز از شرکت مرک (آلمان)، L-NAME ، پروپرانولول، استیل‌کولین، گلیبنکلامید و تترا اتیل آمونیوم از

Archive of SID

www.SID.ir

شرکت سیگما (آمریکا)، فنتولامین از شرکت Novartis (آمریکا) و نالوکسون هیدروکلراید از شرکت تولید دارو (ایران) تهیه شده بودند.

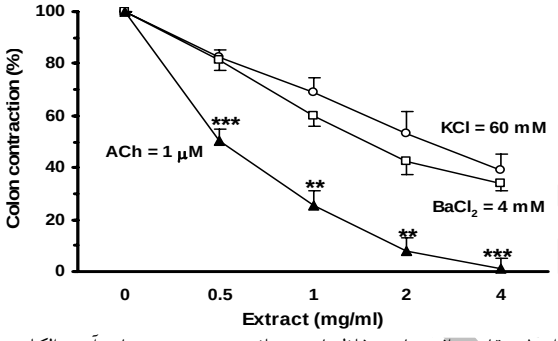
مراحل کار: ابتدا، طی دو مرحله جداگانه پاسخ انقباضی کولون به کلرور پتاسیم (۶۰mM) به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه ثبت شد تا از تکرارپذیر بودن پاسخ انقباضی و پایداری انقباض بافت اطمینان حاصل شود. پس از سه بار تعویض محلول حمام با تایرود تازه و حداقل ۱۵ دقیقه استراحت، مجددا کلرور پتاسیم با غلظت قبلی به حمام اضافه شد و پس از رسیدن انقباض به حالت پایدار، غلظتهای تجمعی عصاره (۰/۵، ۱، ۲ و ۴ mg/ml) به حمام اضافه شد. اضافه نمودن غلظتهای بیشتر عصاره مشروط به کفه شدن حالت انقباضی بافت بود. همین مراحل در مورد کلرور باریم (۴mM) و استیل کولین (۱ µM) نیز در بافتهای دیگر انجام می گردید. جهت بررسی نقش نیتریک اکساید، گیرنده های اوپیوئیدی، گیرنده های آلفا و بتا آدرنرژیک، کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP بر عملکرد عصاره، ابتدا شلی ناشی از غلظت ۰/۵ mg/ml عصاره بر انقباض ناشی از استیل کولین (۱ µM) ثبت می گردید و همین مراحل پس از ۳۰ دقیقه حضور مهار کننده نیتریک اکساید سنتاز (L-NAME)، نالوکسون، فنتولامین، پروپرانولول، گلیبنکلامید تکرار شد. جهت بررسی اثر تترا اتیل آمونیوم، ابتدا ایلئوم به وسیله کلرور پتاسیم (۶۰ mM) منقبض شده و در حالت کفه، عصاره (۱ mg/ml) اضافه و پس از بروز شلی و کفه شدن آن، تترا اتیل آمونیوم (۵ mM، TEA) اضافه می‌شد. در هر بافت فقط از یک نوع مهار کننده و یا آنتاگونیست استفاده شد. حلال عصاره و کلیه مواد در این قسمت از تحقیق، محلول تایرود بود و غلظتهای ذکر شده، غلظت نهایی مواد درون حمام بافت می‌باشند.

روشهای بررسی آماری نتایج: انقباض ناشی از به کار بردن محرک به عنوان ۱۰۰٪ تلقی گردید و تغییرات نیروی انقباضی ناشی از حضور عصاره به صورت درصد (٪) اندازه گیری شد و Mean ± SEM هر گروه محاسبه گردید. نتایج با استفاده از آزمونهای آماری t-test (جهت مقایسه دو میانگین) و ANOVA یکطرفه (جهت مقایسه رابطه بین اثر غلظتهای مختلف عصاره بر عملکرد انقباضی) مقایسه شده و مقادیر p کوچکتر از ۰/۰۵ قابل ملاحظه تلقی گردید.

نتایج

اثر عصاره آبی الکلی برگ انگور بر انقباضات ناشی از کلرورپتاسیم، کلروربایریم و استیل‌کولین

همانطوری که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، اضافه کردن تجمعی عصاره آبی الکلی برگ انگور (۰/۵، ۱، ۲ و mg/ml ۴) به صورت وابسته به غلظت، انقباض ناشی از کلرورپتاسیم با غلظت mM ۶۰ (۱۶)، کلرور باریم با غلظت mM ۴ (۱۷) و استیل کولین با غلظت µM ۱ (۱۸) را کاهش داده است (در هر سه مورد p< ۰/۰۰۰۱ و n=۸). به عبارت دیگر با افزایش غلظت عصاره اثر ضد انقباضی آن افزایش یافته است. مقایسه این اثرات مهاری نشان می‌دهد که عملکرد مهاری عصاره بر انقباض ناشی از استیل کولین بیش از اثر مهاری عصاره بر انقباض دو محرک دیگر است. ضمناً، هر بافت فقط مورد تأثیر یک ماده محرک قرار گرفته بود.

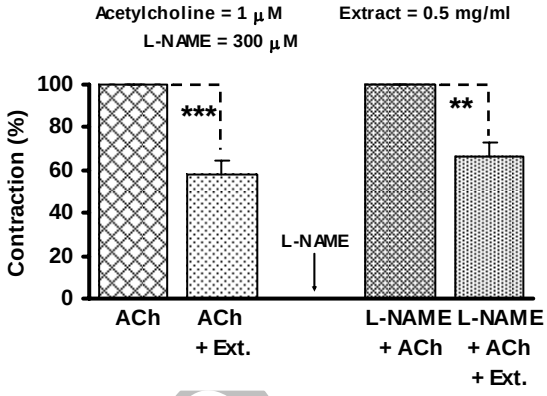


نمودار ۱ : مقایسه اثر مهاری غلظتهای مختلف و تجمعی عصاره آبی الکلی برگ انگور بر انقباض کولون موش صحرایی ناشی از کلرورپتاسیم، کلرور باریم و استیل‌کولین. مقایسه آماری اثر غلظتهای مختلف عصاره با روش ANOVA نشان می‌دهد که برای هر یک از سه محرک به کار رفته با p کوچکتر از ۰/۰۰۰۱ معنی‌دار می‌باشد. همانطوری که مشاهده می‌شود اثر مهاری عصاره بر انقباض ناشی از استیل‌کولین (در مقایسه با کلرور باریم) قوی‌تر می‌باشد (p< ۰/۰۰۱ **، p<۰/۰۰۰۱ *** و n=۸).

اثر مهاری عصاره بر انقباض ناشی از استیل‌کولین در حضور مهار کننده نیتریک اکساید سنتاز

نمودار ۲ اثر مهاری عصاره آبی الکلی برگ انگور (mg/ml ۰/۵) بر انقباض ناشی از استیل کولین (۱ µM) در غیاب و در حضور L-NAME با غلظت µM ۳۰۰ (۱۹) را نشان می‌دهد (n=۷). همانطوری که در این نمودار مشخص می‌باشد، حضور مهار کننده آنزیم نیتریک اکساید سنتاز، اثری بر عملکرد مهاری عصاره نداشته که نشان دهنده عدم دخالت نیتریک اکساید در بروز اثر مهاری این عصاره می‌باشد.

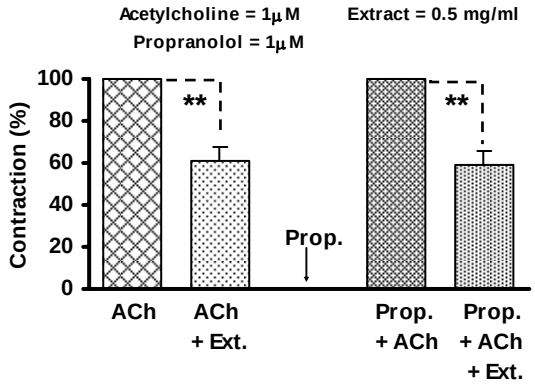
Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۲: مقایسه اثر مهاری عصاره آبی الکلی برگ انگور بر انقباض کولون موش صحرایی ناشی از استیل‌کولین در غیاب و در حضور (۳۰ دقیقه) مهار کننده آنزیم نیتریک اکساید سنتاز. نمودار نشان می‌دهد که حضور L-NAME اثری بر عملکرد مهاری عصاره ندارد. آزمون آماری t-test بین انقباضها در غیاب و در حضور عصاره انجام شده است (*** p< ۰/۰۰۰۱ ، ** p<۰/۰۰۱ و n= ۷).

اثر مهاری عصاره بر انقباض ناشی از استیل‌کولین در حضور پروپرانولول

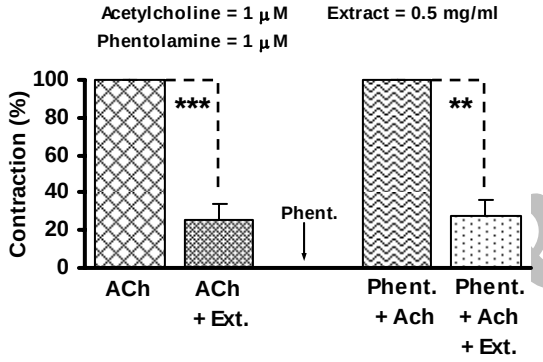
نمودار ۳ اثر مهاری عصاره آبی الکلی برگ انگور (۰/۵ mg/ml) بر انقباض ناشی از استیل‌کولین (۱ μM) در غیاب و در حضور پروپرانولول با غلظت ۱ μM (۲۰) را نشان می‌دهد (n=۷). عدم تأثیر حضور پروپرانولول نشان می‌دهد که گیرنده های بتا آدرنرژیک در عملکرد مهاری عصاره دخالتی ندارند.



نمودار ۳ : مقایسه اثر مهاری عصاره آبی الکلی برگ انگور بر انقباض کولون موش صحرایی ناشی از استیل‌کولین در غیاب و در حضور (۳۰ دقیقه) آنتاگونیست گیرنده های بتا ـ آدرنرژیک (پروپرانولول). نمودار نشان می‌دهد که حضور پروپرانولول اثری بر عملکرد مهاری عصاره ندارد. آزمون آماری t-test بین انقباضها در غیاب و در حضور عصاره انجام شده است (** p<۰/۰۰۱ و n= ۷).

اثر مهاری عصاره بر انقباض ناشی از استیل‌کولین در حضور فنتولامین

به منظور تعیین دخالت گیرنده های آلفاـ آدرنرژیک در عملکرد عصاره، از فنتولامین (۱ μM) استفاده شد. به این منظور یکبار تأثیر عصاره (۰/۵ mg/ml) بر انقباض ناشی از استیل‌کولین ثبت شد و سپس این عمل پس از ۳۰ دقیقه حضور فنتولامین (آنتاگونیست غیر انتخابی آلفاـ آدرنوسپتورها) با غلظت ۱ μM (۲۰) تکرار شد (n=۷). نتایج این مرحله که در نمودار ۴ آمده است نشان می‌دهد که حضور این آنتاگونیست بر عملکرد مهاری عصاره اثری نداشته و لذا نشان دهنده عدم دخالت گیرنده های آلفا در عملکرد مهاری عصاره است.



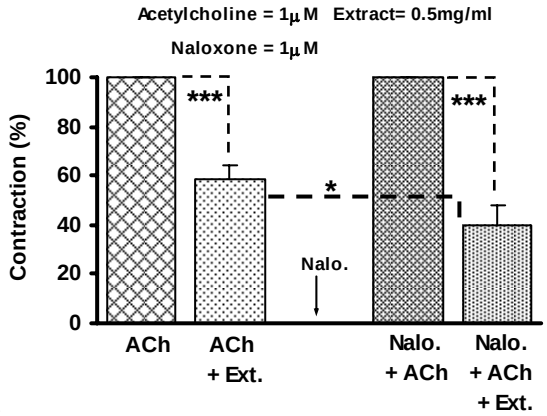
نمودار ٤ : مقایسه اثر مهاری عصاره آبی الکلی برگ انگور بر انقباض کولون موش صحرایی ناشی از استیل‌کولین در غیاب و در حضور (۳۰ دقیقه) آنتاگونیست گیرنده های آلفا ـ آدرنرژیک (فنتولامین). نمودار نشان می‌دهد که حضور فنتولامین اثری بر عملکرد مهاری عصاره ندارد. آزمون آماری t-test بین انقباضها در غیاب و در حضور عصاره انجام شده است (*** p< ۰/۰۰۰۱ ، ** p<۰/۰۰۱ و n= ۷).

اثر مهاری عصاره بر انقباض ناشی از استیل‌کولین در حضور نالوکسون

فعال شدن گیرنده های اوپیوئیدی سبب مهار انقباض کولون می‌شوند. به منظور تعیین دخالت این گیرنده ها، یکبار تأثیر مهاری عصاره (۰/۵ mg/ml) بر انقباض ناشی از استیل‌کولین (۱ μM) ثبت شد و سپس این عمل پس از ۳۰ دقیقه حضور نالوکسون (آنتاگونیست غیر انتخابی گیرنده های اوپیوئیدی) با غلظت ۱ μM (۱۹) تکرار گردید. نمودار ۵ نشان

Archive of SID
www.SID.ir

می‌دهد که مهار این گیرنده ها حتی موجب تقویت عملکرد مهاری عصاره گردید ($p<0/05$ و $n=8$). لذا به نظر نمی‌رسد که گیرنده های اوپیوئیدی در عملکرد مهاری عصاره نقش داشته باشند.

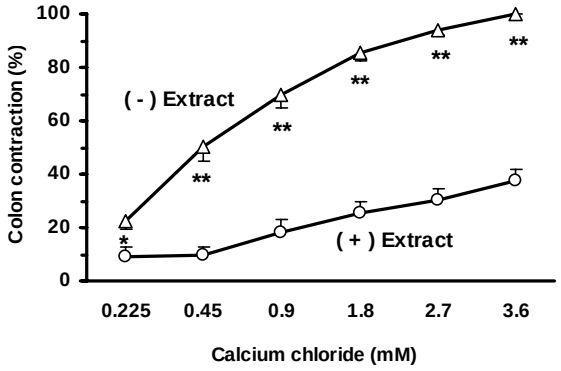


نمودار ۵: مقایسه اثر مهاری عصاره آبی الکلی برگ انگور بر انقباض کولون موش صحرایی ناشی از استیل‌کولین در غیاب و در حضور (۳۰ دقیقه) آنتاگونیست گیرنده های اوپیوئیدی (نالوکسون). نمودار نشان می‌دهد که حضور نالوکسون نه فقط موجب کاهش اثر مهاری عصاره نشده است بلکه سبب تقویت اثر مهاری عصاره نیز شده است. آزمون آماری t-test بین انقباضها در غیاب و در حضور عصاره انجام شده است ($p<0/0001$ ***، $p<0/05$ * و $n=8$).

بررسی نقش کلسیم در عملکرد مهاری عصاره

به منظور تعیین نقش کلسیم مایع خارج سلولی، در محلول تایرود بدون کلسیم و دارای پتاسیم بالا (۱۲۰ mM)، به تدریج کلسیم به صورت تجمعی (۰/۲۲۵، ۰/۴۵، ۰/۹، ۱/۸، ۲/۷ و ۳/۶ mM) به حمام بافت اضافه شد. سپس همین مراحل در حضور عصاره(۰/۵ mg/ml) تکرار شد. نمودار ۶ نشان می‌دهد که در حضور عصاره، اثر تحریکی ناشی از افزایش تدریجی کلسیم محیط کاهش یافته است ($p<0/001$ و $n=7$).

این نتیجه نشان می‌دهد که عملکرد مهاری عصاره وابسته به حضور کلسیم خارج سلولی می‌باشد. در این نمودار انقباض ناشی از حداکثر غلظت کلرورکلسیم و در غیاب عصاره به عنوان ۱۰۰٪ در نظر گرفته و تأثیر حضور عصاره نسبت به همین حالت محاسبه شده است.

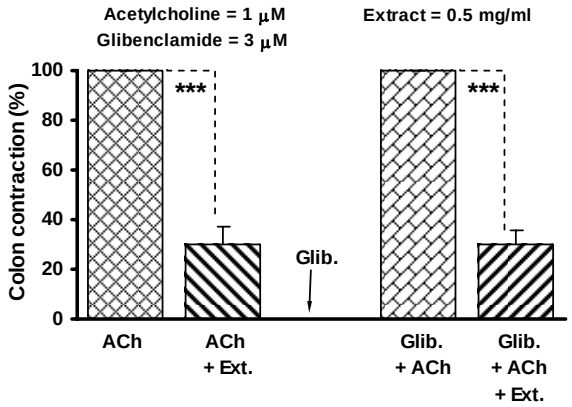


نمودار ٦ : مقایسه اثر افزایش غلظت کلسیم محلول تایرود حمام بافت در بروز انقباض کولون دپولاریزه شده با کلرورپتاسیم (۱۲۰ mM). این اثر انقباضی در غیاب عصاره آبی الکلی برگ انگور (Extract–) و در حضور عصاره (Extract +) با غلظت ۰/۵ mg/ml در این نمودار نشان داده شده است. آزمون آماری t-test بین انقباضها در غیاب و در حضور عصاره در هر غلظت کلرورکلسیم انجام شده است ($p<0/0001$ **، $p<0/01$ * و $n=7$).

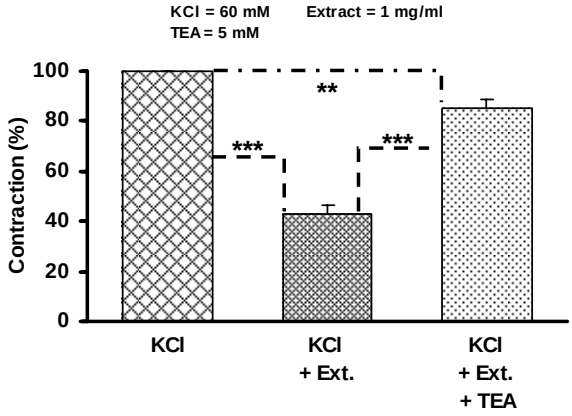
بررسی دخالت کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم در عملکرد مهاری عصاره

شل شدن عضله صاف می‌تواند نتیجه باز شدن کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP و یا وابسته به کلسیم باشد. لذا، در این مرحله، عملکرد عصاره در حضور گلیبنکلامید (مسدود کننده کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP) و در بافت کولون دیگر در حضور تترا اتیل آمونیوم (مسدود کننده کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم) بررسی گردید. به این منظور یکبار اثر عصاره (۰/۵ mg/ml) بر انقباض ناشی از استیل‌کولین ثبت شد و سپس بعد از ۳۰ دقیقه حضور گلیبنکلامید با غلظت ۳ μM (۲۱) تکرار و ثبت شد. نمودار ۷ نشان می‌دهد که حضور گلیبنکلامید اثری بر عملکرد مهاری عصاره ندارد. از طرف دیگر در نمودار ۸ دیده می‌شود که کولون منقبض شده به وسیله کلرورپتاسیم (۶۰ mM) توسط عصاره (۱ mg/ml) شل شد ($p<0/0001$ ، $n=7$) ولی با اضافه کردن تترا اتیل آمونیوم با غلظت ۵ mM (۲۱) مجدداً منقبض گردید ($p<0/0001$ ، $n=7$) ولی این انقباض به سطح انقباض ناشی از کلرورپتاسیم نرسید ($p<0/01$ ، $n=7$). لذا به نظر می‌رسد که کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم در بروز شلی ناشی از عصاره دخالت داشته باشند.

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۷ : تأثیر حضور (۳۰ دقیقه) گلیبنکلامید (مسدود کننده کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP) بر عملکرد مهاری عصاره آبی الکلی برگ انگور در کولون موش صحرایی. همانطوری که دیده می‌شود گلیبنکلامید اثری بر عملکرد مهاری عصاره نداشته است. آزمون آماری t-test بین انقباضها در غیاب و در حضور عصاره انجام شده است (*** $p< ۰/۰۰۰۱$ و $n = ۷$).



نمودار ۸ : اثر تترا اتیل آمونیوم بر عملکرد مهاری عصاره. عصاره آبی الکلی برگ انگور انقباض ناشی از کلرورپتاسیم را در کولون موش صحرایی کاهش داده است ولی با اضافه کردن تترا اتیل آمونیوم (TEA) کولون مجدداً منقبض گردیده است (*** $p<۰/۰۰۰۱$ ، ** $p< ۰/۰۱$ و $n = ۷$).

بحث و نتیجه گیری

اثرات مهاری مشاهده شده در این تجربه احتمالاً در سطح سلولهای عضله صاف رخ می‌دهند زیرا، این اثرات با تعویض محلول حمام برطرف می‌گردید و این مطلب قبلاً نیز گزارش شده است (۱۱ ، ۱۲). غلظت یون کلسیم درون سلولی تنظیم کننده وضعیت انقباضی عضله صاف است و افزایش آن محرک اصلی انقباض می‌باشد (۲۲). این افزایش نتیجه ورود کلسیم از محیط خارج سلول و یا نتیجه رهایش آن از رتیکولوم سارکوپلاسمیک می‌باشد و روش اول نقش مهمتری را در انقباض کولون به عهده دارد (۲۳). کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع L مسیر اصلی و عمده خصوصاً در عضلات صاف دستگاه گوارش است. کلرورپتاسیم با ایجاد دپولاریزاسیون موجب باز شدن کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع L می‌شود که وجود این کانالها در کولون به اثبات رسیده است (۲۴). از طرف دیگر کلروربااریم با مسدود کردن کانالهای پتاسیمی (۲۵) و یا با تشویق رهایش کلسیم از منابع کلسیمی درون سلولی موجب انقباض در عضله صاف می‌شود (۲۶). استیل کولین که مهمترین نوروترانسمیتر در دستگاه گوارش است با فعال کردن گیرنده های موسکارینیک نوع M_2 ، به نوبه خود سبب فعال شدن کانالهای کاتیونیک غیر انتخابی (non-selective cation channels) گردیده و از این طریق سبب فعال شدن و باز شدن کانالهای کلسیمی نوع L (۲۷) می‌گردد. همچنین گزارش شده است که استیل کولین با افزایش اینوزیتول تری فسفات (IP_3) درون سلولی موجب افزایش کلسیم درون سلولی و انقباض می‌گردد (۱۸). اثر شدید مهاری عصاره بر انقباض ناشی از استیل کولین نمی‌تواند نتیجه دخالت گیرنده های کولینرژیک باشد زیرا همانطوری که در مقدمه ذکر شد، این عصاره مشابه استیل کولین موجب کاهش ضربان قلب و نیروی انقباضی قلب جدا شده قورباغه می‌شد ولی آتروپین تأثیری بر عملکرد عصاره نداشت (۱۳). لذا می‌توان پیشنهاد نمود که عصاره موجب جلوگیری از وقوع پیامدهای بعد از اتصال استیل کولین به گیرنده های آن گردیده است و مستقیماً اثری بر این گیرنده ها ندارد. به هر صورت هر سه محرک به کار رفته و مخصوصاً کلرور پتاسیم عملکرد انقباضی خود را از طریق باز کردن کانالهای کلسیمی اعمال می‌کنند. پیشنهاد شده است موادی که بتوانند انقباض ناشی از کلرور پتاسیم را در عضله صاف کاهش دهند احتمالاً با انسداد کانالهای کلسیم وابسته به ولتاژ اثر مهاری خود را اعمال می کنند (۲۸). عدم تأثیر پذیری عصاره از حضور آنتاگونیستهای گیرنده های آلفا و بتا آدرنرژیک (توسط فنتولامین و پروپرانولول) نشان داد این گیرنده ها در بروز اثر مهاری عصاره دخالتی ندارند. عدم دخالت گیرنده های بتا

Archive of SID
www.SID.ir

آدرنرژیک در تأثیر مهاری عصاره بر انقباض ایلئوم (۱۱) و رحم (۱۲) نیز قبلاً نشان داده شده است. گزارش شده است که نیتریک اکساید شل کننده عضله صاف دستگاه گوارش است (۲۹) ولی در این تجربه مشاهده شده که حضور مهارکننده نیتریک اکساید سنتاز (L-NAME) اثری بر عملکرد مهاری عصاره نداشت. لذا برخلاف نتایج مربوط به تأثیر این عصاره در افزایش نیتریک اکساید در آئورت که موجب شل شدن آئورت می‌گردید (۱۴) در مورد کولون اثری ندارد. با توجه به اثر مهاری اوپیوئیدها بر حرکات دستگاه گوارش و نیز توانایی نالوکسون در افزایش حرکات لوله گوارش (۳۰)، در این تحقیق سعی گردید تا وجود خاصیت آنتاگونیستی اوپیوئیدی در عصاره نیز بررسی گردد. نتایج نشان داد که اثر مهاری عصاره در حضور نالوکسون (آنتاگونیست گیرنده های اوپیوئیدی) نه فقط تضعیف نگردید بلکه موجب تقویت اثر مهاری عصاره شد. لذا به نظر نمی‌رسد که گیرنده های اوپیوئیدی در عملکرد مهاری عصاره نقش داشته باشند. علاوه بر این گلیبنکلامید که مسدود کننده کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP می‌باشد نیز قادر به کاهش اثر مهاری عصاره نبود و لذا دخالت این کانالها نیز رد می‌شود. از طرف دیگر با توجه به اینکه نشان داده شد که حضور کلسیم برای بروز اثر مهاری عصاره ضروریست لذا به نظر می‌رسد که کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم در بروز اثر مهاری عصاره نقش داشته باشند. با توجه به اینکه هر سه ماده محرک به کار رفته مستقیماً و به طور غیر مستقیم موجب ورود کلسیم از خارج سلول می‌گردند و نیز تقویت عملکرد مهاری عصاره در حضور کلسیم نشان می‌دهد که کلسیم جهت اعمال این اثر مهاری ضروری بوده و لذا می‌توان پیشنهاد نمود که عصاره آبی الکلی برگ انگور احتمالاً با انسداد کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ اثر مهاری خود را اعمال می‌کند. در همین ارتباط گزارش شده است که اثر شل کننده پروسیانیدینها بر آئورت موش صحرایی احتمالاً از طریق باز شدن کانالهای پتاسیم حساس به تترا اتیل آمونیوم (TEA) رخ می‌دهد (۶). همین نتیجه نیز در تحقیق حاضر به صورت کاهش عملکرد مهاری عصاره در حضور TEA مشاهده گردید. لذا احتمال دارد پروسیانیدینهای موجود در انگور (۱) با فعال کردن کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم موجب بروز بخشی از عملکرد شل کننده عصاره شده باشند. ضمناً نتایج این تحقیق مؤید مصرف سنتی برگ انگور در درمان اسهال می‌باشد. یقیناً روشن شدن کامل مکانیسم اثر مهاری مشاهده شده نیاز به استخراج مواد متشکله عصاره و بررسی اثر هریک از این مواد خواهد داشت.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Bombardelli E., Morazzoni P., 1995, *Vitis vinifera* L. Fitoterapia, 66: 291-317.

۲. زرگری، علی، گیاهان داروئی، جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۱۳۷۱، ۳۶۵-۳۶۲.

3. Yu H., Zhao X., Xu G., Wang S.E., 2002, Effect of grape seed extracts on blood lipids in rabbits model with hyperlipidemia, Wei Sheng Yan Jiu, 31: 114-116.
4. Aldini G., Carini M., Piccoli A., Rossoni G., Maffei Facino R., 2003, 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: 2883-2898.
5. Fitzpatrick D. F., Bing B., Maggi D. A., Fleming R. C., O'Malley R. M., 2002, Vasodilating procyanidins derived from grape seed, Ann. N. Y. Acad. Sci., 957: 78-89.
6. Kim S. H., Kang K. W., Kim K.W., Kim N. D., 2000, Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium- dependent vasorelaxation in rat aorta, Life Sci., 67: 121-131.
7. Yamakoshi J., Saito M., Kataoka S., Tokutake S., 2002, Procyanidin-rich extract from grape seeds prevents cataract formation in hereditary cataractous (ICR/f) rats, J. Agric. Food Chem., 50: 4983-4988.
8. Singletary K.W., Meline B., 2001, Effect of grape seed proanthocyanidins on colon aberrant crypts and breast tumors in a rat dual-organ tumor model, Nutr. Cancer, 39: 252-258.
9. Kiesewetter H., Koscielncy J., Kalus U., Vix J. M., Peil H., Petrini O., van Toor B. S., deMey C., 2000, Efficacy of orally administered extract of red wine leaves AS 195 (folia vitis vinifera) in chronic venous insufficiency (stages I-II). A randomized, double-blind- placebo-controled trial, Arzneimittelforschung, 50: 109-117.
10. Bilgrami K. S., Jeswal P., 1993, Control of citrinin caused nephrotoxicosis through aqueous leaf extract of *Vitis vinifera* L. mercurious corrossivus and cortisone, Indian J. Exp. Biol., 31: 482-484.

۱۱. غریب ناصری، محمد کاظم ، اعتماد ندا، نجفی اردکانی زلیخا، اثر عصاره برگ مو بر فعالیت مکانیکی ایلئوم موش صحرایی، مجله علمی پژوهشی دانشگاه شهید صدوقی یزد، شماره ۳ ، پائیز ۱۳۸۳، ۴۱-۳۵.

۱۲. غریب ناصری، محمد کاظم، احسانی، پروین، اثر ضد انقباضی برگ مو *(Vitis vinifera)* بر رحم جدا شده موش صحرایی، مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی، جلد ۷، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۸۲، ۱۱۴-۱۰۷.

۱۳. غریب ناصری، محمد کاظم، اثر عصاره برگ انگور بر قلب پرفیوز شده قورباغه، مجله طبیب شرق، سال پنجم، شماره ۴ ، زمستان ۱۳۸۲، ۲۳۵-۲۲۷.

۱۴. غریب ناصری محمد کاظم، نوید حمیدی مژده، حیدری اکبر. اثر شل کننده عروقی عصاره برگ مو بر آئورت جدا شده موش صحرایی، فصلنامه گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، سال سوم، شماره نهم، ۱۳۸۲، ۵۴-۴۳.

15. Akomolafe R. O., Adeoshun I. O., Elujoba A. A., Iwalewa E. O., Ayoka A. O., 2003, Effects of *Cassia sieberiena* leaf extracts on the intestine motility of rat, African Journal of Biomedical Research, 6:141-145.
16. Dai Y., Liu J. X., Li J. X., Xu Y. F., 2003, Effect of pinaverium bromide on stress-induced colonic smooth muscle contractility disorder in rats, World J. Gastroenterol., 9: 557-561.
17. Yarim M., Sarac S., Ertan M., Batu O. S., Erol K., 1999, Synthesis, structural elucidation and pharmacological properties of some 5-acetyl-3,4-dihydro-6-methyl-4-(substituted phenyl)-2(1H)-pyrimidinones, Farmaco., 54: 359-363.
18. Shi X. Z., Sarna S. K., 2000, Impairment of Ca^{2+} mobilization in circular muscle cells of the inflamed colon, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 278: G234-G242.
19. Borrelli F., Capasso R., Pinto A., Izzo A. A., 2004, Inhibitory effect of ginger (*Zingiber officinale*) on rat ileal motility in vitro, Life Sci., 74: 2889-2896.

Archive of SID
www.SID.ir

20. Storr M., Franck H., Saur D., Schusdziarra V., Allescher H. D., 2000, Mechanisms of alpha, beta-ethylene ATP-induced inhibition in rat ileal smooth muscle: involvement of intracellular Ca^{2+} stores in purinergic inhibition, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 27: 771-779.
21. Maggi C. A., Giuliani S., Zagorodnyuk V., 1996, Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the circular muscle of guinea-pig colon: role as inhibitory transmitter and mechanisms of relaxation, Regul. Pept., 61: 27-36.
22. Li J., Liu X., Xie P., Gu Q., Li J., Zhang Y., Tang Z., 2000, The regulation of calcium in the movement of colonic smooth muscle in wrap restraint stress rats, Zhonghua Nei Ke Za Zhi, 39: 588-591.
23. Gibson A., McFadzean I., Wallace P., Wayman C. P., 1998, Capacitative Ca^{2+} entry and the regulation of smooth muscle tone, Trends Pharmacol Sci., 19: 266-269.
24. Mayer E. A., Loo D. D., Snape W. J., Sachs G., 1990, The activation of calcium and calcium-activated potassium channels in mammalian colonic smooth muscle by substance P, J. Physiol., 420: 47-71.
25. Reinach P., Nagel W., 1985, Implications of an anomalous intracellular electrical response in bullfrog corneal epithelium, J. Membr. Biol., 87: 201-209.
26. Rahwan R. G., Faust M. M., Witiak D. T., 1977, Pharmacological evaluation of new calcium antagonists: 2-substituted 3-dimethylamino-5,6-methylenedioxyindenes, J. Pharmacol. Exp. Ther., 201(1): 126-137.
27. Eglen R. M., 2001, Muscarinic receptors and gastrointestinal tract smooth muscle function, Life Sci., 68: 2573-2578.
28. Wang G. J., Wu X. W., Lin Y. L., Ren J., Shum A. Y. C., Wu Y. Y., Chen C. F., 2002, Ca^{2+} channel blocking effect of iso-S-petasin in rat aortic smooth muscle cells. Eur. J. Pharmacol., 445: 239-245.
29. Murthy K. S., Makhlouf G. M., 1995, Interaction of cA-kinase and cG-kinase in mediating relaxation of dispersed smooth muscle cells, Am. J. Physiol., 268: C171-C180.
30. Coupar I. M., 1995, The peristaltic reflex in the rat ileum: evidence for functional mu- and delta-opiate receptors, J. Pharm. Pharmacol., 47: 643-646.

Archive of SID

www.SID.ir