

اثر عصاره برگ مو بر فعالیت مکانیکی ایلئوم موش صحرایی

دکتر محمد کاظم غریب ناصری^۱، زلیخا نجفی اردکانی^۲، ندا اعتماد^۳

چکیده

مقدمه: تاکنون در مورد خواص دانه انگور (*Vitis Vinifera*) تحقیقات فراوانی انجام شده ولی در باره خواص فارماکولوژی برگ انگور کمتر تحقیق شده است. عصاره آبی الکلی برگ مو انقباض ناشی از کلروپتاسیم و اکسی توسین را در رحم موش صحرایی مهار کرده و نیز سبب شل شدن آنورت می گردد. هدف این تحقیق بررسی اثر عصاره آبی الکلی برگ مو بر انقباضات ناشی از چند محرک شناخته شده در ایلئوم موش صحرایی و تا حدودی روشن نمودن مکانیسم این اثر می باشد.

روش بررسی: عصاره برگ مو با استفاده از الکل ۷۰٪ با روش خیساندن تهیه و حلال آن تبخیر گردید. قطعاتی به طول ۲cm از انتهای ایلئوم موش صحرایی Sprague Dawley در حمام بافت حاوی محلول تایرود قرار داده شد. محلول حمام بافت به طور دایم اکسیژنه می شد. جهت تحریک ایلئوم از کلروپتاسیم، استیل کولین و کلروباریم استفاده شد. انقباضات ایلئوم به روش ایزوتونیک و تحت ۰/۵ گرم کشش اولیه ثبت شد و نتایج به صورت میزان کوتاه شدگی (بر حسب میلی متر) و یا میزان شل شدگی بر حسب درصد محاسبه گردید.

یافته ها: عصاره آبی الکلی برگ مو (۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ mg/ml) بصورت وابسته به غلظت سبب مهار انقباض ناشی از کلروپتاسیم (۶۰mM) می شود ($P < 0/001$). بکاربردن آنتاگونیست آدرنوسپتورها (پروپرانولول ۱μM) مانع بروز این اثر مهاری نگردید. همچنین عصاره (۱mg/ml) انقباض ایلئوم ناشی از استیل کولین (۰/۰۵ و ۰/۵ μg/ml) را کاهش داد (به ترتیب $P < 0/001$ و $P < 0/05$). با این وجود، عصاره (۲mg/ml) تأثیری بر انقباض ناشی از کلروباریم (۴mM) نداشت.

نتیجه گیری: عصاره آبی الکلی برگ مو احتمالاً از طریق مسدود کردن کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ موجب مهار انقباض ایلئوم موش صحرایی شده است. کلروباریم با افزایش رهایش کلسیم از منابع درون سلولی سبب انقباض گردیده و لذا عصاره قادر به مهار انقباض ناشی از آن نبوده است. همچنین نتایج این تحقیق با کاربرد سنتی برگ مو برای معالجه اسهال همخوانی دارد.

واژه های کلیدی: برگ مو، موش صحرایی، ایلئوم، کلروپتاسیم، استیل کولین، کلروباریم

مقدمه

امروزه با مصرف فزاینده داروهای صنعتی، بعضی از بیماران به عوارض جانبی این داروها مبتلا شده ولی در دهه های اخیر، بعد از سالها فراموشی نسبی، مصرف گیاهان دارویی مجدداً مورد توجه جوامع پزشکی و محققین قرار گرفته است.

به طور مثال، بعضی از اجزای گیاهی مانند برگ مو در رژیم غذایی قرار می گیرد ولی به خواص درمانی آن توجه کافی نشده است. انگور یا مو (*Vitis Vinifera*) از تیره Vitaceae گیاهی است که بنا به بعضی از منابع، منشأ انتشار آن در جهان و منطقه آسیای صغیر بوده ولی در حال حاضر تقریباً در تمام مناطق در نیم کره شمالی و جنوبی پرورش داده می شود^(۱). میوه انگور به صورت نارس (غوره)، رسیده و خشک

۱- دانشیار گروه فیزیولوژی

۲- کارشناس مامایی

۳- دانشجوی دکترای داروسازی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی جندی شاپور - اهواز

با ۲۵۰ میلی لیتر الکل ۷۰٪ مخلوط شد و در دمای آزمایشگاه به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شد. سپس محلول عصاره از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد. محلول صاف شده عصاره در مجاورت هوا و در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا حلال آن تبخیر شده و ماده خشک عصاره بدست آید.

ب - حیوانات و آماده سازی بافت: موشهای (Sprague Dowley) نر و ماده با محدوده وزنی ۱۸۵ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دمای اتاق حیوانات ۲۲ تا ۲۶°C و علاوه بر غذای استاندارد جوندگان به موشها سبزیجات تازه نیز داده می شد. موشها ۲۴ ساعت قبل از آزمایش در قفس های ویژه با کف توری (به منظور جلوگیری از عمل مدفوع خواری) از غذا محروم شده ولی دسترسی آزاد به آب داشتند. موشها با زدن ضربه ناگهانی به پشت گردن کشته شدند و بلافاصله با باز کردن شکم و مشخص کردن ایلئوم، قطعاتی به طول ۲cm از انتهای آن جدا گردید و درون آنها با جریان ملایم محلول تایرود اکسیژنه شده شستشو داده شد تا بقایای ترشحات و مواد موجود در آنها خارج شود. یکی از قطعات ایلئوم را درون حمام بافت (۱۰ ml) حاوی محلول تایرود با دمای ۳۷°C و PH برابر ۷/۴ قرار داده و یک طرف ایلئوم به گیره استیل ته حمام بافت و طرف دیگر آن بوسیله قلاب و نخ به بازوی ترانسدیوسر ایزوتونیک (Harvard Universal) متصل گردید. یک وزنه ۰/۵ گرمی متصل به بازوی مقابل ترانسدیوسر، ایلئوم را در حال کشش دایم قرار می داد. انقباضات ایلئوم منتقل شده به ترانسدیوسر پس از تقویت توسط دستگاه ثبات (Harvad Universal Oscillograph) با سرعت ۰/۱ میلی متر در ثانیه به صورت منحنی هایی بر روی کاغذ رسم می شد. با توجه به کالیبراسیون دستگاه، تغییرات طول ایلئوم در شرایط مختلف بصورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ و در مواردی نیز درصد شل شدگی ایلئوم محاسبه و ارایه گردیده اند. ترکیب محلول تایرود (بر حسب mM) شامل مواد زیر بود^(۱۳):

کلرور سدیم (۱۳۶/۹)، کلرورپتاسیم (۲/۶۸)، کلرور کلسیم (۱/۸)، بیکربنات سدیم (۱۱/۹)، کلرور منیزیم (۱/۰۵)، فسفات منوسدیک (۰/۴۲) و گلوکز (۵/۵۵). دوره سازگاری ایلئوم در حمام بافت ۶۰ دقیقه بود که طی آن هر ۱۵ دقیقه محلول حمام

شده (کشمش) استفاده می شود. با این وجود از برگ انگور ندرتاً در بعضی از کشورها از جمله ایران در تهیه غذا (دلمه برگ مو) استفاده می شود. در کتب گیاهان دارویی اشاره شده است که برگ انگور جهت درمان اسهال مفید است^(۲). گزارشهای متعددی در مورد اثرات مفید عصاره دانه انگور در کاهش رادیکالهای آزاد^(۳،۴)، کاهش کلسترول و تری گلیسریدها^(۵)، افزایش قدرت گلبولهای قرمز خون در برابر همولیز ناشی از تابش نور ماورای بنفش ارایه شده است^(۶). با این وجود مصرف دراز مدت این عصاره تا ۹۰ روز اثر سوئی ندارد^(۷). از جمله معود گزارش های ارایه شده در مورد برگ انگور می توان به اثر درمانی آن بر بیماری عدم کفایت مزمن وریدی (Chronic Venous Insufficiency) در انسان اشاره نمود^(۸). همچنین بنا بر یک گزارش، عصاره برگ مو انقباضات رحم موش صحرائی ناشی از محرکهای شناخته شده این اندام مانند کلروپتاسیم و هورمون اکسی توسین را کاهش می دهد و احتمال داده شده که این اثر مهاری از طریق انسداد کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ رخ می دهد^(۹). علاوه بر این، عصاره آبی الکلی برگ مو سبب کاهش انقباض ناشی از فنیل افرین و کلروپتاسیم در آئورت جدا شده موش صحرائی می گردد و پیشنهاد شده است که این اثر مهاری وابسته به اندوتلیوم بوده و با دخالت نیتریک اکساید (NO) انجام می شود^(۱۰). همچنین این عصاره موجب کاهش انقباض در نای^(۱۱) و مجرای دفران^(۱۲) موش صحرائی می گردد. با توجه به عدم انجام تحقیق مدون در مورد اثرات عصاره برگ مو بر حرکات یکی از بخشهای دستگاه گوارش و نیز ضرورت شناسایی خواص گیاهان در کشور و تعیین دقیق کاربرد آنها در درمان بیماریها، هدف پروژه حاضر تعیین اثر عصاره آبی الکلی برگ مو بر فعالیت مکانیکی ایلئوم موش صحرائی می باشد. همچنین سعی گردید تا حد امکان مکانیسم این اثر روشن شود.

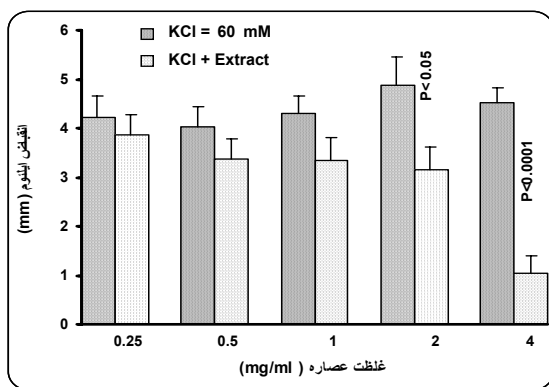
روش بررسی

الف - تهیه عصاره: برگهای جوان مو در ابتدای بهار در شهر اهواز تهیه شد و پس از شستشو و خشک کردن آنها در سایه، بوسیله آسیاب برقی تبدیل به پودر گردید. مقدار ۵۰ گرم پودر تهیه شده

یک طرفه (جهت مقایسه نتایج چند گروه) ارزیابی و مقایسه شدند و مقدار P کوچکتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی دار تلقی گردید.

نتایج

الف - اثر عصاره برگ مو بر انقباض ایلئوم ناشی از کلروپتاسیم: نمودار (۱) نشان می‌دهد که غلظت‌های مختلف عصاره آبی الکلی برگ مو (۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ mg/ml) بصورت وابسته به غلظت سبب کاهش انقباض ناشی از کلروپتاسیم (۶۰mM) در ایلئوم موش صحرایی شده است (n=۱۰). عدم تفاوت معنی‌دار (P>۰/۰۵) انقباضات ایلئوم طی ۵ مرحله کاربرد جداگانه کلروپتاسیم نشان می‌دهد که عضله در مدت اجرای آزمایش دچار خستگی نشده و همچنان قادر به انجام انقباضات مشابه می‌باشد. در نمودار (۲) میزان درصد شل شدگی ایلئوم را پس از به کار بردن غلظت‌های مختلف (۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ mg/ml) عصاره آبی الکلی برگ مو و پس از انقباض بوسیله کلروپتاسیم نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار (۲) مشاهده می‌شود مقایسه آماری (آزمون t-test) بین اثر شل‌کنندگی عصاره در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵mg/ml و نیز ۲ و ۴mg/ml اختلاف معنی‌داری وجود دارد (به ترتیب: P<۰/۰۰۱ و P<۰/۰۵). مقایسه نتایج اثر مهارى غلظت‌های مختلف (با استفاده از آزمون ANOVA) نیز وابسته بودن پاسخ مهارى را به غلظت عصاره نشان می‌دهد (P < ۰/۰۰۰۱).



مقایسه آماری (t-test) اثر مهارى عصاره در غلظت‌های ۲ و ۴mg/ml به ترتیب با P کمتر از ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۱ معنی‌دار می‌باشند (n = ۱۰).

نمودار ۱ - اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی الکلی برگ مو بر انقباض ناشی از کلروپتاسیم در ایلئوم موش صحرایی.

بافت تعویض می‌گردید. جریان دایم جابهای اکسیژن در حمام بافت، ضمن تأمین اکسیژن بافت موجب یکنواخت شدن غلظت مواد اضافه شده به حمام بافت می‌گردید.

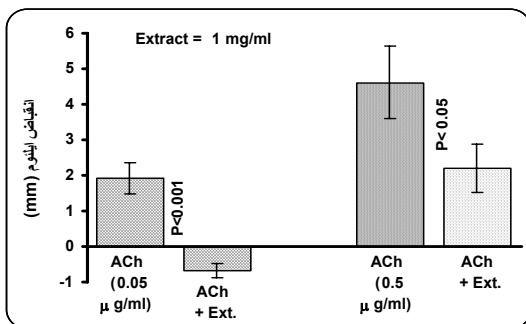
ج - روش کار: در این تجربه از غلظت‌های نهایی ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴mg/ml عصاره و یا یکی از غلظت‌ها استفاده شد. جهت تحریک ایلئوم از غلظت‌های نهایی کلروپتاسیم با غلظت ۶۰mM^(۱۴) و کلروباریم با غلظت ۴mM^(۱۵) و استیل کولین با غلظت ۰/۰۵ و ۰/۵μg/ml^(۱۳) استفاده شد. همچنین جهت بررسی دخالت رستپورهای آدرنژیک، از ماده پروپرانولول با غلظت ۱μM^(۱۶) استفاده شد. مدت اثر عصاره، مواد محرک و پروپرانولول بین ۱ تا ۳ دقیقه و فاصله زمانی بین بکاربردن غلظت‌های مختلف عصاره حداقل ۱۰ دقیقه و یا برگشت تون ایلئوم به حالت اولیه خود بود. پس از هر بار استفاده از عصاره، محلول حمام بافت سه بار تعویض می‌گردید تا بقایای عصاره و سایر مواد از حمام بافت خارج شود. در تمام مدت آزمایش، جریان اکسیژن در حمام بافت برقرار بود. به منظور جلوگیری از تغییر غلظت ترکیب یونی محلول حمام، عصاره و کلیه مواد اضافه شده به حمام بافت در محلول تاپرود حل شده و کلیه غلظت‌های ذکر شده در متن، غلظت نهایی آنها می‌باشد. قبل از بررسی اثر مهارى عصاره، از پایدار بودن اثر انقباضی هر یک از مواد محرک (کلروپتاسیم، استیل کولین و کلروباریم) طی ۳ دقیقه حضور آنها و نیز تکرار پذیر بودن اثر انقباضی اطمینان حاصل می‌شد و در غیر این صورت قطعه ایلئوم تعویض می‌گردید. چنانچه هدف ثبت منحنی غلظت - پاسخ بود، یک دقیقه بعد از حضور ماده محرک و رسیدن پاسخ انقباضی به حالت کفه، عصاره با غلظت مشخص اضافه می‌شد. بعد از اتمام این مرحله، حمام بافت ۳ بار تعویض می‌گردید و حداقل ۱۰ دقیقه به بافت استراحت داده می‌شد تا تون ایلئوم به حالت استراحت باز گردد و مجدداً این مراحل ولی با غلظت بیشتر عصاره تکرار می‌شد.

د - مواد: کلیه نمک‌های استفاده شده از شرکت مرک (آلمان)، پروپرانولول از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شد.

نتایج مراحل مختلف آزمایش با استفاده از آزمون‌های آماری t-test (جهت مقایسه نتایج دو گروه) و ANOVA

نمودار ۳- اثر عصاره آبی الکلی برگ مو (2mg/ml) بر انقباض ناشی از کلروپتاسیم در غیاب و در حضور پروپرانولول در موش صحرائی

ج- اثر عصاره بر انقباض ایلنوم ناشی از استیل کولین: در این مرحله ابتدا، استیل کولین با غلظت نهایی 0/05 و 0/5 $\mu\text{g/ml}$ و به مدت ۳ دقیقه بر ایلنوم اثر داده شد که موجب انقباض آن در تمام مدت حضور استیل کولین گردید. پس از تکرار همین مرحله به منظور مشاهده تکرار پذیر بودن این اثر، در مراحل بعد پس از یک دقیقه حضور استیل کولین عصاره با غلظت نهایی 1 mg/ml به حمام بافت اضافه شد. همانطوری که در نمودار (۴) دیده می شود عصاره نه فقط سبب از بین رفتن انقباض ایلنوم ناشی از استیل کولین (0/05 $\mu\text{g/ml}$) گردیده بلکه موجب شده است که طول ایلنوم از مقدار استراحت آن نیز بیشتر شود. همین مراحل در مورد غلظت 0/5 $\mu\text{g/ml}$ استیل کولین تکرار شد. مقایسه نتایج دو غلظت استیل کولین نشان می دهد که با افزایش غلظت استیل کولین انقباض قویتری در ایلنوم ایجاد شده ولی اثر شل کنندگی عصاره اگر چه کمتر شده ولی همچنان قابل ملاحظه

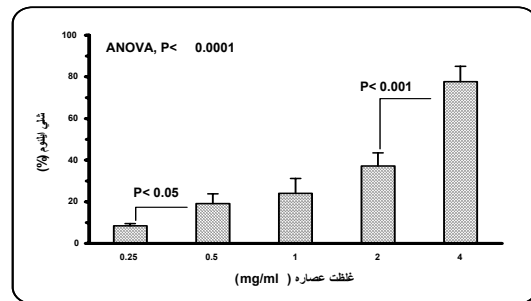


می باشد (به ترتیب: $P < 0.001$ و $P < 0.05$ و $P < 0.05$ و $n=5$).

آزمونهای آماری انجام شده (t-test) وجود اختلاف معنی دار را در هر دو مورد نشان می دهد.

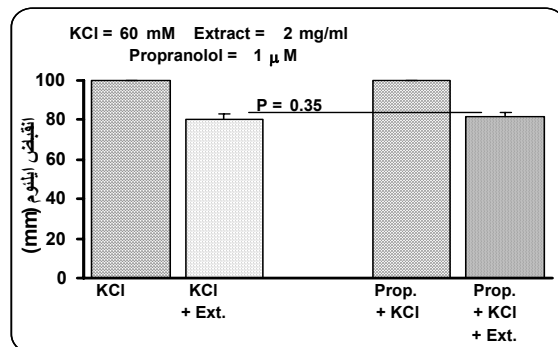
نمودار ۴- عملکرد مهاری عصاره آبی الکلی برگ مو (1mg/ml) بر انقباض ایلنوم موش صحرائی ناشی از دو غلظت مختلف استیل کولین

د- اثر عصاره بر انقباض ایلنوم ناشی از کلرورباریم: در این مرحله کلرورباریم با غلظت 4mM به مدت ۳ دقیقه بر ایلنوم اثر داده شد و با تکرار این مرحله اطمینان حاصل شد که اولاً انقباض ایجاد شده پایدار بوده و ثانیاً اثر مشاهده شده تکرار پذیر می باشد. طی



آزمون t-test اختلاف معنی داری را نشان می دهند. همچنین آزمون آماری آنالیز واریانس وابستگی پاسخ مهاری را به غلظت عصاره نشان می دهد (10). نمودار ۲- درصد شل شدن ایلنوم ناشی از غلظت های مختلف عصاره آبی الکلی برگ مو به دنبال انقباض ایلنوم حاصل از کلروپتاسیم در موش

ب- عملکرد مهاری عصاره بر انقباض ایلنوم ناشی از کلروپتاسیم در حضور پروپرانولول: با توجه به اینکه تحریک آدرنوسپتورها موجب کاهش فعالیت مکانیکی ایلنوم می گردند لذا، در این مرحله سعی گردید با بکار بردن آنتاگونیست این رسپتورها (پروپرانولول) از بروز این اثر احتمالی جلوگیری شود. لذا، ابتدا عملکرد مهاری عصاره (2mg/ml) بر انقباض ناشی از کلروپتاسیم (60mM) به عنوان مرحله شاهد ثبت شد. محلول حمام ۳ بار تعویض گردید و حداقل ۱۰ دقیقه به بافت استراحت داده شد. سپس غلظت نهایی 1 μM از پروپرانولول در حمام بافت ایجاد شد و فرصت داده شد تا اثرات خود را طی ۲ دقیقه نشان دهد و در حضور پروپرانولول، اضافه کردن کلروپتاسیم و عصاره با همان غلظت تکرار شد. نمودار (۳) نشان می دهد که پروپرانولول بر انقباض ناشی از کلروپتاسیم اثری ندارد. همچنین، حضور پروپرانولول تأثیری بر

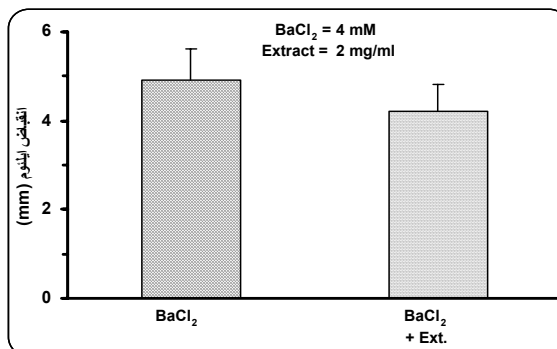


عملکرد مهاری عصاره نداشته است.

مرحله بعدی، پس از یک دقیقه حضور کلروباریم و در حضور آن، عصاره با غلظت ۲mg/ml به حمام اضافه شد.

مطرح شود که در عصاره حاضر ترکیبات محرک این رسپتورها وجود داشته باشد. اما، عدم تأثیر حضور پروپرانولول (آنتاگونیست غیر انتخابی رسپتورهای β) بر شلی ناشی از عصاره، این فرضیه را رد می‌کند. در مورد استیل کولین باید اشاره نمود که این ماده با اتصال به رسپتورهای اختصاصی خود روی غشای سلولهای عضله صاف موجب دیپولاریزه شدن و در نهایت باز شدن کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ و انقباض آن می‌گردد^(۱۶). بروز اثر مهاری عصاره بر انقباض ایلئوم ناشی از استیل کولین نیز می‌تواند مؤید انسداد این کانالها به وسیله عصاره باشد. از طرف دیگر ممکن است احتمال داده شود که عملکرد عصاره با دخالت رسپتورهای کولینرژیک انجام می‌شود. ولی گزارش دیگری نشان می‌دهد که این عصاره سبب کاهش نیروی انقباضی و ضربان قلب ایزوله قورباغه گردیده ولی آتروپین بر این عملکرد مهاری تأثیری نداشته است^(۱۹) و لذا فرضیه دخالت مستقیم رسپتورهای کولینرژیک نیز رد خواهد شد. از طرف دیگر عصاره بر انقباض ایلئوم ناشی از کلروباریم اثر قابل ملاحظه‌ای نداشته است. در مورد نحوه اثر کلروباریم پیشنهاد شده است که این ماده با انسداد کانالهای پتاسیمی سبب جلوگیری از خروج پتاسیم از سلول شده و با دیپولاریزه شده غشاء موجب انقباض می‌گردد ولی کلسیم مورد استفاده در این انقباض از منابع درون سلولی تأمین می‌شود^(۲۱). احتمالاً به همین دلیل در این تجربه، عصاره به خوبی قادر به جلوگیری از انقباض ناشی از کلروباریم نبوده است. از طرف دیگر، یکی از ترکیبات موجود در برگ مو فلاونوئید Quercetin می‌باشد^(۲۲) که موجب شل شدن رحم موش صحرایی میشود^(۲۳). لذا این احتمال وجود دارد که Quercetin موجود در برگ مو عامل اصلی عملکرد مهاری عصاره در تجربه حاضر باشد. با توجه به اینکه بعضی از اسهال‌ها ناشی از افزایش فعالیت سیستم پاراسمپاتیکی و افزایش رهایش استیل کولین از پایانه‌های عصبی این سیستم رخ می‌دهد بنابراین، نتایج تحقیق حاضر نیز مؤید مصرف سنتی برگ این گیاه به عنوان یک ماده ضد اسهال می‌باشد. با توجه به اینکه از برگ مو منحصراً در تهیه یک نوع غذا استفاده می‌گردد، لذا با ادامه این گونه تحقیقات شاید بتوان از اثرات درمانی آن نیز بهتر بهره‌مند گردید.

نمودار (۵) نشان می‌دهد که عصاره موجب شل شدن مختصری در ایلئوم گردیده است ولی این اثر معنی‌دار نمی‌باشد.



نمودار ۵ مقایسه میزان انقباض ایلئوم موش صحرایی ناشی از کلروباریم به تنهایی و نیز تأثیر مهاری عصاره آبی الکلی برگ مو بر انقباض

بحث

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره آبی الکلی برگ مو به صورت وابسته به غلظت سبب کاهش انقباض ایلئوم ناشی از کلروپتاسیم و کاهش انقباض ناشی از استیل کولین گردیده ولی اثر قابل ملاحظه‌ای بر انقباض ناشی از کلروپتاسیم نداشته است. کلروپتاسیم از شناخته‌ترین عوامل انقباضی عضله صاف لوله گوارش است که از طریق دیپولاریزه کردن سلولها سبب باز شدن کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ می‌گردد^(۱۴ و ۱۷). اثر قوی مشاهده شده از عصاره بر انقباض ناشی از کلروپتاسیم می‌تواند مؤید وجود موادی در عصاره باشد که سبب انسداد کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ می‌گردد. زیرا پیشنهاد شده است که موادی که بتوانند انقباض ناشی از کلروپتاسیم را مهار کنند، مسدود کننده کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ هستند^(۱۸). نتایج این مرحله با نتایج مهاری گزارش شده از این عصاره بر انقباض ناشی از کلروپتاسیم بر رحم^(۹)، آئورت^(۱۰)، نای^(۱۱) و مجرای دفران^(۱۲) در موش صحرایی هم‌خوانی دارد. همچنین، اثر قوی همین عصاره بر قلب ایزوله نیز احتمال انسداد کانالهای کلسیمی در تحقیق حاضر را تقویت می‌کند^(۱۹). با توجه به اینکه تحریک آدرنوسپتورها در ایلئوم موجب مهار انقباض می‌گردد^(۲۰)، لذا ممکن است این فرضیه

References

- 1- Bombardelli E, Morazzoni P; *Vitis vinifera*. Fitoterapia. 1995; 66: 291-317.
۲- زرگری علی. گیاهان دارویی. جلد اول. انتشارات دانشگاه تهران. تهران. ۱۳۷۱: ۵۴۴-۵۳۶.
- 3- Bagchi D, Gray 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: 179-189.
- 4- Pataki T, Bak I, Kovacs P, Bagchi D, Das DK, Tosaki A: *Grape seed proanthocyanidins improved cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts*. Am J Clin Nutr. 2002; 75(5): 894-899.
- 5- 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(2): 114-116.
- 6- Carini M, Aldini G, Bombardelli E, Morazzoni P, Maffei Fracino R. *UVB-induced hemolysis of rat erythrocytes: protective effect of procyanidins from grape seeds*. Life Sci. 2000; 67 (15): 1799-1814.
- 7- Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M. *Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds*. Food and Chemical Toxicology. 2002; 40(5): 599-607.
- 8- Kiesewetter H, Koscielny J, Kalus U, Vix J.M, Peil H, Petrini O, van Toor B.S, de Mey C. *Efficacy of orally administered extract of red vine leaf AS 195 (folia vitis viniferae) in chronic venous insufficiency (stage I-II). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Arzneimittelforschung 2000; 50(2):109-117.
۹- غریب ناصری محمد کاظم، احسانی، پروین. اثر عصاره آبی الکلی برگ مو *Vitis vinifera* بر رحم جدا شده موش صحرايي. مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی، جلد هفتم، شماره ۲، ۱۳۸۲: ۱۱۴-۱۰۷.
- 10- غریب ناصری محمد کاظم، نوید حمیدی، مزده حیدری، اثر شل کننده عروقی عصاره برگ مو بر آنورت جدا شده موش صحرايي. فصلنامه گیاهان دارویی، سال سوم، شماره نهم، ۱۳۸۲: ۴-۴۳.
- 11- Gharib Naseri MK, Heidari A. *Relaxatory effect of Vitis vinifera leaf extract on rat isolated trachea*. 2nd International Congress Traditional Medicine and Materia Medica. Tehran, 2004 :156.
- 12- Gharib Naseri MK, Vakilzadeh G. *Rat vas deferens relaxation induced by Vitis vinifera leaf extract*. 2nd International Congress Traditional Medicine and Materia Medica. Tehran, 2004, :155.
- 13- Basle R, Stuttgart H, Hugstetten H. *Experiments on isolated smooth muscle preparations. HSE Biological measuring techniques*. Germany, 1980: 134- 41.
- 14- Madeira SVF, Matos FJA, Leal-Cardoso JH, Criddle DN. *Relaxant effects of the essential oil of Ocimum gratissimum on isolated ileum of the guinea pig*. J Ethnopharmacol. 2002; 81: 1-4.
- 15- Yarim M, Sarac S, Ertan M, Batu OS, Erol K. *Synthesis, structural elucidation and pharmacological properties of some 5-acetyl-3,4-dihydro-6-methyl-4-(substituted phenyl)-2(1H)-pyrimidinones*. Farmac 1999; 54(6): 359-363.
- 16- Gutierrez M, Gracia de Boto M.J, Cantabrana B, Hidalgo A. *Mechanisms involved in the spasmolytic effect of extracts from Sabal serrulata fruit on smooth muscle*. Gen Pharmacol. 1996; 27(1): 171-176.
- 17- Sadraei H, Ghannadi A, Malekshahi K. *Relaxant effect of essential of Melissa officinalis and citral on rat ielum contractions*. Fitoterapia 2003; 74: 445-452.
- 18- Wang GJ, Wu XW, Lin YL, Ren J, Shum AYC, Wu YY, Chen CF. *Ca²⁺ channel blocking effect of iso-S-petasin in rat aortic smooth muscle*

- cells. Eur J Pharmacol.2002;445:239-245.
- 19- غریب ناصری، محمد کاظم. اثر عصاره آبی الکلی برگ مو *Vitis Vinifera* بر قلب پرفیوز شده قورباغه. مجله طبیب شرق، سال پنجم، شماره 4، زمستان 1382: 235-227
- 20- Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A. *Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. New York: McGraw-Hill; 1996:110.
- 21- Smaili SS, Jurkiewicz NH, Gracia AG, Jurkiewicz A. *Comparison of the effect of calcium withdrawal from the medium and of blockage of extracellular calcium entry by isoradipine on the contractile responses of the isolated rat stomach*. Braz J Med Biol Res 1991; 24(9): 953-956.
- 22- 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, Grand noir). Value in chemical control*. Ann Pharm Fr. 1989; 47(4): 229-234.
- 23- Revuelta MP, Hidalgo A, Cantabrana B. *Involvement of cAMP and beta-adrenoceptors in the relaxing effect elicited by flavonoids on rat uterine smooth muscle*. J Auton Pharmacol.1999; 19(6): 353-358.