

## بررسی مکانیسم شل‌کنندگی عروقی عصاره برگ انگور در آنورت موش صحرایی

محمد کاظم غریب ناصری<sup>۱\*</sup> و اکبر حیدری<sup>۲</sup>

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 آنورت موش صحرایی و در حضور اندوتلیال‌سالام و با دخالت سیستم NO-cGMP کاهش داد، در حالی که اثر کمتری بر انقباض ناشی از کلروپتاسیم 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) آنورت سینه‌ای جدا شد و در حمام بافت حاوی محلول کربس - هانسلیت (۷/۴ pH و ۳۷ °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.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که تترائیل 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 آنورت ناشی از فنیل‌افرین، 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 پروستاگلندین 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<sup>+</sup> channels)، موجب شل شدن آنورت موش صحرایی شده است.

**واژه‌های کلیدی:** برگ انگور، آنورت، موش صحرایی، کانالهای پتاسیمی.

### مقدمه

که این شلی از طریق NO و با افزایش cGMP انجام می‌شود [۱۶ و ۲۵]. همچنین احتمال داده شده است که باز شدن کانالهای پتاسیمی حساس به تترائیل آمونیوم بوسیله پروستاگلندینها مسئول شل شدن آنورت باشد [۲۵]. فلاونوئید quercetin که در برگ انگور وجود دارد [۱۵] نیز با افزایش cGMP در آنورت، سبب شلی وابسته به اندوتلیال می‌شود [۷]. اثرات حفاظتی پروستاگلندینهای 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 آبی‌الکلی برگ انگور می‌توان به اثر مهاری این عصاره بر انقباضات ایلتوم ناشی از کلروپتاسیم 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

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 دارویی به اثرات ضد اسهال، ضد استفراغ و ضد واریس برگ انگور اشاره شده است [۹]. از جمله ترکیبات مهم شناخته شده در انگور، فلاونوئیدها (از گروه پلی‌فنلها) و آنتوسیانیدینها می‌باشند [۱]. اخیراً نشان داده شده است که آنورت جدا شده انسان بصورت وابسته به اندوتلیال بوسیله پروستاگلندینهای (از انواع دیگر پلی‌فنلها) موجود در دانه انگور نیز شل می‌شود [۶] و تحقیقات در این مورد پیشنهاد می‌کنند

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبات:

gharibnaseri\_m@yahoo.com

با سرعت  $0.1 \text{ mm/s}$  ثبت گردید. محلول کربس - هانسلیت حمام  $37^\circ\text{C}$ ، pH برابر  $7.4$  و ترکیب آن (برحسب mM) به قرار زیر می باشد [۵]:  $\text{NaCl}$  (۱۱۸)،  $\text{KCl}$  (۴۷)،  $\text{CaCl}_2$  (۲/۵۲)،  $\text{MgSO}_4$  (۱/۶۴)،  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (۱/۱۸)،  $\text{NaHCO}_3$  (۷) و گلوکز (۵/۵). جریان دائم حبابهای کوچک اکسیژن 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 می گردید.

### ج- روش کار

در ابتدای تمام پروتکل‌های مختلف این تحقیق، پس از دوره سازگاری، جهت تعیین سلامت لایه اندوتلیال، فنیل‌افرین [۲۲ و ۱۹] با غلظت نهایی  $1 \mu\text{M}$  به حمام اضافه می شد و پس از رسیدن انقباض به حالت کفه، استیل کولین ( $1 \mu\text{M}$ ) اضافه شد. اگر شلی آئورت ناشی از استیل کولین بیش از ۷۰٪ بود، قطعه آئورت بعنوان دارای اندوتلیال سالم تلقی گردید [۳۵]. پس از استراحت بافت بعد از هر بار اضافه کردن فنیل‌افرین ( $1 \mu\text{M}$ ) غلظت معینی از عصاره برگ انگور اضافه می گردید و میزان شلی حاصله پس از رسیدن انقباض به حال کفه اندازه‌گیری شد. پس از اجرای هر مرحله، محلول حمام سه بار تعویض و به مدت حداقل ۱۰ دقیقه و در نهایت، برگشت تون به حالت پایه، پروتکل بعدی انجام می شد. در هر گروه، نیروی انقباضی (بر حسب گرم) و یا درصد تغییرات نیروی انقباضی آئورتها (با احتساب انقباض ناشی از فنیل‌افرین به عنوان ۱۰۰٪) بصورت  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  محاسبه و ارائه شده‌اند. نتایج گروه‌های مختلف با استفاده از آزمونهای آماری t-test (مقایسه دو میانگین) و ANOVA (مقایسه چند میانگین) از نظر آماری مقایسه شده و با مقادیر P کوچکتر از ۰/۰۵ اختلاف معنی دار تلقی گردید. تعداد موشهای استفاده شده در هر پروتکل بصورت n در متن نتایج و نمودارها مشخص گردیده است. کلیه نمکها، EDTA و الکل محصول شرکت مرک (آلمان) و فنیل‌افرین، استیل کولین، ایندومتاسین، تترااتیل‌آمونیم (مسدود کننده کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم) و گلیسینکلامید (مسدود کننده کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP) از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شده‌اند. جهت حل کردن گلیسینکلامید از کربنات سدیم و برای حل کردن تترااتیل‌آمونیم 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 - اثر حضور گلیسینکلامید بر عملکرد مهاری عصاره

ابتدا با ایجاد شلی ناشی از استیل کولین ( $1 \mu\text{M}$ ) بر انقباض ناشی از فنیل‌افرین ( $1 \mu\text{M}$ ) به میزان  $70.8 \pm 4.2\%$ ، میزان سلامت اندوتلیال مشخص گردید. بعد از استراحت، ابتدا فنیل‌افرین با غلظت قبلی اضافه شد و پس از رسیدن انقباض به حالت کفه عصاره ( $1 \text{ mg/ml}$ ) اضافه شد. در پایان دوره اثر عصاره، میزان شلی آئورت به  $99.3 \pm 4.2\%$

قورباغه [۲] اشاره نمود و پیشنهاد شده است که اثرات مهاری عصاره نتیجه مسدود شدن کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ می باشد [۴ و ۳]. از طرف دیگر، تحقیقات اخیر نشان داده است که عصاره برگ انگور سبب کاهش انقباض آئورت ناشی از فنیل‌افرین در موش صحرایی می گردد و این اثر وابسته به سلامت اندوتلیال و با دخالت NO و cGMP است [۵] ولی عملکرد مهاری عصاره بر انقباض ناشی از کلوروپتاسیم کمتر بود. این نکته نشان می دهد که غلظت پتاسیم 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 می باشد.

### مواد و روش‌ها

#### الف - تهیه عصاره

برگهای جوان انگور تهیه شده از مرکز تحقیقات انگور شهرستان شیراز در فصل بهار تهیه شده بودند توسط آقای دکتر سیاهپوش از گروه فارماکوتوزی دانشکده داروسازی اهواز شناسایی 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 شد. سپس، مخلوط از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده و با گسترده محلول عصاره روی سطح شیشه، حلال عصاره در دمای اتاق تبخیر شد. پودر عصاره با نسبت استخراج ۱۹٪ بدست آمد که تا زمان استفاده در دمای  $4^\circ\text{C}$  نگهداری می گردید.

#### ب- حیوانات و آماده سازی آئورت

موشهای صحرایی بالغ نر از نژاد Wistar (با محدوده وزنی ۱۷۰ تا ۲۲۰ گرم) تهیه شده از انستیتو رازی حصارک در قفس‌های پلی کربنات بصورت چند تایی و در دمای  $20^\circ\text{C}$  تا  $24^\circ\text{C}$  و سیکل روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. موشها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. شرایط نگهداری و مراحل کار روی موشهای صحرایی در این تحقیق به تأیید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز رسیده است. موشها با دی اتیل اتر بیهوش شده، قفسه سینه باز شد و از آئورت سینه‌ای حدود ۲ cm جدا گردید و بلافاصله در محلول سرد و اکسیژنه کربس - هانسلیت قرار داده و بافت‌های پیوندی با دقت از آن جدا گردید. آئورت به چند قطعه به طول ۵ mm تقسیم شد. در تمام مراحل آماده سازی آئورت، دقت فراوان گردید تا به لایه اندوتلیال آن آسیب وارد نشود. قطعه آئورت آماده شده بلافاصله به درون حمام بافت (۱۰ ml) و بین دو میله افقی از جنس استیل زنگ نزن قرار داده شد که یکی بطور ثابت در ته حمام بافت قرار داشت و دیگری از طریق نخ به ترانس‌دیوسر ایزومتریک (UF1 Harvard Transducer, UK) متصل شده بود و انقباضات آئورت بوسیله دستگاه ثبات (Universal Harvard Oscillograph, UK) بر روی کاغذ

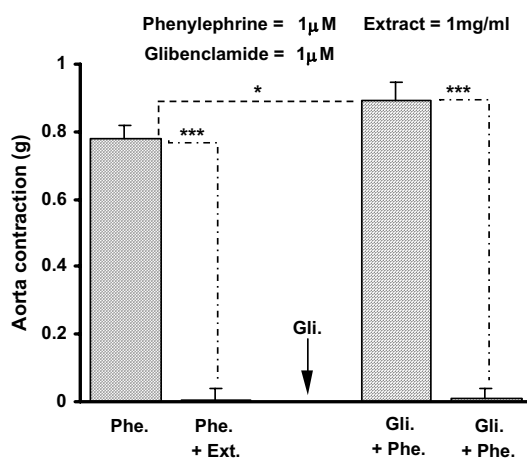
سه غلظت ( $P < 0.001$ )، نمونه ثبت حقیقی این پروتکل در شکل ۵ (C1) و (C2) نشان داده شده‌اند.

#### د - بررسی نقش پروستاگلندین در عملکرد مهاری عصاره

پس از اطمینان از سلامت اندوتلیال و بروز ثبت شلی ناشی از استیل کولین ( $1 \mu\text{M}$ ) بر انقباض ناشی از فنیل افرین ( $1 \mu\text{M}$ ) به میزان  $0.75/8 \pm 4/9\%$ ، فنیل افرین با غلظت قبلی اضافه شد و پس از رسیدن انقباض به حالت کفه، عصاره ( $1 \text{ mg/ml}$ ) اضافه شد. عصاره سبب کاهش نیروی انقباضی ناشی از فنیل افرین گردید ( $n=8$  و  $P < 0.001$ ). بعد از شستشو و استراحت ۱۵ دقیقه‌ای، به حمام بافت ایندومتاسین (مهاری کننده آنزیم سیکلواکسیژناز) با غلظت نهایی  $1 \mu\text{M}$  [۲۰] به حمام اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه حضور آن مجدداً فنیل افرین و عصاره ( $1 \text{ mg/ml}$ ) به حمام بافت اضافه شد. همانطوریکه در شکل ۴ مشاهده می‌شود عصاره در هر دو حالت (در غیاب و در حضور ایندومتاسین) قادر به مهار انقباض ناشی از فنیل افرین است ( $n=7$  و  $P < 0.001$ ) ولی این دو حالت تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند. نمونه ثبت حقیقی این پروتکل در شکل ۵ (D1 و D2) دیده می‌شوند.

#### بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره آبی الکی برگ انگور سبب کاهش معنی‌دار در انقباض آئورت ناشی از فنیل افرین گردید ضمن آنکه، این عملکرد مهاری به حضور کلسیم محیط وابسته بود اما تحت تأثیر مسدود کننده کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP و مهاری سنتر پروستاگلندین قرار نگرفت. ولی با مسدود کردن کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم، عملکرد مهاری عصاره بشدت کاهش یافت.



شکل ۱- 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 ( $n=7$ ،  $P < 0.05$  \* و  $P < 0.001$  \*\*\*).

رسید ( $n=7$  و  $P < 0.001$ )، بعد از شستشو و استراحت ۱۵ دقیقه‌ای، گلیبنکلامید (مسدود کننده کانالهای پتاسیمی وابسته به ATP) با غلظت نهایی  $1 \mu\text{M}$  [۳۶] به حمام اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه [۲۴] حضور آن، مجدداً فنیل افرین و عصاره با غلظتهای ذکر شده به حمام بافت اضافه شد. مقایسه مقدار نیروی انقباضی برحسب گرم در شکل ۱ نشان می‌دهد که ۳۰ دقیقه حضور گلیبنکلامید موجب افزایش مختصر ولی معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) در نیروی انقباضی ناشی از فنیل افرین شده است. اما، عصاره در حضور گلیبنکلامید همچنان بطور معنی‌دار سبب کاهش انقباض ناشی از فنیل افرین شده است ( $P < 0.001$ ). عملکرد عصاره در هر دو حالت اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. نمونه ثبت حقیقی این پروتکل در شکل ۵ (A1 و A2) نشان داده شده‌اند.

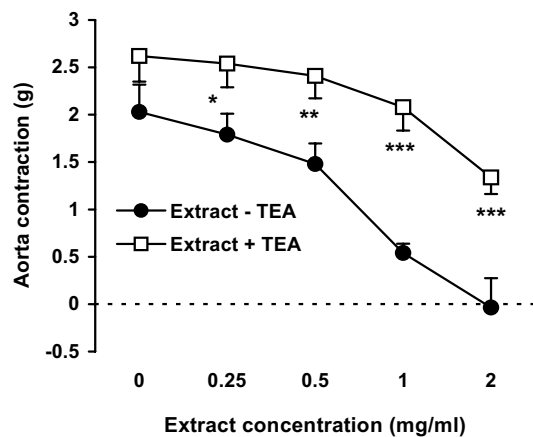
#### ب - اثر حضور تترائیل آمونیوم بر عملکرد مهاری عصاره

ابتدا طبق روشهای ذکر شده، درصد سلامت اندوتلیال به میزان  $0.87/8 \pm 7/4\%$  تعیین گردید. پس از ۱۵ دقیقه استراحت و شستشوی مکرر، بافت مجدداً بوسیله فنیل افرین منقبض گردید و در حالت کفه آن، غلظتهای تجمعی  $0.25$ ،  $0.5$ ،  $1$  و  $2 \text{ mg/ml}$  عصاره به حمام اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه استراحت و شستشوی مکرر، تترائیل آمونیوم با غلظت [۱۱]  $10 \text{ mM}$  به حمام اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه [۲۵] و در حضور تترائیل آمونیوم مشابه مرحله قبل، فنیل افرین و عصاره به حمام اضافه گردید. شکل ۲ نشان می‌دهد که حضور تترائیل آمونیوم سبب افزایش مختصر (ولی غیر معنی‌دار) در نیروی انقباضی آئورت شده اما بطور معنی‌دار عملکرد مهاری عصاره را کاهش داده است بطوریکه، اثر مهاری عصاره در بیشترین غلظت  $50\%$  کاهش یافته است ( $n=7$  و  $P < 0.001$ ). نمونه ثبت حقیقی این پروتکل در شکل ۵ (B1 و B2) نشان داده شده‌اند.

#### ج - بررسی نقش کلسیم خارج سلولی در عملکرد مهاری عصاره

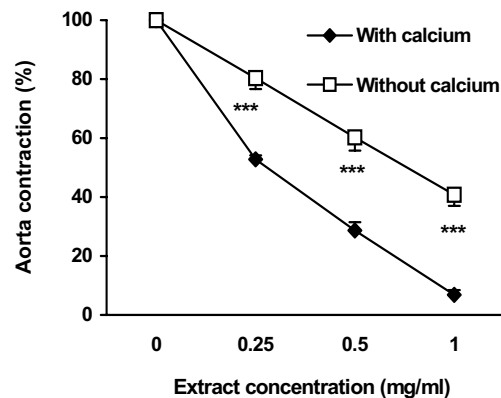
در حمام بافت حاوی محلول کربس - هانسلیت با کلسیم نرمال، ابتدا درصد سلامت اندوتلیال ( $0.77/3 \pm 4/5\%$  شلی ناشی از استیل کولین) ثبت گردید. بعد از استراحت، مجدداً بوسیله فنیل افرین ( $1 \mu\text{M}$ ) بافت منقبض شد و در حالت کفه، عصاره با غلظت تجمعی  $0.25$ ،  $0.5$  و  $1 \text{ mg/ml}$  اضافه شد و نتایج ثبت گردید. در مرحله بعد، محلول حمام با محلول کربس - هانسلیت بدون کلسیم و دارای EDTA ( $0.1 \text{ mM}$ ) تعویض گردید و پس از ۱۵ دقیقه [۳۱] مراحل قبلی با همان غلظتهای عصاره تکرار شد. همانطوریکه در شکل ۳ مشاهده می‌شود با حذف کلسیم محیط، تغییرات درصد نیروی انقباضی ناشی از عملکرد مهاری عصاره در تمام غلظتهای بکار رفته به طور معنی‌دار کاهش یافته است. همچنین، عصاره در بیشترین غلظت در حضور کلسیم موجب  $93/4\%$  کاهش در نیروی انقباضی شده در حالیکه در غیاب کلسیم این اثر مهاری  $58/1\%$  و اختلاف این دو اثر  $35/3\%$  می‌باشد ( $n=7$  و در هر

حضور مهار کننده نیتریک اکساید سنتاز (توسط L-NAME) و نیز مهار سنتز cGMP (توسط آبی متیلان) کاهش یافت [۵]. از طرف دیگر، در همین تحقیق مشخص شد که میزان عملکرد مهارتی عصاره بر انقباض آئورت ناشی از کلروپتاسیم 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 گلیسینکلامید مسدود می‌شوند در عملکرد مهارتی عصاره دخالتی ندارند. گزارش شده است که کانالهای پتاسیمی حساس به ATP در آئورت موش صحرایی وجود داشته و این کانالها به گلیسینکلامید حساس هستند [۲۸]. لذا به نظر می‌رسد که علیرغم وجود این کانالها در آئورت، در تحقیق حاضر، عصاره برگ انگور بدون دخالت آنها، عمل مهارتی 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 گلیسینکلامید همخوانی دارد. تترائیل‌آمونوم (TEA) مسدود کننده کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم (Ca<sup>2+</sup>-operated potassium channel inhibitor) و یا (Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> 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 مهارتی عصاره گردید. این نتیجه با گزارش ارائه شده در مورد تأثیر TEA در کاهش شل‌کنندگی 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 باز شدن کانالهای پتاسیمی حساس به تترائیل‌آمونوم 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<sub>3</sub>) از منابع درون سلولی شده [۱۴] که به نوبه خود، موجب باز شدن 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 مهارتی عصاره گردید و بنابراین دخالت کلسیم را در بروز اثر مهارتی عصاره تأیید می‌کند. همانطوریکه



شکل ۲ - مقایسه اثر مهارتی غلظتهای تجمعی عصاره برگ انگور بر انقباض ناشی از فنیل افرین (۱ μM) در غیاب و در حضور تترائیل‌آمونوم (TEA، ۱۰ mM) در آئورت موش صحرایی. اگر چه در هر دو حالت عصاره موجب کاهش انقباض آئورت شده است ولی در حضور تترائیل‌آمونوم (۳۰ دقیقه)، تأثیر مهارتی عصاره در همه غلظتهای آن کاهش معنی‌داری یافته است (n=7، \* P < ۰/۰۵، \*\* P < ۰/۰۱، \*\*\* P < ۰/۰۰۱).

فنیل افرین یک آگونیست انتخابی (selective-adrenergic agonist) رسپتور α<sub>1</sub> 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، شل شدن عضله صاف آئورت می‌شود [۲۳ و ۲۹]. در تحقیق قبلی گزارش گردید که عصاره آبی الکلی برگ انگور انقباض آئورت ناشی از فنیل افرین را در حضور اندوتلیال سالم کاهش داده و این اثر مهارتی در



شکل ۳ - مقایسه اثر مهارتی غلظتهای تجمعی عصاره برگ انگور بر انقباض ناشی از فنیل افرین (۱ μM) در محلول کربس - 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 مهارتی عصاره در هر سه غلظت آن کاهش معنی‌دار یافته است (n=7، \* P < ۰/۰۰۱، \*\*\* P < ۰/۰۰۱).

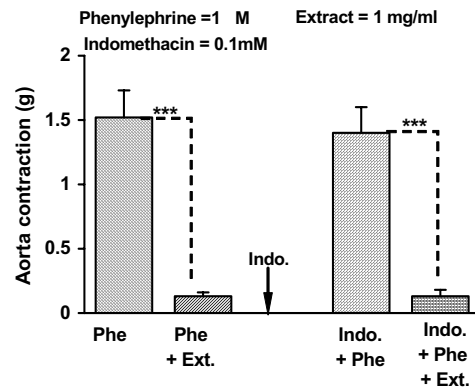
ارتباط گزارش شده است که عملکرد شل کنندگی عروقی پروسیانیدینها که بصورت وابسته به NO و اندوتلیال در آئورت در موش صحرایی می باشد، تحت تأثیر حضور ایندومتاسین قرار نمی گیرد [۲۵] که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. اگر چه در این تحقیق ترکیبات برگ انگور استخراج نگردیده و اثر این ترکیبات بررسی نشده است ولی با توجه به گزارش اثر شل کنندگی ماده *quercetin* (از فلاونوئیدها) موجود در برگ انگور [۱۵] که از طریق فعال کردن نیتریک اکساید سنتز 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 می توان 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 می دهد 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، طولانی تر بودن دوره دسترسی به برگ انگور، سهولت تهیه آن، سهولت عصاره گیری و ارزان تر بودن آن، لذا می توان 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 می نمایند. ضمناً از آقای دکتر سیاهپوش به جهت شناسایی علمی گیاه قدردانی میگرد.

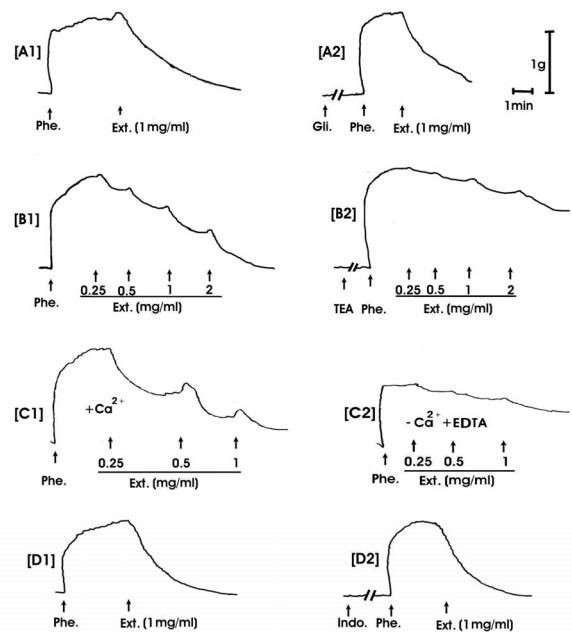
### منابع

- [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. *طیب سرق* 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 ایلتوم 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.



شکل ۴ - 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 معنی دار انقباض آئورت شده است (\*\*\* P < ۰/۰۰۰۱، n = ۷).

قبلاً نیز گزارش گردید [۲]، عملکرد مهاری عصاره نتیجه وجود مواد شبه استیل کولینی در عصاره نمی باشد. زیرا، اولاً اثر مهاری دیده شده در قلب تحت تأثیر آتروپین قرار نمی گرفت و ثانیاً این عصاره انقباض ایلتوم را کاهش می دهد [۴]. گزارش شده است که علاوه بر نیتریک اکساید، مواد شل کننده دیگری مانند پروستاگلین نیز از اندوتلیال آزاد می شود [۱۸ و ۳۲] و لذا مهار سنتز پروستاگلین بوسیله ایندومتاسین (مهار کننده سیکلو اکسیژناز) می تواند سبب حذف این عمل شل کننده شود. ولی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بکار بردن ایندومتاسین نتوانست اثر شل کننده عصاره برگ انگور را از بین ببرد و لذا می توان نتیجه گرفت که عملکرد مهاری مشاهده شده با دخالت پروستاگلین انجام نشده است. در همین



شکل ۵ - نمونه ثبت حقیقی از پروتکل های مختلف در این تحقیق. فنیل افرین  $1 \mu\text{M}$  Phe، گلیسینکلامید  $1 \mu\text{M}$  Gli، تترائیل آمونیوم  $10 \text{ mM}$  TEA، با حضور کلسیم  $2/52 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$ ، بدون حضور کلسیم همراه با EDTA  $\text{Ca}^{2+}$  (-). مدت اینکوباسیون بافت با گلیسینکلامید، تترائیل آمونیوم و ایندومتاسین ۳۰ دقیقه بوده است.

- [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, Koscielny 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<sub>3</sub> mediates endothelium-dependent relaxation in response to ginsenosides in rat aorta: Role of K<sup>+</sup> 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.
- [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 nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol*, 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 vanilylidol: a phenylaldehyde alpha/beta-adrenoceptor blocker with endothelium-dependent and K<sup>+</sup> 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<sub>3</sub> 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.

- aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 357 (1998) 92-99.
- [32] Rubanyi GM, The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 (1993) S1-S14.
- [33] Sato M, 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.
- [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] Nogueira 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