Effect of *Vitis Vinifera* Leaf Hydroalcoholic Extract on Rat Urinary Bladder Contractility

Gelareh Vakilzadeh[1, 2 *], Samane Sadat Dastgheib[3], Mohammad Kazem Gharib Naseri [4]

[1] Shefa Neuroscience Research Center, Khatam-al-Anbia Hospital, Tehran, Iran.
[2] School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[3] School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
[4] School of Medicine, Jondishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Article Info:
Received: **7 Aug, 2013** ***Accepted:*** **7 Nov, 2013**

ABSTRACT

Introduction: Several reports have shown the various medicinal effects of grape (*Vitis vinifera*) seed and skin extracts, such as antioxidant, hypotensive and vasodilatory effects. It has been recently shown the relaxatory effect of grape leaf hydroalcoholic extract on rat ileum, uterus, aorta, trachea and vas deferens as well as on frog isolated heart. The aim of the present study was to investigate the effect of *Vitis vinifera* leaf hydroalcoholic extract (VLHE) on contractility of urinary bladder smooth muscle in male rats and to study the mechanism(s) of its action. ***Materials and Methods:*** The extract of dried grape leaf was prepared by macerated method using 70% ethanol for 72h in room temperature. The solvent was then evaporated. Urinary bladder was removed from male adult wistar rats after induction of deep anaesthetize by di-ethyle-ether. Tissues were then suspended in the organ bath containing physiologic solution (37°C, pH 7.4) bubbled with oxygen. Contractions were recorded isometrically under 1g resting tension. ***Results:*** VLHE at 1, 2, 4 and 8 mg/ml significantly reduced the urinary bladder contractions evoked by KCl (60 mM; $P<0.05$) and (0.5, 1, 2 and 4 mg/ml) also reduced the contractions evoked by Acetylcholine (5 µM) dose dependently ($P<0.05$). In calcium free physiologic solution, KCl-induced (120 mM; $P<0.05$) contractions were occurred only after adding calcium (0.312, 0.625, 1.25, 2.5 and 5 mM) to the organ bath solution. VLHE (2 mg/ml) also reduced different concentration of calcium-induced contraction in the presence of KCl ($P<0.05$). The VLHE- induced urinary bladder relaxation was unaffected by propranolol (1 µM for 20 mins) while the presence of tetraethylamonium (10 mM for 20 mins) could strongly reduce the relaxatory effect of VLHE. ***Conclusion:*** The data suggest that VLHE induces spasmolytic effect in rat urinary bladder, possibly via blocking voltage dependent calcium channels and activation of calcium-activated potassium channels.

Key words:

1. *Vitis Vinifera*
2. Urinary Bladder
3. Calcium Channels
4. Potassium Channels, Calcium-Activated
5. Rats

*** *Corresponding Author:*** Gelareh Vakilzadeh

E-mail: *g_vakilzadeh@yahoo.com*

اثر عصاره ی آبی الکلی برگ مو بر فعالیت انقباضی مثانه ی موش صحرایی

گلاره وکیل زاده [۱،۲*]، سمانه سادات دستغیب [۳]، محمد کاظم غریب ناصری [۴]

[۱] مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران.
[۲] دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۳] دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
[۴] دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۶ مرداد ۱۳۹۲
تاریخ پذیرش: ۱۶ آبان ۱۳۹۲

چـــکیده

مقدمه: تاکنون گزارش هایی درباره ی اثر آنتی اکسیدانی، کاهش فشار خون و اثر اتساع عروقی عصاره ی دانه ی انگور و پوست میوه ی آن ارائه شده است. اثرات شل کننده ی برگ انگور نیز بر انقباض ایلئوم، رحم، آئورت، نای و مجرای دفران موش صحرایی و اثرات کاهنده ی نیروی انقباضی و ضربان قلب قورباغه نیز گزارش شده است. هدف این تحقیق بررسی اثرات عصاره ی آبی الکلی برگ مو بر فعالیت انقباضی عضله ی صاف مثانه در موش صحرایی نر و تا حد امکان تعیین مکانیسم این اثرات می باشد. **مواد و روش ها:** عصاره ی آبی الکلی برگ های سبز و تازه خشک شده ی انگور با استفاده از روش خیساندن در الکل ۷۰٪ پس از ۷۲ ساعت و سپس تبخیر حلال تهیه گردید. مثانه از موش های نر بالغ ویستار پس از القای بیهوشی عمیق به وسیله دی اتیل اتر جدا گردید و در حمام بافت حاوی محلول فیزیولوژیک (pH ۷/۴ و دمای ۳۷°C) قرار داده شده و حباب های اکسیژن به آن دمیده می شد. انقباضات عضله تحت ۱ گرم کشش اولیه به روش ایزومتریک اندازه گیری شد. **یافته ها:** نتایج نشان می دهد که عصاره ی آبی الکلی برگ مو با غلظت های ۱، ۲، ۴ و ۸ mg/ml انقباض ناشی از کلرور پتاسیم ۶۰ میلی مولار ($P<۰/۰۵$)، همین طور غلظت ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ mg/ml عصاره، انقباض ناشی از استیل کولین ۵ میکرومولار را در مثانه به صورت وابسته به غلظت کاهش داد ($P<۰/۰۵$). در محلول فیزیولوژیک فاقد کلسیم، انقباض کلورپتاسیم ۱۲۰ میلی مولار ($P<۰/۰۵$) مشروط به اضافه کردن کلسیم ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ میلی مولار به محیط بود. در تکرار همین مرحله با حضور عصاره با غلظت ۲ mg/ml انقباض ناشی از غلظت های مختلف کلسیم کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). حضور پروپرانولول یک میکرومولار به مدت ۲۰ دقیقه، اثری بر عملکرد مهاری عصاره نداشت در حالی که حضور تترا اتیل آمونیوم ۱۰ میلی مولار به مدت ۲۰ دقیقه توانست اثر مهاری عصاره را از بین برده و انقباض ناشی از استیل کولین را به حالت اولیه برگرداند. **نتیجه گیری:** اثر شل کنندگی عصاره ی آبی الکلی برگ مو بر مثانه ی موش صحرایی احتمالاً از طریق انسداد کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ و فعال کردن کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم انجام می شود.

کلید واژه ها:
۱. برگ مو
۲. مثانه
۳. کانال های کلسیمی
۴. کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم
۵. موش صحرایی

* **نویسنده مسئول:** گلاره وکیل زاده
آدرس الکترونیکی: *g_vakilzadeh@yahoo.com*

مقدمه

انگور (*Vitis vinifera*) گیاهی است از خانواده Vitaceae که منشأ آن را شمال غربی ایران می دانند. میوه ی آن در سه حالت نارس (غوره)، رسیده و خشک شده (کشمش) استفاده ی خوراکی دارد. در مورد خواص عصاره ی دانه ی انگور و حتی پوست میوه ی آن مطالعات زیادی انجام شده است و از جمله ترکیبات مهم شناخته شده ی آن می توان به پروسیانیدین ها از گروه پلی فنل ها اشاره کرد. در مورد اثرات برگ مو (انگور) نیز گزارشات متعددی وجود دارد با این وجود تعداد این گزارش ها کمتر از مطالعات انجام شده در مورد دانه ی آن می باشد.

در قدیم برگ های مو به صورت جوشانده در رفع دیسانتری، خون روی ها، نقرس، زردی، استفراغ و واریس مصرف می شده و گرد برگ های جوان و خشک شده ی مو، اثرات زیادی در رفع خون روی ها مانند خون روی های رحمی و خونریزی از بینی داشته است. در برخی از کتب، این برگ در درمان بیماری های پوستی، هموروئید و اسپلنومگالی، همچنین در التیام زخم ها به عنوان یک داروی سنتی به کار برده می شود (۱).

مطالعات اخیر در مورد عصاره ی برگ مو نشان داده اند که عصاره ی آبی الکلی این برگ در موش صحرایی سبب شل شدن آئورت (۲)، نای (۳) و مجرای دفران (۴) گردیده و در قلب ایزوله ی قورباغه نیز موجب کاهش ضربان قلب و نیروی انقباضی آن می گردد (۲). در نتیجه با توجه به روشن نبودن اثرات این گیاه بر روی عضله ی صاف مثانه، هدف تحقیق حاضر، بررسی عصاره ی برگ مو بر فعالیت انقباضی عضله ی صاف مثانه در موش صحرایی و تا حد امکان تعیین و شناسایی مکانیسم این اثر می باشد.

مواد و روش ها

تهیه ی پودر حاصل از برگ

برگ های انگور از محوطه ی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز در زمان گل دهی (فروردین ماه) تهیه و با شماره هرباریوم Ao639001M در هرباریوم آن دانشکده ثبت و نگهداری شدند. برگ ها پس از خشک شدن در سایه، آسیاب شده و پودر آن ها تا زمان عصاره گیری در یخچال نگهداری شد. جهت تهیه ی عصاره، پودر برگ به مدت ۷۲ ساعت در الکل اتانول ۷۰ درصد (محصول شرکت مرک) خیسانده شده و هر روز در چند نوبت مخلوط و به هم زده شد (۵). سپس مخلوط از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد و محلول عصاره روی سطح شیشه گسترده شد تا حلال در دمای اتاق تبخیر شود. با تراشیدن عصاره ی خشک شده از روی سطح شیشه، پودر عصاره به دست آمد که تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. درصد استخراج عصاره از پودر برگ خشک ۱۹٪ بود.

آماده سازی بافت و روش کار

موش های صحرایی نر بالغ از نژاد Wistar با محدوده ی وزنی ۱۸۰ تا ۲۵۰ گرم انتخاب شدند که پس از القای بیهوشی عمیق به وسیله ی دی اتیل اتر، شکم موش از ناحیه ی تحتانی باز شده و پس از ظاهر شدن مثانه، دو نوار طولی به حدود ۱۰ تا ۱۵ میلی متر و پهنای ۲ میلی متر از آن جدا گردید. سپس نوار مثانه به حمام بافت حاوی ۱۰ ml محلول فیزیولوژیک (با pH=۷/۴ و دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد) منتقل شدند. ترکیب محلول فیزیولوژیک مثانه (بر حسب mmol/l) شامل: NaH2PO4 (۱)، CaCl2 (۲/۵)، KCl (۴/۷)، NaCl (۱۱۸)، NaHCO3 (۲۵)، MgCl2 (۰/۵) و گلوکز (۱۱/۱) بود (۶). جهت ایجاد انقباض نوار مثانه، از دو محرک مختلف کلرورپتاسیم با غلظت ۶۰ mM (۷) و استیل کولین با غلظت ۵ µM (۸) استفاده شد. پاسخ انقباضی به وسیله ی دستگاه ثبات Universal Harvard) Oscillograph) با سرعت ۱ mm/s بر روی کاغذ ثبت گردید.

میزان کشش اولیه ی بافت در مدت آزمایش ۱ گرم و مدت سازگاری بافت ۶۰ دقیقه بود و در این مدت هر ۱۵ دقیقه، محلول حمام تعویض می شد و حباب های کوچک اکسیژن در طول آزمایش محلول حمام را اکسیژنه می کرد. بسته به نحوه ی انجام آزمایش، از یک تا چند غلظت عصاره (۱، ۲، ۴، ۸ mg/ml) قبل از ایجاد انقباض و یا زمان رسیدن انقباض به حالت کفه، به مدت ۳ دقیقه به حمام بافت اضافه می شد. فاصله ی زمانی بین اجرای ۲ مرحله ی آزمایش و بازگشت تون بافت به سطح اولیه ۱۰ دقیقه بود. تعداد نمونه های استفاده شده در هر مرحله ۷ عدد بود (n=۷).

به منظور بررسی خاصیت آدرنرژیکی عصاره و دخالت گیرنده های بتا – آدرنرژیک، از پروپرانول با غلظت ۱ µM قبل از ایجاد انقباض توسط کلرورپتاسیم و اضافه شدن عصاره، به مدت ۲۰ دقیقه (۹) استفاده شد. همچنین تترا اتیل آمونیوم (TEA) با غلظت ۱۰ mM جهت بررسی دخالت کانال های پتاسیم وابسته به کلسیم (۱۰) نیز بکار برده شد که ابتدا اثر عصاره بر انقباض ناشی از استیل کولین ۱ µM ثبت و سپس، همین مراحل پس از ۲۰ دقیقه در حضور این ماده تکرار شد.

علاوه بر آن، به منظور بررسی دخالت کلسیم خارج سلولی در عملکرد مهاری عصاره از محلول فیزیولوژیک فاقد کلسیم و دارای پتاسیم ۱۲۰ mM استفاده شد. در این مرحله ابتدا اثر اضافه کردن کلسیم بصورت تجمعی، حداقل دو غلظت کمتر از نرمال، غلظت نرمال و دو غلظت بالاتر از نرمال (۲/۵، ۵ mM، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲) در ایجاد انقباض بررسی و سپس همین پروتکل پس از شستشوی کامل و برگشت بافت به حالت پایه، در حضور غلظت مناسب عصاره تکرار شد.

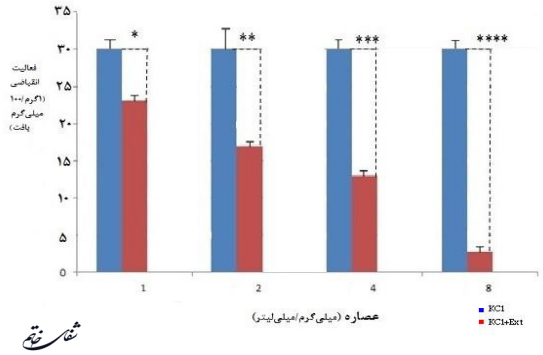
روش های بررسی آماری نتایج

نتایج گروه های مختلف به صورت مقدار نیروی انقباضی (گرم) به ازاء ۱۰۰ میلی گرم بافت با توجه به gain و کالیبراسیون اولیه دستگاه ثبات محاسبه می شد. نتایج گروه ها (Mean±SEM) با استفاده از آزمون های آماری t-test (جهت مقایسه دو میانگین)، ANOVA یک طرفه (جهت مقایسه چند میانگین) مقایسه شده و مقادیر P کوچکتر از ۰/۰۵ تفاوت معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

اثرعصاره ی برگ مو بر انقباض مثانه ناشی از کلرورپتاسیم

کلرورپتاسیم با غلظت ۶۰ mM (۷) سبب انقباض مثانه گردید و سه دقیقه حضور اولیه ی عصاره ی برگ مو (۱، ۲، ۴، ۸ mg/ml) به صورت وابسته به غلظت، انقباض ناشی از کلرورپتاسیم را کاهش داد. در نمودار ۱ نتایج این مرحله، تأثیر بعضی از غلظت های مختلف عصاره بر انقباض ناشی از کلرورپتاسیم در مثانه مشاهده می شود.



نمودار۱- اثر مهاری غلظت‌های مختلف عصاره ی (Ext) آبی الکلی برگ مو بر انقباض ناشی از کلرورپتاسیم (KCl; ۶۰ mM) در مثانه ی موش صحرایی. مقایسه آماری (t-test) عملکرد مهاری عصاره در غلظت‌های ۱، ۲، ۴ و ۸ mg/ml معنی‌دار می باشند (*$P<0/05$، **$P<0/01$، ***$P<0/001$ و ****$P<0/0001$).

مقایسه ی نیروی انقباضی (بر حسب گرم به ازای ۱۰۰ میلی گرم بافت) ناشی از ۴ بار استفاده از کلرورپتاسیم قبل از بکار بردن غلظت های مختلف عصاره نشان می دهد که این انقباضات اختلاف معناداری با هم ندارند ($P>0/05$) بنابراین می توان گفت که اثر مهاری عصاره برگشت پذیر می باشد.

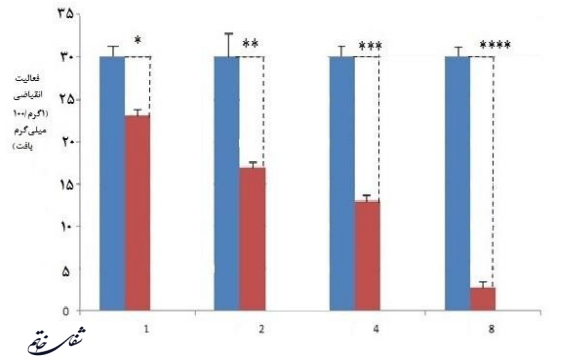
اثر عصاره ی برگ مو بر انقباض مثانه ناشی از استیل کولین

ابتدا نیروی انقباضی مثانه با استیل کولین ۵ µM (۱۱) بررسی گردید. در مراحل بعد، پس از هر بار اضافه کردن عصاره غلظت های مختلف (۰/۵،۱، ۲، ۴ mg/ml) به حمام به مدت سه دقیقه انقباض ناشی از استیل کولین به صورت وابسته به غلظت کاهش یافت.

جهت برگشت پذیر بودن اثر مهاری عصاره، قبل از بکار بردن غلظت های مختلف آن، از استیل کولین جهت تحریک بافت استفاده شد که در نمودار ۲ مقایسه ی نیروی انقباضی (بر حسب گرم به ازای ۱۰۰ میلی گرم بافت) در ۴ بار استفاده از استیل کولین نشان داد که این انقباضات اختلاف معنی داری با هم ندارند ($P>0/05$) و اثر مهاری عصاره برگشت پذیراست.

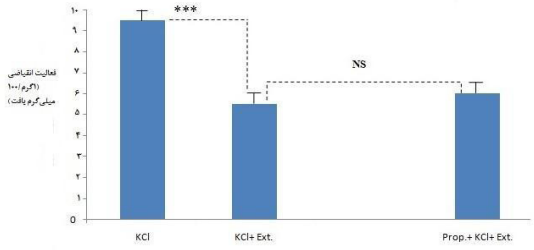
اثر عملکرد مهاری عصاره ی برگ مو بر انقباض مثانه ناشی از کلرورپتاسیم در حضور پروپرانولول

در این مرحله ابتدا عملکرد مهاری عصاره ۲ mg/ml بر انقباض ناشی از کلرورپتاسیم ۶۰ mM ثبت شد. پس از تعویض محلول حمام و استراحت ۱۰ دقیقه ای بافت غلظت ۱ µM پروپرانولول (۸) به حمام اضافه شده و پس از ۲۰ دقیقه (۵۵) از کلرورپتاسیم و عصاره با همان غلظت استفاده شد.



نمودار۲- اثر مهاری غلظت‌های مختلف عصاره ی (Ext) آبی الکلی برگ مو بر انقباض ناشی از استیل کولین (Ach; ۵ µM) درمثانه ی موش صحرایی. مقایسه آماری (t-test) عملکرد مهاری عصاره در غلظت‌های (۰/۵، ۱، ۲، ۴ mg/ml) معنی‌دار می باشند (*$P<0/05$، **$P<0/01$، ***$P<0/001$ و ****$P<0/0001$).

نمودار ۳ نشان می دهد پروپرانولول بر انقباض ناشی از کلرورپتاسیم اثری نداشته و تأثیری بر عملکرد عصاره نگذاشته است ($P>0/05$).



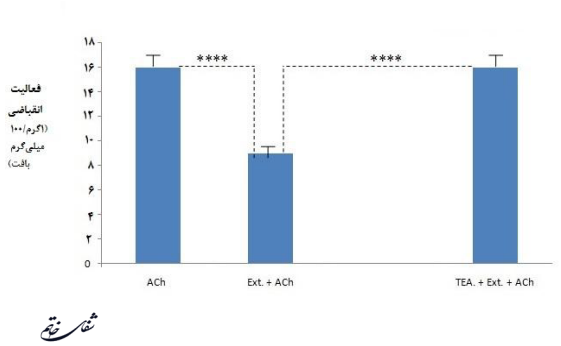
نمودار۳- اثر مهاری عصاره ی (Ext) آبی الکلی برگ مو (۲ mg/ml) بر انقباض ناشی ازکلرورپتاسیم (KCl; ۶۰ mM) درغیاب و در حضور ۲۰ دقیقه پروپرانولول (Prop; ۱ µM) درمثانه ی موش صحرایی. به طوری که مشاهده می‌شود حضور پروپرانولول بر انقباض ناشی از کلرور پتاسیم و عملکرد مهاری عصاره ی برگ مو تأثیری نداشته است (***$P<0/001$).

تأثیر دخالت کانال های پتاسیم حساس به کلسیم در عملکرد مهاری عصاره ی برگ مو بر انقباض ناشی از استیل کولین

جهت بررسی این مرحله از تترا اتیل آمونیوم (TEA) ۱۰ mM (۱۰) جهت مسدود کردن کانال های پتاسیم حساس به کلسیم استفاده شد. مراحل ابتدایی مشابه مراحل قبل بوده به نحوی که ابتدا اثر انقباضی استیل کولین ۵ µM ثبت گردید. سپس با گذشت ۱۰ دقیقه و شستشو، اثر مهاری عصاره ۱ mg/ml ثبت شد و در نهایت پس از استراحت مجدد ۱۰ دقیقه ای TEA به حمام اضافه شده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه (۹) عصاره و استیل کولین به حمام اضافه شدند. نمودار ۴ نشان می دهد TEA توانسته است اثر مهاری عصاره را از بین برده و انقباض ناشی از استیل کولین را به حالت اولیه برگرداند.

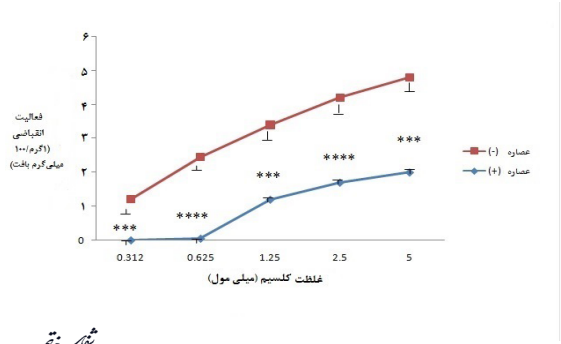
اثر عصاره ی برگ مو بر انقباض مثانه ناشی از کلسیم

در این مرحله از محلول فیزیولوژیک فاقد کلسیم و دارای پتاسیم ۱۲۰ mM استفاده شد. همان طور که در قبل نیز ذکر شد ابتدا اثر اضافه کردن کلسیم به صورت تجمعی حداقل دو غلظت کمتر از نرمال، غلظت نرمال و دو غلظت بالاتر از نرمال (۲/۵، ۵ mM، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲) در ایجاد انقباض بررسی شد.



نمودار۴- مقایسه نیروی انقباضی مثانه ی موش صحرایی ناشی از استیل کولین (Ach; ۵ µM) به تنهایی و تأثیر مهاری ۳ دقیقه حضور عصاره ی (Ext) برگ مو (۱ mg/ml) بر این انقباض و نیز اثر ۲۰ دقیقه تترا اتیل آمونیوم (TEA; ۱۰ mM) برعملکرد مهاری عصاره (****$P<0/0001$). به طوری که مشاهده می‌شود TEA توانسته است عملکرد مهاری عصاره را به طور معنی‌داری کاهش دهد.

سپس همین پروتکل پس از شستشو در حضور غلظت ۲ mg/ml عصاره ی برگ مو به مدت ۳ دقیقه تکرار شد. نمودار ۵ بیانگر آن است که عصاره ی برگ مو سبب کاهش میزان انقباض ناشی از غلظت های مختلف کلسیم شده است.



نمودار۵- اثر مهاری عصاره ی آبی الکلی برگ مو (۲ mg/ml) بر انقباض ناشی ازغلظت‌های مختلف کلسیم (۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ mM در محلول فیزیولوژیک فاقد کلسیم. مقایسه آماری (t-test) نشان می دهد که در زمان حضور عصاره، انقباضات ناشی از کلسیم تفاوت معنی‌داری باهم دارند (***$P<0/001$، ****$P<0/0001$).

بحث و نتیجه گیری

نتایج تحقیق نشان می دهد که عصاره ی آبی الکلی برگ مو، انقباضات ناشی از کلرورپتاسیم و استیل کولین را به صورت وابسته به غلظت کاهش می دهد. اثرات مهاری مشاهده شده از عصاره در مورد هر دو عامل تحریکی بکار رفته پایدار نبود و با شستشوی بافت و تعویض محلول حمام از بین می رفت. این نکته نشان می دهد که تأثیر مهاری عصاره باید پدیده ای در سطح سلول بوده و مربوط به پدیده های درون سلولی نباشد. زیرا چنانچه این اثر مهاری نتیجه ی پدیده و مکانیسم درون سلولی بود، با شستشو و تعویض محلول حمام بافت، این اثر مهاری به سرعت بر طرف نمی شد.

نقش پتاسیم خارج سلولی در بروز دپلاریزاسیون سلول های عضلانی صاف مثانه، باز کردن کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ (۱۲) و افزایش نیروی انقباضی عضله ی صاف (۱۴، ۱۳) ثابت شده است. همچنین مهمترین نوع کانال های کلسیمی که وجودشان در عضله ی صاف مثانه ی موش صحرایی به اثبات رسیده است، کانال های نوع L می باشند (۱۵). گزارش شده است موادی که بتوانند انقباض ناشی از کلرورپتاسیم را در عضله ی صاف مهار کنند به عنوان مسدود کننده کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ معرفی می گردند (۱۶).

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره ی برگ مو سبب کاهش وابسته به غلظت در انقباض ناشی از کلرورپتاسیم گردید. بر اساس این نتایج می توان نتیجه گیری نمود که عصاره بخشی از عمل مهاری خود را از طریق انسداد کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ انجام می دهد. نتایج این مرحله با نتایج گزارش شده از اثر مهاری این عصاره بر انقباض ناشی از کلرورپتاسیم بر آئورت (۲) و نای (۳) در موش صحرایی همخوانی دارد. از طرفی نتایج حاصل از تأثیر عصاره ی برگ مو بر عملکرد انقباضی کلرورکلسیم بر بافت دپلاریزه شده با کلرورپتاسیم نیز با کاهش اثر انقباضی کلسیم همراه می باشد. در نمودار ۵ دیده می شود که اضافه کردن کلسیم به صورت تجمعی (حداقل دو غلظت کمتر از نرمال، نرمال و دو غلظت بالاتر از نرمال) در محیط دارای پتاسیم ۱۲۰ mM موجب انقباض عضله گردید که با افزودن کلسیم میزان انقباض نیز افزایش یافته و سپس با اضافه کردن عصاره با غلظت ۲ mg/ml قبل از افزودن کلسیم، انقباضات کاهش یافت که نشان دهنده ی آن است که عصاره توانسته است احتمالاً با انسداد کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ، تا حدودی انقباض ناشی از غلظت های مختلف کلسیم را کاهش دهد.

در مورد استیل کولین باید اشاره نمود این ماده با اتصال به گیرنده های اختصاصی خود بر روی غشای عضله ی صاف، موجب دپلاریزاسیون و در نهایت باز شدن کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ، افزایش IP3 و DAG و در نهایت انقباض عضله می گردد (۱۷). بروز اثر مهاری عصاره بر انقباض مثانه ناشی از استیل کولین نیز می تواند مؤید انسداد این کانال ها به وسیله ی عصاره باشد. علاوه بر آن، به علت برطرف شدن اثر آن با شستشوی بافت، احتمال تأثیر عصاره را بر روندهای درون سلولی و افزایش IP3 کاهش می دهد (۱۸).

از طرف دیگر ممکن است احتمال داده شود که عملکرد عصاره با دخالت گیرنده های کولینرژیک انجام می شود ولی گزارش دیگری نشان می دهد که این عصاره سبب کاهش نیروی انقباضی و ضربان قلب ایزوله قورباغه گردیده ولی آتروپین بر این عملکرد مهاری تأثیری نداشته است (۲). ضمن آن که گزارش شده است که استیل کولین موجب کاهش انقباض ناشی از فنیل افرین در آئورت جدا شده موش صحرایی می گردد و آتروپین این تأثیر مهاری را از بین می برد ولی عملکرد مهاری عصاره بر آئورت منقبض شده تحت تأثیر آتروپین قرار نمی گیرد که باز دلیل دیگری است که عصاره، عملکرد آنتی کولینرژیک ندارد. به عبارت دیگر عملکرد مهاری عصاره بدون دخالت گیرنده های کولینرژیک انجام می شود.

از طرف دیگر عصاره ی برگ مو اثر تحریکی آدرنالین بر قلب پرفیوژ شده ی قورباغه را کاهش داده (۲)، که خاصیت آنتاگونیستی آدرنرژیک در عصاره را پیشنهاد می کند ولی با توجه به اینکه مثانه دارای β2 آدنو رسپتور بوده (۱۹) و آگونیست های β

آدنو رسپتور سبب شلی مثانه می گردند، در حالی که در تجربه حاضر پروپرانولول تأثیری بر عملکرد مهاری عصاره نداشته لذا می توان نتیجه گرفت که β-آدنورسپتورها در عملکرد مهاری عصاره دخالتی نداشته اند که مشابه نتایج بدست آمده در عملکرد عصاره بر شل شدن نای (۳) می باشد.

در تجربه حاضر از تترا اتیل آمونیوم (TEA) جهت بررسی دخالت کانال های پتاسیمی حساس به کلسیم در مثانه استفاده شد (۲۲-۲۰). هر چند بعضی از منابع، این ماده را مسدود کننده ی غیر انتخابی کانال های پتاسیمی معرفی کرده اند (۲۳). تحقیق حاضر نشان داد که درحضور TEA، عصاره ی برگ مو قادر به مهار انقباض ناشی از استیل کولین در عضله ی مثانه نبوده است TEA موجب کاهش معنی دار، در عملکرد مهاری عصاره گردید. این نتیجه با گزارش ارائه شده در مورد تأثیر TEA در کاهش اثر مهاری عصاره ی برگ مو بر آئورت موش صحرایی (۲۴) همخوانی دارد.

علاوه بر آن گزارش شده است که پروسیانیدین های موجود در دانه ی انگور (از انواع دیگر پلی فنل ها) موجب شل شدن آئورت گردیده و احتمال داده شده است که باز شدن کانال های پتاسیمی حساس به تترا اتیل آمونیوم، به وسیله پروسیانیدین ها، مسئول شل شدن آئورت باشد (۲۵). لذا می توان چنین استنباط کرد که در حضور کلسیم، ترکیبات موجود در عصاره ی آبی الکلی برگ مو (احتمالاً پلی فنل ها) با فعال کردن کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم، موجب وقوع هایپرپلاریزاسیون در عضله ی صاف و شل شدن آن می گردند. به نظر می رسد که مسیر اصلی عملکرد مهاری عصاره ی آبی الکلی برگ مو، احتمالاً انسداد کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ بوده و بخش دیگری از عملکرد عصاره، نتیجه ی جلوگیری در آزاد سازی کلسیم از منابع درون سلولی و خروج پتاسیم از طریق فعال کردن کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم می باشد و رسپتورهای β آدنو رسپتور در نحوه عملکرد آن دخالتی ندارند. همچنین پاسخ های سریع مهاری عصاره و حذف تأثیر آن با خارج شدن از حمام بافت و برگشت تحریک پذیری بافت به محرک های استفاده شده نشان می دهد عملکرد عصاره احتمالاً در سطح غشای سلول بوده است.

منابع

1. Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Review of the pharmacological effects of Vitis vinifera (Grape) and its bioactive compounds. Phytother Res. 2009; 23(9): 1197-204.

2. Berti F, Manfredi B, Mantegazza P, Rossoni G. Procyanidins from Vitis vinifera seeds display cardioprotection in an experimental model of ischemia-reperfusion damage. Drugs Exp Clin Res. 2003; 29(5-6): 207-16.

3. Muresan A, Alb C, Suciu S, Clichici S, Filip A, Login C, et al. Studies on antioxidant effects of the red grapes seed extract from Vitis vinifera, Burgund Mare, Recas in pregnant rats. Acta Physiol Hung. 2010; 97(2): 240-6.

4. Orhan N, Aslan M, Orhan DD, Ergun F, Yesilada E. I In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (Vitis vinifera) in diabetic rats. J Ethnopharmacol. 2006; 108(2): 280-6.

5. De Moura RS, Resende AC, Moura AS, Maradei MF. Protective action of a hydroalcoholic extract of a vinifera grape skin on experimental preeclampsia in rats. Hypertens Pregnancy. 2007; 26(1): 89-100.

6. Abu-Ghalyun Y, Masalmeh A, al-Khalil S. Effects of allocryptopine, an alkaloid isolated from Glaucium arabicum on rat isolated ileum and urinary bladder. Gen Pharmacol. 1997; 29(4): 621-3.

7. Oh SJ, Ahn SC. Inhibitory effects of potassium channel blockers on carbachol-induced contraction in rat detrusor muscle. J Korean Med Sci. 2003; 18(5): 701-6.

8. Longhurst PA, Uvelius B. Pharmacological techniques for the in vitro study of the urinary bladder. J Pharmacol Toxicol Methods. 2001; 45(2): 91-108.

9. Andersson A, Sundler F, Ekblad E. Expression and motor effects of secretin in small and large intestine of the rat. Peptides. 2000; 21(11): 1687-94.

10. Chiu CC, Wu JR, Lee CH, Liou SF, Dai ZK, Chen IJ, et al. Anti-hypertension effect of vanylidilol: a phenylaldehyde alpha/beta-adrenoceptor blocker with endothelium-dependent and K+ channels opening-associated vasorelaxant activities. Pharmacology. 2004; 70(3): 140-51.

11. Vinson JA, Mandarano MA, Shuta DL, Bagchi M, Bagchi D. Beneficial effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract and a niacin-bound chromium in a hamster atherosclerosis model. Mol Cell Biochem. 2002; 240(1-2): 99-103.

12. Huddart H, Butler D J. Field stimulation responses of rat urinary bladder detrusor smooth-muscle. Dependence upon slow calcium channel activity determined by K+ depolarization and calcium antagonists. Gen Pharmacol. 1986; 17(6): 695-703.

13. Burgos RA, Aguila MJ, Santiesteban ET, Sanchez NS, Hancke JL. Andrographis paniculata (Ness) induces

relaxation of uterus by blocking voltage operated calcium channels and inhibits Ca(+2) influx. Phytother Res. 2001; 15(3): 235-9.

14. Meier K, Knepel W, Schofl C. Potassium depolarization elevates cytosolic free calcium concentration in rat anterior pituitary cells through 1,4-dihydropyridine-sensitive, omega-conotoxin-insensitive calcium channels. Endocrinology. 1988; 122(6): 2764-70.

15. Bova S, Cavalli M, Cima L, Luciani S, Saponara S, Sgaragli G, et al. Relaxant and Ca2+ channel blocking properties of norbormide on rat non-vascular smooth muscles. Eur J Pharmacol. 2003; 470(3): 185-91.

16. Gilani AH, Aziz N, Khurram IM, Chaudhary KS, Iqbal A. Bronchodilator, spasmolytic and calcium antagonist activities of Nigella sativa seeds (Kalonji): a traditional herbal product with multiple medicinal uses. J Pak Med Assoc. 2001; 51(3): 115-20.

17. Gutierrez M, Garcia de Boto MJ, Cantabrana B, Hidalgo A. Mechanisms involved in the spasmolytic effect of extracts from Sabal serrulata fruit on smooth muscle. Gen Pharmacol. 1996; 27(1): 171-6.

18. Woods M, Carson N, Norton NW, Sheldon JH, Argentieri TM. Efficacy of the β3-adrenergic receptor agonist CL-316243 on experimental bladder hyperreflexia and detrusor instability in the rat. J Urol. 2001; 166(3): 1142-7.

19. Hudman D, Elliott RA, Norman RI. K(ATP) channels mediate the beta(2)-adrenoceptor agonist-induced relaxation of rat detrusor muscle. Eur J Pharmacol. 2000; 397(1): 169-76.

20. Jo S, Lee KH, Song S, Jung YK, Park CS. Identification and functional characterization of cereblon as a binding protein for large-conductance calcium-activated potassium channel in rat brain. J Neurochem. 2005; 94(5): 1212-24.

21. Malysz J, Buckner SA, Daza AV, Milicic I, Perez-Medrano A, Gopalakrishnan M. Functional characterization of large conductance calcium-activated K+ channel openers in bladder and vascular smooth mus cle. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2004; 369(5): 481-9.

22. Brenner R, Jegla TJ, Wickenden A, Liu Y, Aldrich RW. Cloning and functional characterization of novel large conductance calcium-activated potassium channel beta subunits, hKCNMB3 and hKCNMB4. J Biol Chem. 2000; 275(9): 6453-61.

23. Kim SH, Kang KW, Kim KW, Kim ND. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. Life Sci. 2000; 67(2): 121-31.

24. Morton MJ, Hutchinson K, Mathieson PW, Witherden IR, Saleem MA, Hunter M. Human podocytes possess a stretch-sensitive, Ca2+-activated K+ channel: potential implications for the control of glomerular filtration. J Am Soc Nephrol. 2004; 15(12): 2981-7.

25. Lu Y, Zhao WZ, Chang Z, Chen WX, Li L. Procyanidins from grape seeds protect against phorbol ester-induced oxidative cellular and genotoxic damage. Acta Pharmacol Sin. 2004; 25(8): 1083-9.