اثر شل‌کننده عروقی عصاره برگ مو (*Vitis vinifera* L.) بر آئورت جدا شده موش صحرایی

محمدکاظم غریب‌ناصری[1*]، مژده نویدحمیدی[2]، اکبر حیدری[3]

۱- دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز
۲- کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز
۳- دانشجوی رشته داروسازی، گروه فیزیولوژی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز
*آدرس مکاتبه: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی اهواز، دانشکده پزشکی، صندوق‌پستی: ۱۸۹
کدپستی: ٦١٣٣٥، تلفن: ۵۰-۳۳٦٧٥٤٣ (۰٦۱۱)، نمابر: ۳۳۳۲۰۳٦ (۰٦۱۱)
پست الکترونیک: gharibnaseri_m@yahoo.com

چکیده

تاکنون گزارش‌هایی درباره اثر آنتی‌اکسیدانی، کاهش فشار خون و اثر اتساعی عروقی عصاره دانه انگور و پوست میوه آن ارایه شده است. اثرات شل‌کننده برگ انگور بر انقباض ایلئوم و رحم موش صحرایی و اثرات کاهنده نیروی انقباضی و ضربان قلب قورباغه نیز گزارش شده است. با توجه به احتمال وجود بعضی از اثرات عروقی عصاره دانه انگور در برگ آن، لذا در این تحقیق اثرات عصاره آبی الکلی برگ مو (*Vitis vinifera* L.) بر انقباض آئورت موش صحرایی بررسی شد. آئورت سینه‌ای موش صحرایی نر با اندوتلیال سالم و یا تخریب شده در حمام بافت حاوی محلول کربس ـ هانسلیت قرار داده و انقباضات آن به روش ایزومتریک اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان می‌دهند که عصاره برگ مو (۰/۱۲۵، ۰/۲۵ ، ۰/۵ ، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) انقباض ناشی از فنیل افرین (۱ µM) را در آئورت (با و بدون اندوتلیال) به‌صورت وابسته به غلظت کاهش داد، ولی شلی ناشی از عصاره در آئورت‌های با اندوتلیال (IC_{50} = ۰/۴۵۴ ±۰/۰۸ mg/ml) به‌طور قابل ملاحظه (p<۰/۰۰۰۱) بیشتر از پاسخ گروه بدون اندوتلیال (IC_{50} = ۱/۷۳ ±۰/۲۳ mg/ml) بود. مهارکننده نیتریک اکساید سنتاز (L-NAME) با غلظت ۱۰۰ µM شلی ناشی از عصاره (۱mg/ml) در آئورت‌های با اندوتلیال را کاهش داد ولی آتروپین (۱µM) اثری بر خاصیت شل‌کنندگی عصاره نداشت. شلی ناشی از عصاره با غلظت ۱ mg/ml پس از ۳۰ دقیقه حضور آبی متیلن (۱۰ µM) درآئورت‌های دارای اندوتلیال کاهش یافت (p<۰/۰۲). همچنین این عصاره به‌صورت وابسته به غلظت، انقباضات ناشی از کلرور پتاسیم (۸۰ mM) را نیز در هر دو گروه آئورت به‌طور قابل ملاحظه کاهش داد ولی این اثر کمتر از پاسخ‌ها در حضور فنیل افرین بود. می‌توان نتیجه گرفت که اثر شل‌کنندگی عصاره آبی الکلی برگ مو بر انقباض آئورت موش صحرایی وابسته به اندوتلیال بوده و با دخالت NO و cGMP انجام شده و همچنین عصاره فاقد موادی با خاصیت شل‌کنندگی کولینرژیکی شبیه استیل‌کولین است. با توجه به وجود فلاوونوییدها در برگ مو، ممکن است اثر مشاهده شده نتیجه اثر این ترکیبات باشد.

گل‌واژگان: برگ مو، *Vitis vinifera* L.، آئورت، موش صحرایی، اندوتلیوم

مقدمه

انگور (*Vitis vinifera* L.) گیاهی است از خانواده Vitaceae که منشای آن‌را آسیای صغیر می‌دانند [۱]. میوه آن در سه حالت نارس (غوره)، رسیده و خشک شده (کشمش) استفاده خوراکی دارد [۲]. برگ انگور در بعضی از کشورها از جمله ایران به مقدار کم در رژیم غذایی (دلمه برگ مو) مصرف می‌شود. در کتب گیاهان دارویی در مورد خواص برگ مو یا انگور اشاره شده است از جمله: اثرات ضداسهال، ضداستفراغ و ضدواریس [۲]. ولی در مورد خواص عصاره دانه انگور و حتی پوست میوه انگور مطالعات زیادی انجام شده است. از جمله ترکیبات مهم شناخته شده در انگور، پروسیانیدین‌ها از گروه پلی‌فنل‌ها می‌باشند [۱]. درکشور فرانسه مصرف غذاهای سرشار از چربی، مصرف سیگار و مشروبات الکلی مشابه سایر کشورهای صنعتی اروپایی و امریکای شمالی است ولی، فرانسه یکی از کشورهایی است که دارای پایین‌ترین میزان مرگ و میر ناشی از بیماریهای قلبی می‌باشد. پیشنهاد شده است که مصرف زیاد شراب قرمز که از انگور قرمز تهیه شده و سرشار از ترکیبات پلی فنل است، علت این امر و توجیه کننده تناقض فرانسوی یا Franch paradox باشد [۳،٤،٥]. عصاره دانه انگور سبب کاهش غلظت لیپیدهای خون خرگوش‌های مبتلا به هیپرلیپیدیمیا شده ولی مصرف طولانی مدت این عصاره اثر سمی ندارد [٦،۷]. اخیراً نشان داده شده است که پروسیانیدین‌های موجود در دانه انگور به‌صورت وابسته به غلظت، سبب شل شدن آئورت جدا شده انسان می‌شود و گزارش شده است که این شلی از طریق NO و با افزایش cGMP انجام می‌شود [۸،۹،۱۰]. احتمال داده شده است که باز شدن کانال‌های پتاسیمی حساس به تترا اتیل آمونیوم به‌وسیله پروسیانیدین‌ها مسؤول شل شدن آئورت باشد [۱۰]. فلاوونویید Dioclein نیز با افزایش cGMP در آئورت، سبب شلی وابسته به اندوتلیال می‌شود [۱۱]. اثرات حفاظتی پروسیانیدین‌های دانه انگور در برابر استرس اکسیداتیو، کاتاراکت، سرطان پستان و کولون و نیز اثر افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی پلاسما ذکر شده است [۱۲،۱۳،۱٤،۱٥]. از دیگر اثرات این ترکیبات، حفاظت گلبول‌های قرمز در برابر همولیز ناشی از تابش اشعه UVB در موش بوده و گفته شده است که قدرت این ترکیبات در تخریب رادیکال‌های آزاد بیشتر از ویتامین‌های E و C می‌باشد [۱٦،۱۷]. در مورد اثرات عصاره آبی الکلی برگ مو می‌توان به اثرات مهاری این عصاره بر انقباضات ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم و استیل‌کولین و انقباضات ناشی از اکسی‌توسین در رحم در موش صحرایی و نیز اثر مهاری آن بر نیروی انقباضی و ضربان قلب جدا شده قورباغه اشاره نمود [۱۸،۱۹،۲۰]. مفید بودن برگ انگور در درمان عدم کفایت مزمن وریدی (chronic venous insufficiency) در انسان و بهبود نفروتوکسیکوزیس ناشی از citrinin در موش کوچک آزمایشگاهی گزارش شده است [۲۱،۲۲]. مقایسه تحقیقات انجام شده روی دانه انگور و برگ آن نشان می‌دهد که خواص برگ مو کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. با توجه به اثرات یاد شده و احتمال وجود ماده و یا مواد مشابه در برگ و دانه انگور، هدف این تحقیق بررسی اثر عصاره آبی الکلی برگ انگور بر فعالیت انقباضی آئورت موش صحرایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف ـ تهیه عصاره

برگ‌های انگور که از محوطه دانشگاه علوم پزشکی اهواز جمع‌آوری شده بودند، در فروردین ماه پس از خشک کردن در سایه آسیاب شد و به‌صورت پودر ریز درآمد. پودر برگ به مدت ۷۲ ساعت در الکل ۷۰ درصد خیسانده و هر روز در چند نوبت

مخلوط به‌هم زده شد [۲۳]. سپس، مخلوط از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده و حلال عصاره در دمای اتاق تبخیر شد. پودر عصاره تا زمان استفاده در دمای ٤ °C نگهداری گردید.

ب ـ حیوانات و آماده سازی آئورت

موش‌های صحرایی نر (Sprague Dalwey) تهیه شده از اتاق حیوانات دانشکده پزشکی اهواز در قفس‌های پلی‌کربنات به‌صورت چندتایی و در دمای ٢٤ °C – ٢٠ و سیکل روشنایی ١٢ ساعت تاریکی و ١٢ ساعت روشنایی نگهداری شدند. موش‌ها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. موش‌ها با تزریق کتامین (٥٠ mg/kg , ip) بیهوش و قفسه سینه باز شد و از آئورت سینه‌ای حدود ٢ cm جدا گردید و بلافاصله در محلول سرد و اکسیژنه کربس ـ هانسلیت قرار داده و بافت‌های پیوندی از آن جدا شد. آئورت به چند قطعه به طول ٥ mm تقسیم شد. در تمام مراحل آماده‌سازی آئورت، دقت فراوان گردید که به لایه اندوتلیال آسیب وارد نشود. در گروهی از آئورت‌ها، با وارد کردن سر سوزن ١٨ که سطح آن ناصاف شده بود لایه اندوتلیال آنها تخریب گردید. قطعه آئورت آماده شده بلافاصله به درون حمام بافت (١٠ml) و بین دو میله افقی از جنس استیل زنگ نزن قرار داده شد که یکی به‌طور ثابت در ته حمام بافت قرار داشت و دیگری از طریق نخ بـه ترانسدیوسر ایزومتریک (UF1 Harvard Transducer) متصل بود و انقباضات قطعه آئورت به‌وسیله دستگاه ثبات (Universal Harvard Osilloghraph) بر روی کاغذ با سرعت ٠/١ mm/s ثبت گردید. محلول کربس ـ هانسلیت حمام pH،٣٧ °C برابر ٧/٤ و ترکیب آن (برحسب mM) به قرار زیر می‌باشد: NaCl (١١٨)، KCl (٤/٧)، $CaCl_2$ (٢/٥٢)، $MgSO_4$ (١/٦٤)، KH_2PO_4 (١/١٨)، $NaHCO_3$ (٧) و گلوکز (٥/٥) [٢٤]. جریان دایم حباب‌های کوچک اکسیژن از ته حمام برقرار بود. میزان کشش اولیه ١ گرم و مدت دوره سازگاری ٦٠ دقیقه بود که طی این مدت هر ١٥ دقیقه محلول حمام تعویض می‌گردید.

د ـ روش کار

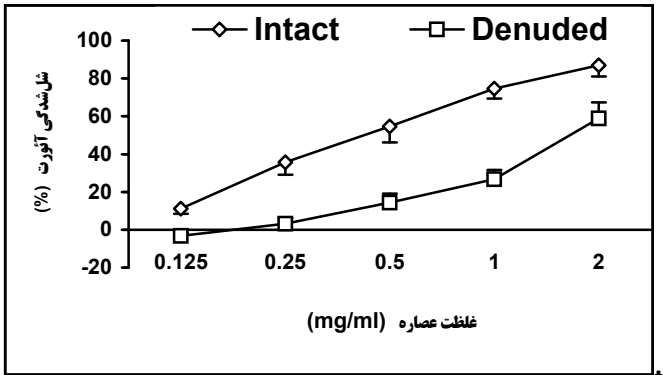
در تمام مراحل مختلف این تحقیق پس از دوره سازگاری، جهت تعیین سلامت لایه اندوتلیال، فنیل‌افرین با غلظت نهایی μM ١ به حمام اضافه می‌شد و پس از رسیدن انقباض به حالت کفه، استیل‌کولین (μM ١) اضافه گردید [٢٥،٢٦]. اگر شلی آئورت ناشی از استیل کولین بیش از ٦٠ درصد بود قطعه آئورت به‌عنوان دارای اندوتلیال سالم تلقی گردید [٢٧]. سپس در هر دو گروه آئورت (با و بدون اندوتلیال) پس از هر بار اضافه‌کردن فنیل افرین (μM ١) یکی از غلظت‌های عصاره برگ مو (٠/١٢٥، ٠/٢٥، ٠/٥، ١ و ٢ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید و درصد شلی حاصله پس از ٢ دقیقه حضور عصاره اندازه‌گیری شد. پس از استفاده از هر غلظت عصاره، محلول حمام سه بار تعویض و به مدت حداقل ١٠ دقیقه و در نهایت، برگشت تون به حالت پایه و بعد از فنیل افرین، غلظت بعدی عصاره اضافه می‌شد. جهت بررسی اثر شل‌کنندگی عصاره بر انقباض آئورت ناشی از کلرور پتاسیم، غلظت mM ٨٠ و سپس از همان غلظت‌های قبلی عصاره (مشابه گروه فنیل افرین) و به همان ترتیب استفاده شد [٢٦]. جهت بررسی نقش نیتریک اکساید (NO) بر عملکرد عصاره، ابتدا شلی ناشی از غلظت ٠/٥ و ١ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بعد از انقباض ناشی از فنیل افرین ثبت گردید و سپس همین مراحل پس از ٥ دقیقه حضور مهارکننده نیتریک اکساید سنتاز (L-NAME) با غلظت μM ١٠٠ تکرار شد [٢٥]. به منظور بررسی وجود خاصیت کولینرژیکی عصاره، در گروهی از آئورت‌های دارای اندوتلیال، پس از ایجاد انقباض به‌وسیله فنیل افرین (μM ١) و ایجاد شلی با غلظت ١ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره، همین مراحل پس از ٣ دقیقه حضور آتروپین با غلظت

μM ۱ تکرار شد [۲۸]. به منظور تعیین دخالت cGMP در عملکرد مهاری عصاره، از حضور آبی متیلن که مهارکننده guanylate cyclase می‌باشد استفاده گردید. بدین منظور بعد از ثبت طبیعی اثر عصاره بر انقباض آئورت دارای اندوتلیال، بافت به مدت ۳۰ دقیقه در غلظت نهایی μM ۱۰ آبی متیلن نگهداشته شد [۲۹] و مجدداً اثر شل‌کننده عصاره ثبت گردید. در هر گروه، نیروی انقباضی و یا درصد شل‌شدن از حداکثر انقباض آئورت‌ها به‌صورت mean ± SEM محاسبه و ارایه شده‌اند. نتایج گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون‌های آماری t-test و ANOVA یک‌طرفه و دو طرفه مقایسه شده و مقادیر P کوچکتر از ۰/۰۵ قابل ملاحظه تلقی گردید. کلیه نمک‌ها و آبی‌متیلـــن محصول شرکت مرک آلمان و فنیل‌افرین، استیل‌کولین، آتروپین و L-NAME از شرکت سیگمای امریکا تهیه شده‌اند. حلال عصاره محلول کربس- هانسلیت و حلال مواد آلی موثر بر عروق، آب مقطر بود.

نتایج

الف ـ اثر عصاره بر انقباض آئورت ناشی از فنیل افرین و نقش اندوتلیال در آن

قبل از انجام مراحل اصلی این آزمایش، میزان شلی ناشی از استیل‌کولین در آئورت‌ها به‌عنوان شاخص سلامت اندوتلیال تعیین شد که در گروه آئورت‌های با اندوتلیال، میزان سلامت اندوتلیال ۷۵/۱¼± ٤/۱ درصد بود [۲۷]. آئورت‌های دارای اندوتلیال (n=۹) پس از انقباض با فنیل افرین (μM ۱) و رسیدن به حالت کفه در حضور غلظت‌های مختلف عصاره آبی الکلی برگ مو (۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌صورت وابسته به غلظت عصاره و قابل ملاحظه شل شدند (p< ۰/۰۰۰۱ با ANOVA یک‌طرفه). مقدار IC_{50} در این گروه برابر (۰/۰۸± ۰/٤٥٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود. در آئورت‌های بدون اندوتلیال (n=۸) با میزان سلامت اندوتلیال ۵/۳±۳/۵ درصد، عصاره با غلظت‌های قبلی انقباض ناشی از فنیل افرین را کاهش داد. این اثر مهاری در این گروه نیز وابسته به غلظت و قابل ملاحظه بوده (p< ۰/۰۰۰۱ با ANOVA یک‌طرفه) و مقدار IC_{50} در این گروه (۰/۲۳ ±۱/۷۳ mg/ml) می‌باشد. مقایسه نتایج حاصل از دو گروه (با و بدون اندوتلیال) با روش ANOVA دوطرفه نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه وجود دارد (p<۰/۰۰۰۱) و در نمودار شماره ۱ نتایج این مقایسه دیده می‌شوند. از ویژگی‌های مهم اثر مهاری عصاره، برگشت‌پذیر بودن آن است و لذا با شستشو و تعویض محلول حمام بافت اثر مهاری ایجاد شده



نمودار شماره ۱ ـ مقایسه اثر شل‌کننده عصاره آبی الکلی برگ مو بر انقباض ناشی از فنیل‌افرین μM۱ در آئورت‌های دارای اندوتلیال (intact، n=۹) و بدون اندوتلیال (denuded، n=۸). در تمام غلظت‌های عصاره، نتایج دو گروه با و بدون اندوتلیال دارای اختلاف معنی‌داری هستند (p<۰/۰۱) و آنالیز واریانس دو طرفه نشان می‌دهد که این دو گروه با P کوچکتر از ۰/۰۰۰۱ دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

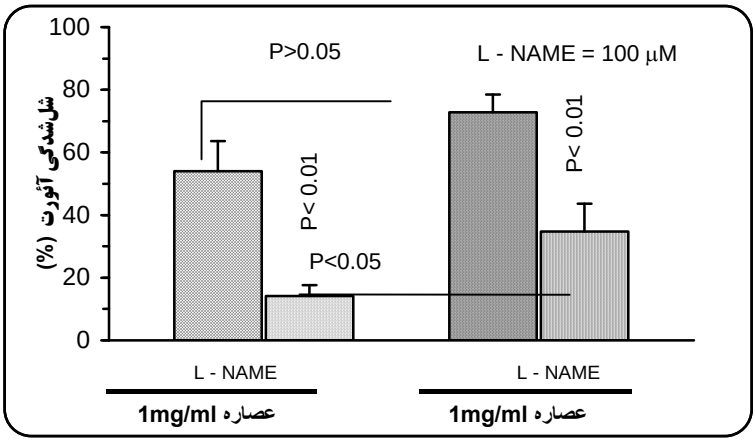
برطرف گردیده و بافت مجدداً آماده انقباض بود. مقایسه مقدار نیروی انقباضی (بر حسب گرم) در آئورت‌های با و بدون اندوتلیال نشان می‌دهد این دو اختلاف معنی‌داری با هم نداشته (p =۰/۱۷) و لذا تخریب اندوتلیال تاثیری بر مقدار نیروی انقباضی آئورت نداشته است. ضمناً، وزن موش‌ها در این دو گروه (۱۸۲±۱۵/۸ g در برابر ۱۰/۷ g ±۱۸۷/٤) اختلاف معنی‌داری نداشتند.

ب ـ تاثیر L-NAME بر عملکرد مهاری عصاره

در نمودار شماره ۲ دیـــده می‌شود که عملکرد مهاری عصاره با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حضور L-NAME (۱۰۰ µM) به‌مدت ۲ دقیقه در آئورت‌های اندوتلیال‌دار که با فنیل افرین (۱ µM) منقبض شده‌اند در مقایسه با حالت عدم حضور L-NAME به‌طور قابل ملاحظه کمتر می‌باشند. با توجه به نمودار شماره ۲ مشخص می‌شود، هنگامی که غلظت عصاره ۰/۵ mg/ml بود در غیاب L-NAME، درصد مهار انقباض ۹/٦ ± ٥٤ درصد ولی در حضور L-NAME به ۳/۵ ± ۱٤/۱ درصد رسیده است که تفاوت این دو اثر قابل ملاحظه می‌باشد (p=۰/۰۰۲). در غیاب L-NAME، عصاره با غلظت ۱ mg/ml سبب بروز ۵/۷± ۷۲/۹ درصد شلی گردیده ولی در حضور L-NAME درصد شلی ۸/۹± ۳٤/۷ درصد می‌باشد که این تفاوت نیز معنی‌دار می‌باشد (p =۰/۰۰۳). مقایسه درصد شلی ناشی از دو غلظت عصاره (تعداد در هر گروه = ٦) در حضور L-NAME تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵).

ج ـ تاثیر آتروپین بر عملکرد مهاری عصاره

آئورت‌های دارای اندوتلیال (n=۷) به‌وسیله فنیل افرین (۱ µM) منقبض شدند و سپس به‌وسیله استیل‌کولین (۱ µM) این انقباض مهار گردید (p<۰/۰۰۱). اضافه کردن آتروپین (۱ µM) به حمام بافت در زمان بروز حداکثر شلی، مهار ناشی از استیل‌کولین را کاهش داد (p<۰/۰۰۱). با این وجود، آتروپین نتوانست اثر شل‌کنندگی استیل‌کولین کاملاً حذف کند. در مرحله بعد، پس از تکرار انقباض آئورت، عصاره (۱mg/ml) باعث مهار انقباض گردید (p<۰/۰۰۰۱) ولی اضافه کردن آتروپین در زمان

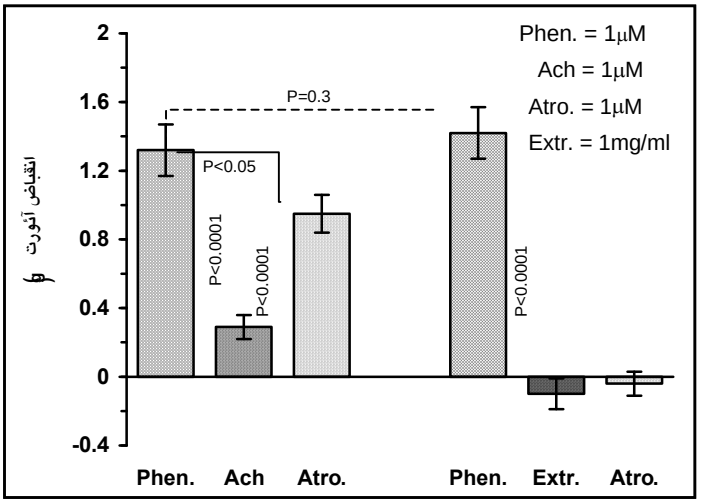


نمودار شماره ۲ ـ مقایسه اثر مهاری دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آبی الکلـــی برگ مو در حضور و در غیاب غلظت ۱۰۰ µM مهارکننده آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (L-NAME) در آئورت‌های دارای اندوتلیال موش صحرایی (تعداد نمونه در هـــر گروه = ۶) مقایسه‌های آماری (t- test) در نمودار نشان داده شده‌اند.

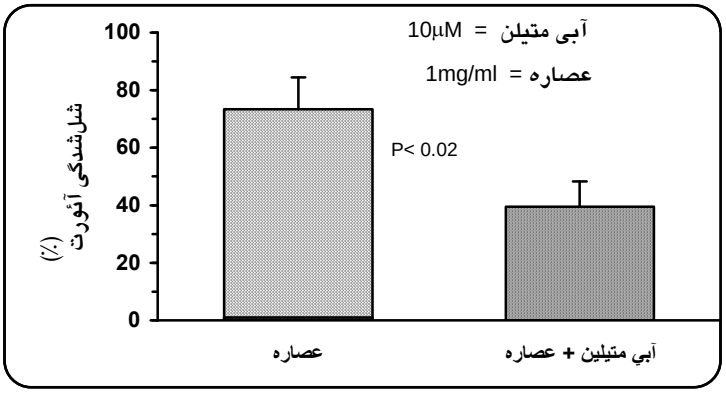
بروز حداکثر شلی ناشی از عصاره، تاثیری بر عملکرد مهاری عصاره نداشت. نمودار شماره ۳ نتایج این مرحله را نشان می‌دهد.

د ـ تاثیر آبی متیلن بر عملکرد مهاری عصاره

آبی متیلن مهارکننده guanylate cyclase بوده و معمولاً جهت بررسی دخالت سیستم NOergic در یک پدیده استفاده می‌شود [۳۰]. لذا در این مرحله، ابتدا اثر مهاری عصاره (۱mg/ml) بر انقباض ناشی از فنیل افرین (۱μM) در آئورت دارای اندوتلیال (n=۵) ثبت گردید. مهار ناشی از عصاره در این مرحله برابر با ۱۱/۱±۷۳/۳ درصد بود سپس، غلظت نهایی ۱۰ μM آبی متیلن در حمام ایجاد شد و آئورت به مدت ۳۰ دقیقه در آن نگهداشته شد. مجدداً به ترتیب فنیل افرین و عصاره با همان غلظت به حمام اضافه شد. مهار ناشی از عصاره در این مرحله ۸/۸±۳۹/۵ درصد بود که با نتیجه مرحله قبل دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۲). نتایج این مرحله (نمودار شماره ٤) نشان می‌دهد که آبی متیلن سبب کاهش عملکرد مهاری عصاره شده است.



نمودار شماره ۳ ـ مقایسه اثر آتروپین (۱μM) بر عملکرد مهاری استیل کولین (۱μM) و عصاره آبی الکلی برگ مو با غلظت ۱ mg/ml به دنبال انقباض آئورت‌های دارای اندوتلیال عدم تاثیر آتروپین بر عملکرد مهاری عصاره مشخص می‌باشد (تعداد آئورت‌ها در هر گروه = ۷). مقایسه‌های آماری در متن نمودار نشان داده شده‌اند.



نمودار شماره ۴ ـ مقایسه اثر شل‌کننده عصاره آبی الکلی برگ مو (۱ mg/ml) بر انقباض آئورت‌های دارای اندوتلیال ناشی از فنیل افرین (۱ μM) در غیاب و پس از ۳۰ دقیقه حضور غلظت ۱۰μM آبی متیلن (n=۹) اختلاف این دو گروه با p کوچکتر از ۰/۰۲ معنی‌دار می‌باشد.

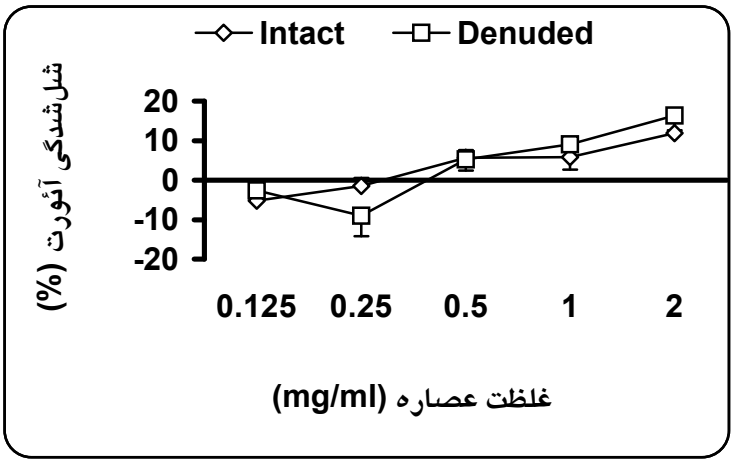
ر ـ اثر عصاره بر انقباض آئورت ناشی از کلرور پتاسیم و نقش اندوتلیال بر آن

در این مرحله دو گروه آئورت با اندوتلیال (n=۷) و بدون اندوتلیال (n =۷) پس از انقباض با غلظت ۸۰mM کلرور پتاسیم به مدت ۲ دقیقه مورد تاثیر غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره برگ مو قرار گرفتند [۲۶]. همان‌طوری که در نمودار شماره ۵ دیده می‌شود عصاره به صورت وابسته به غلظت و قابل ملاحظه قادر به مهار انقباض ناشی از کلرور پتاسیم در هر دو گروه آئورت می‌باشد (به روش ANOVA به ترتیب $p<۰/۰۰۱$ و $p<۰/۰۱$). همان‌طوری که در نمودار شماره ۵ دیده می‌شود عصاره در غلظت ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در هر دو گروه آئورت سبب انقباض شده ولی در غلظت‌های بیشتر موجب بروز شلی شده است. مقایسه نتایج آئورت‌های با و بدون اندوتلیال اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. میزان سلامت اندوتلیال در این دو گروه به ترتیب ۲/۸±۶۹/۸ و ۳/۲±۵ درصد بود و وزن موش‌های این دو گروه نیز اختلاف معنی‌داری نداشتند.

نمونه‌هایی از ثبت‌های حقیقی بعضی از اثرات غلظت‌های مختلف عصاره بر انقباض (ناشی از فنیل افرین و یا کلرور پتاسیم) در آئورت‌های با اندوتلیال سالم و تخریب شده و نیز در بعضی از مراحل این تحقیق در نمودار شماره ٦ دیده می‌شوند.

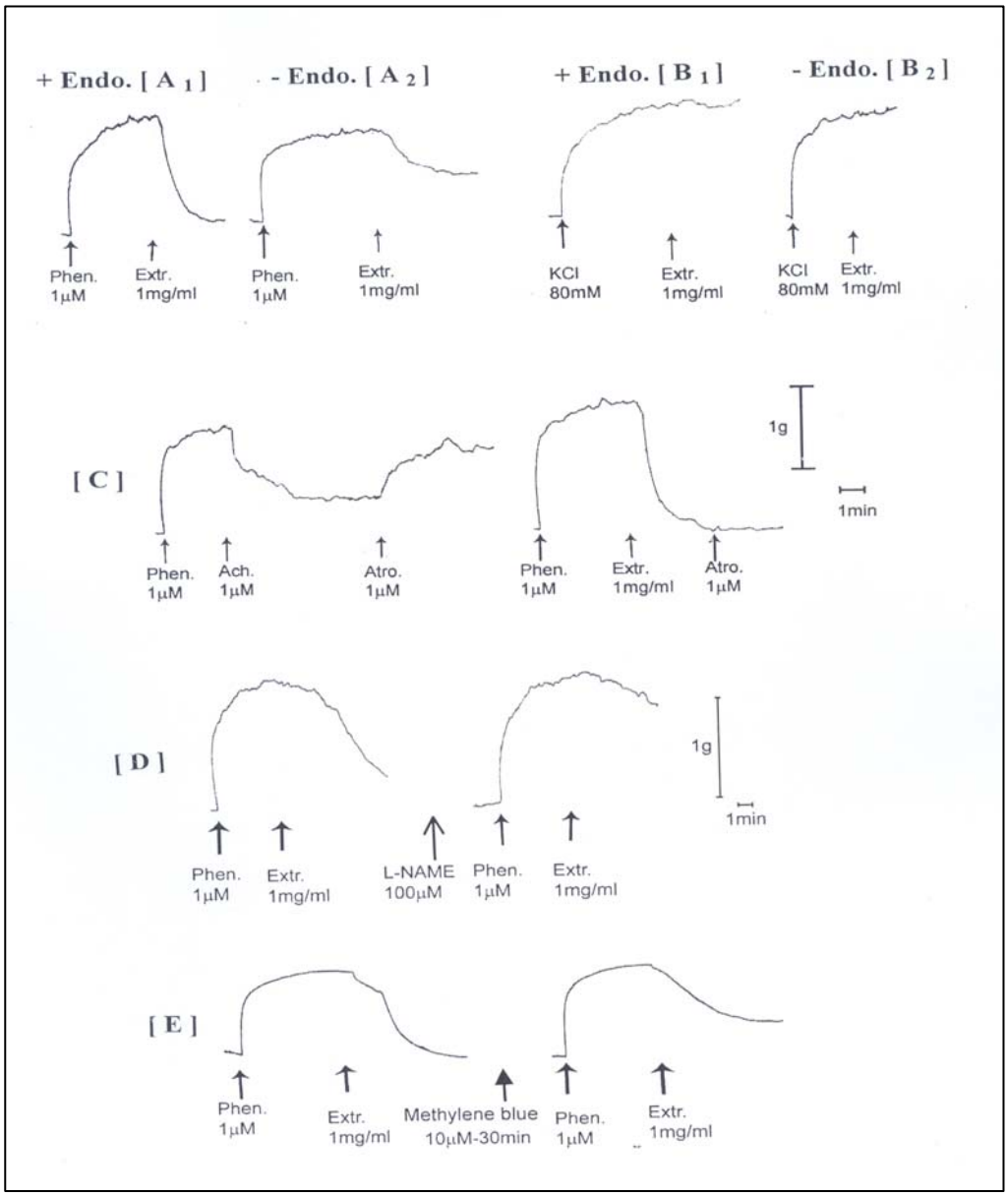
بحث

در تجربه حاضر، عصاره آبی الکلی برگ مو انقباض ناشی از فنیل افرین در آئورت سالم موش صحرایی را مهار نمود و تخریب لایه اندوتلیال این تاثیر مهاری را کاهش داد. فنیل افرین یک آگونیست انتخابی (selective-adrenergic agonist) رسپتور α_1 است ولی این رسپتور در سلول‌های اندوتلیال وجود ندارد و لذا موجب آزاد شدن وابسته به رسپتور مواد موثر عروقی (vasoactive substance) از سلول‌های اندوتلیال نمی‌شود [۳۱]. استیل‌کولین نیز از طریق یک مکانیسم وابسته به اندوتلیوم، موجب شل شدن عروق خونی می‌شود [۳۲]. با اتصال استیل‌کولین به



نمودار شماره ۵ ـ مقایسه اثر مهاری غلظت‌های مختلف عصاره آبی الکلی برگ مو بر انقباض ناشی از کلرور پتاسیم (۸۰mM) در آئورت‌های با اندوتلیال (Intact، n=۷) و بدون اندوتلیال (Denuded ، n=۷) آنالیز واریانس یک طرفه هر گروه با p کوچکتر از ۰/۰۱ ولی دو گروه اختلاف معنی‌داری ندارند. اثر انقباضی عصاره در غلظت‌های پایین در هر دو گروه مشاهده می‌شود.

رسپتورهای موسکارینیک، نیتریک اکساید (NO) از اندوتلیوم آزاد می‌گردد [۳۳]. نیتریک اکساید به سلول‌های عضلانی صاف مجاور انتشار یافته و با فعالیت کردن آنزیمsoluble guanylyl cyclase سبب افزایش cGMP و شل‌شدن عضله صاف آئورت می‌شود [۳٤،۳۵]. با توجه به بخش‌های ابتدایی نتایج این تحقیق، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که عملکرد مهاری عصاره برگ مو بر انقباض آئورت، وابسته به حضور اندوتلیال می‌باشد. زیرا حذف اندوتلیال موجب کاهش قابل ملاحظه در قدرت شل‌شدگی عصاره در آئورت گردیده است. با توجه به تشابه پاسخ این دو گروه آئورت به فنیل افرین، تفاوت اثر



نمودار شماره ۶ – نمونه‌هایی از ثبت‌های حقیقی از تاثیر غلظت ۱ mg/ml عصاره آبی الکلی برگ مو بر آئورت‌های با اندوتلیال (+Endo.) و بدون اندوتلیال (Endo. –) پس از انقباض با فنیل افرین به ترتیب [A1] و [A2] یا کلرور پتاسیم به ترتیب [B1] و [B2] و نیز عملکرد مهاری عصاره در حضور آتروپین [C]، L-NAME [D] و آبی متیلن [E]

مهاری عصاره نمی‌تواند ناشی تفاوت قدرت انقباضی آئورت‌ها باشد. عدم تاثیر حذف اندوتلیال در پاسخ انقباضی آئورت نیز قبلاً گزارش شده است [۳۶]. وجود ۳/۸ برابر اختلاف IC_{50} عصاره، در گروه‌های با اندوتلیال سالم و تخریب شده اهمیت اندوتلیال را در ایجاد شلی آئورت به‌وسیله عصاره برگ مو نشان داده که با گزارش اثر مهاری عصاره پوست میوه انگور بر انقباض عروق و نیز اثر پروسیانیدین دانه انگور بر آئورت انسان همخوانی دارد [۸،۳۷]. پروسیانیدین‌ها با افزایش cGMP سبب شلی وابسته به اندوتلیوم در آئورت موش شده که آتروپین برآن بی‌اثر بوده ولی با مهار آنزیم نیتریک اکساید سنتاز، کاهش می‌یابد. اهمیت اندوتلیال، اثر کاهنده مهار آنزیم نیتریک اکساید سنتاز و آبی متیلن و نیز عدم تاثیر آتروپین بر عملکرد مهاری پروسیانیدین گزارش شده با نتایج تحقیق حاضر نیز همخوانی دارد [۱۰]. با توجه به وجود فلاوونوییدها در برگ مو، می‌توان اثر مشاهده شده در این تحقیق را نیز به عملکرد این ترکیبات نسبت داد [۳۸]. همچنین، شل شدن آئورت بدون اندوتلیال نیز می‌تواند نتیجه باز شدن کانال‌های پتاسیم توسط عصاره و وقوع هیپرپلاریزاسیون باشد، ولی با توجه به ضعیف بودن اثر عصاره می‌توان نتیجه گرفت که این امر نقش کمتری در ایجاد شلی آئورت بدون اندوتلیال دارد [۳۵]. انقباض عضله صاف ناشی از غلظت‌های زیاد کلرور پتاسیم، نتیجه دپولاریزه شدن غشای سلول و متعاقب آن، بازشدن کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ می‌باشد. موادی که بتوانند از انقباض ناشی از کلرور پتاسیم جلوگیری کنند به‌عنوان مسدودکننده کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ معرفی می‌گردند [۳۹]. با توجه به نتایج مشاهده‌شده از تاثیر عصاره بر انقباض آئورت ناشی از کلرور پتاسیم می‌توان نتیجه گرفت، عصاره حاضر بخشی از عملکرد مهاری خود را از طریق انسداد کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ انجام می‌دهد. نتایج این مرحله با اثرات مشاهده شده از همین عصاره بر انقباضات کلرور پتاسیم در ایلئوم و رحم موش صحرایی و نیز اثرات منفی عصاره بر نیروی انقباضی و ضربان قلب جدا شده قورباغه و همچنین توانایی حذف اثر تحریکی اپی‌نفرین در قلب قورباغه همخوانی دارد [۱۸،۱۹،۲۰]. اگر چه تاثیر مهاری عصاره بر عملکرد انقباضی کلرور پتاسیم در سایر بافت‌ها (به غیر از آئورت) بسیار قوی‌تر بوده است که تحریک رسپتورهای α_1 توسط فنیل افرین سبب فعال شدن راه‌های ورود کلسیم از طریق کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ و نیز کانال‌های عمل‌کننده با رسپتور (receptor-operated channel) موجب انقباض عروق می‌شود [۴۰]. همچنین پیشنهاد شده است کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع L فراوان‌ترین نوع و مهمترین کانال کلسیمی در آئورت موش صحرایی می‌باشند [۳۹]. با توجه به اثر مهاری عصاره بر انقباض ناشی از کلرور پتاسیم می‌توان پیشنهاد نمود که بخشی از اثر مهاری عصاره، از طریق انسداد کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ بوده است. اما، اثر مهاری ضعیف‌تر عصاره بر انقباض ناشی از کلرور پتاسیم در مقایسه با انقباض ناشی از فنیل افرین در آئورت، می‌تواند بیانگر این نکته باشد که مهار انقباض از طریق انسداد کانال‌های کلسیمی نیز نقش کمتری در عملکرد مهاری عصاره دارد. مهار قوی‌تر عصاره بر انقباض ناشی از فنیل افرین می‌تواند نتیجه اشغال رسپتورهای α_1 توسط مواد موجود در عصاره نیز باشد. گزارش شده است که L-NAME با مهار آنزیم نیتریک اکساید سنتاز مانع سنتز NO از سلول‌های اندوتلیال آئورت می‌گردد [۳۴]. تجربه حاضر نیز نشان می‌دهد که حضور L-NAME سبب کاهش عملکرد مهاری عصاره گردیده که این مطلب می‌تواند دلیلی بر عملکرد مهاری عصاره از طریق افزایش آزادسازی NO از لایه اندوتلیال باشد. نتایج این بخش همچنین نشان می‌دهند که در حضور غلظت کمتر عصاره، تاثیر مهاری L-NAME قویتر خواهد بود. با توجه به

گزارش اثر شل‌کنندگی ماده quercetin (از فلاوونوییدها) بر آئورت از طریق فعال‌کردن NO سنتاز و نیز اثر L-NAME در مهار این اثر می‌توان پیشنهاد نمود quercetin یا مشتقات آن که در برگ مو وجود دارد یکی از عوامل موثر در عملکرد مهاری عصاره در این تجربه باشد [۳۸،٤۱]. عملکرد مهاری quercetin استخراج شده از شربت انگور و بعضی از انواع شراب در افزایش تولید NO و cGMP و بروز شلی در آئورت نیز قبلاً گزارش شده که با نتایج تحقیق حاضر نیز همخوانی دارد [٤۲]. نکته‌ای که در این مرحله مطرح می‌شود آن است که احتمال دارد عصاره برگ مو دارای ترکیب و یا ترکیباتی با عملکردی کولینرژیکی (شبیه استیل‌کولین) بر آئورت باشد. برای یافتن پاسخ، عملکرد مهاری عصاره و استیل‌کولین در حضور و در غیاب آتروپین بررسی و مقایسه شدند. در قسمت نتایج ذکر شد، آتروپین سبب کاهش عملکرد مهاری استیل‌کولین شد ولی اثری بر عملکرد عصاره نداشت که نشان می‌دهد عصاره حاضر فاقد این گونه مواد می‌باشد. در تایید این یافته می‌توان به تاثیر همین عصاره در قلب جدا شده قورباغه اشاره نمود که در آن، استیل‌کولین سبب کاهش ضربان و نیروی انقباضی قلب شد و آتروپین این اثر را مهاری از بین برد ولی، آتروپین تاثیری بر کاهش ضربان ناشی از همین عصاره نداشت [۲۰]. اثرات مشاهده شده قبلی این عصاره بر عضله صاف و قلب و اکنون، اثرات اتساع عروقی آن، می‌تواند زمینه تازه‌ای جهت تحقیق وسیع‌تر درباره اثرات این عصاره بر بیماری زیادی فشار خون مطرح سازد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش به عنوان طرح تحقیقاتی شماره ۳٦۹ از سوی شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اهواز تصویب شده و از حمایت مالی این دانشگاه برخوردار بوده است. لذا مجری طرح از مسؤولان ذیربط صمیمانه تشکر می‌نماید.

منابع

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

۲. زرگری علی. *گیاهان دارویی*. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۷۱، جلد اول، صفحات ٥-۳٦۲.

3. Brouillard R, George F, Fougerousse A. Polyphenols produced during red wine aging. *Biofactors.* 1997; 6: 403-10.

4. Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM. Comparative study of radical cavenger and antioxidant properties of phenol compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro test. *Life Sci.* 1997; 61: 2103-10.

5. Kopp P. Resveratrol, a polyestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'. *Eur. J Endocrinol.* 1998; 138: 619-20.

6. Yu H, Zhao X, XU G, Wang SE. Effect of grape seed extracts on blood lipids in rabbits model with hyperlipidemia. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2002; 31: 114-16.

7. Rays S, Bagchi D, Lim PM, Bagchi M, Gross SM, Kothari SC, Preuss HG, Stohs SJ. Acute and long-term safety evaluation of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 2001; 109: 165-97.

8. 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.*2003; 73: 2883-98.

۱۸. غریب‌ناصری محمدکاظم، اعتماد ندا، نجفی‌اردکانی زلیخا. *اثر عصاره آبی الکلی برگ مو Vitis vinifera بر فعالیت مکانیکی ایلئوم موش صحرایی.* شانزدهمین کنگره فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران، تهران. اردیبهشت ۱۳۸۲، صفحهٔ ۸٤.

۱۹. غریب ناصری محمد کاظم، احسانی پروین. *اثر عصاره آبی الکلی برگ مو (Vitis vinifera L.) بر رحم جدا شده موش صحرایی باکره.* اولین کنگره پیشگیری از بیماریهای غیر واگیر. تهران. ۱۳۸۱، صفحه ۱۳۱.

۲۰. غریب‌ناصری محمدکاظم. *اثر عصاره آبی الکلی برگ مو Vitis vinifera بر قلب پرفیوز شده قورباغه.* شانزدهمین کنگره فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران، تهران. ۱۳۸۲، صفحهٔ ۱۵۳.

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.* 2000; 50: 109-17.

22. 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.* 1993; 31: 482-4.

۲۳. صمصام‌شریعت هادی. *عصاره‌گیری مواد موثره گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی و ارزشیابی آنها.* انتشارات مانی، اصفهان. ۱۳۷۱، صفحات ۱۷-۱۳.

۲۴. گودینی علی اشرف. *بررسی اثرات عصاره آبی الکلی برگ کنار (Zizyphus spina christi) بر سیستم قلب و عروق در موش صحرایی.* پایان‌نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز. دی ماه ۱۳۸۱.

9. Fitzpatrick DF, Bing B, Maggi DA, Fleming RC, O'Malley RM. Vasodilating procyanidins derived from grape seed. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002; 957: 78-89.

10. Kim SH, Kang KW, Kim KW, Kim ND. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sci*. 2000; 67: 121-31.

11. Lemos VS, Fretas MR, Muller B, Lino YD, Queirogo CEG, Cortes SF. Dioclein, a new nitric oxide-and endothelium-dependent vasodilattor flavonoid. *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 386: 41-6.

12. SatoM, Maulik G, Ray PS, Bagchi D, Das DK. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidins against ischemic reperfusion injury. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1999; 31: 1289-97.

13. Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Tokutake S. Procyanidin-rich extract from grape seeds prevents cataract formation in hereditary cataractous (ICR/f) rats. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 4983-8.

14. Singletary KW, Meline B. Effect of grape seed proanthocyanidins on colon aberrant crypts and breast tumors in a rat dual-organ tumor model. *Nutr. Cancer.* 2001; 39: 252-8.

15. Koga T, Moro K, Nakamori K, Yamakoshi J, Hosoyama H, Kataoka S, Arigo T. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 1892-7.

16. Carini M, Aldini G, Bombardelli E, Morazzoni P, Maffei Facino R. UVB-induced hemolysis of rat erythrocytes: protective effect of procyanidins from grape seeds. *Life Sci.* 2000; 67: 1799-814.

17. Bagchi D, Gary A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX, Stohs SJ. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol*. 1997; 95: 179-89.

25. Kim JH, Hong Y, Shim CS. Mechanism of UV light-induced photorelaxation in isolated rat aorta. *J. Vet. Sci*. 2000; 1: 81-6.

26. 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.* 2002; 80: 37-42.

27. Barriere E, Tazi KA, Pessione F, Heller J, Poirel O, Lebrec D, Moreau R. Role of small-conductance Ca^{2+}- dependent K^{+} channels in in vitro nitric oxide-mediated aortic hyporeactivity to α-adrenergic vasoconstriction in rats with cirrhosis. *J. Hepathol*. 2001; 35: 350-7.

28. Legssyer A, Ziyyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Tahri A, Serhrouchni M, Hoerter J. Cardiovascular effects of Urtica dioica L. in isolated rat heart and aorta. *Phytother Res.* 2002; 16: 503-7.

29. Ziyyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Tahri A, Legssyer A, Hoerter J, Fischmeister R. Arbutus unedo induced endothelium- dependent relaxation of the isolated rat aorta. *Phytother Res.* 2002; 16: 572-5.

30. Volke V, Wegener G, Vasar E, Rosenberg R. Methylene blue inhibits hippocampal nitric oxide systhase activity in vivo. *Brain Research*. 1999; 826: 303-5.

31. Cocks TM, Angus JA. Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature*. 1983; 305: 627-30.

32. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 299: 373-6.

33. Dauphin F, Hamel E. Muscarinic receptor subtype mediating vasodilation feline middle cerebral artery exhibits M3 pharmacology. *Eur. J. Pharmacol*. 1990; 178: 203-13.

34. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev*. 1991; 43: 109-42.

35. Kim ND, Kang KW, Kang SY, Vanhoutte PM. Alpha2-adrenoceptor antagonists evoke endothelium- dependent and –independent relaxation in the isolated rat aorta. *J.Cardiovasc. Pharmacol*. 1999; 34: 148- 52.

36. Tunctan B, Altug S, Uludag O, Abacioglu N. Effects of econazole on receptor-operated and depolarization- induced contractions in rat isolated aorta. *Life Sci.* 2000; 67: 2393-401.

37. Soares DeMoura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carralho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmao Correia ML. Antihypertension, vasodilation and antioxidant effects of a *vitis vinifera* grape skin extract. *J.Pharm. Pharmacol.* 2002; 54: 1515-20.

38. 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.* 1989; 47: 229-34.

39. Wang GJ, Wu XW, Lin YL, Ren J, Shum AYC, Wu YY, Chen CF. Ca^{2+} channel blocking effect of iso-S- petasin in rat aortic smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 445: 239-45.

40. Bulbring E, Tomita T. Catecholamine action on smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 1987; 39: 49-96.

41. 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.* 2001; 69: 2327-36.

42. Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am. J. Physiol.* 1993; 265: H774-H8.