تأثير خلاصتي نبات الأخيلية *Achillea fragrantissima* الإيثانولية والمائية في التقلص الحاصل في الحلقات الأبهرية المعزولة

إعداد طالب الدكتوراه

وائل الأغواني*

إشراف الأستاذة الدكتورة **ومشاركة الأستاذ الدكتور**

سوسن الماضي** **أنطون اللحام*****

الملخص

خلفية البحث وهدفه: دراسة التأثير الإرخائي لخلاصتي نبات الأخيلية، الإيثانولية والمائية، في الحلقات الأبهرية المعزولة من الأرنب، من خلال تحري تأثيرها في حركة أيونات الكالسيوم ضمن الليف العضلي الأملس التي يزداد تركيزها داخل الليف خلال طور التقلص.

مواد البحث وطرائقه: أولاً: لفحص دور المستقبلات الأدرينيرجية α1، أجري منحنى تركيز - استجابة لتأثير المُقلِص الوعائي الفينيل إيفرين Phenylephrine، ثم أعيد إجراء المنحنى نفسه بعد إضافة تراكيز متدرجة من الخلاصتين السابقتين للأخيلية، وذلك بعد التحقق من مصداقية هذه الطريقة وصلاحيتها بطريقة تجريبية. ثانياً: فحص تأثير الخلاصتين نفسهما في الحلقات التي جرى تقليصها بتركيز عالٍ من أيونات البوتاسيوم (35 ميلي مول). وكانت المقارنة المرجعية لتأثير خلاصتي الأخيلية ببعض الأدوية الموسعة النموذجية: البرازوسين Prazocine والنتروغليسرين Nitroglycerine، والديلتيازيم Diltiazem.

النتائج: أظهرت المعطيات تثبيطاً لتأثير الفينيل ايفرين، ظهر جلياً في إنقاص مقدار الاستجابة العظمى (Emax) له، أحدثته تراكيز متزايدة من الخلاصتين مع رجحان شدة التأثير لصالح الخلاصة الإيثانولية للفينيل إيفرين، وفي حالة الحلقات المتقلصة بتركيز مرتفع من البوتاسيوم، أحدثت الخلاصتان ارتخاءً متبايناً للحلقات. الاستنتاج: تدل المعطيات السابقة على أن الفعل المرخي للخلاصات المدروسة له علاقة أكيدة وتثبيط لدخول الكالسيوم المحدث للتقلص. إلا أنّ هناك حاجة للمتابعة الحثيثة لفحص التأثير المحتمل للخلاصات في مخزونات الكالسيوم الداخلية ولعزل المكونات الفعَالة.

الكلمات المفتاحية Key words: الأخيلية Achillea fragrantissima، الفينيل إيفرين phenylephrine (PE)، المستقبلات الأدرينيرجية α1، البرازوسين، النتروغليسرين والديلتيازيم.

* قسم العلوم الصيدلانية، كلية الصيدلة، الجامعة الدولية الخاصة للعلوم والتكنولوجيا، غباغب، درعا.

** أستاذ- قسم تأثير الأدوية والسموم- كلية الصيدلة- جامعة دمشق.

*** أستاذ- قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلية- كلية الصيدلة - جامعة دمشق.

Effect of Ethanolic and Aqueous Extracts of *Achillea Fragrantissima* on Contraction of Phenylephrine in Isolated Aortic Rings

Wael Al-Aghawani*

Sawsan Al-Madi** **Anton Al-Lahham*****

Abstract

Background & Objective: to investigate the relaxing effect of ethanolic and aqueous extracts of *Achillea fragrantissima* in rabbit aortic rings by investigation their effect on calcium movement through smooth muscle in which intracellular calcium concentrations increase during the phase of contraction.

Material& methods: firstly: to elucidate the role of α_1 adrenoceptors, a phenylephrine (PE) concentration-response curve was constructed in isolated rabbit aortic rings. Afterwards, the curve was repeated in presence of gradual- increased concentration of plant extract. The study was performed after checking the validation of this protocol. Secondly, contraction of rabbit aortic rings were done by high K^+ Krebs solution (35 mM), then the extract was added cumulatively. there was a comparison with standard vasodilators: Prazocin, Nitroglycerine and Diltiazem as references.

Results: The data showed an inhibition of this curve by the extracts with maximum effect for ethanolic one and the inhibition was for the maximum effect (E_{max}) to P.E. Indeed, the extracts have also shown a relaxing effect on aortic rings precontracted by high concentration of K^+ ions.

Conclusion: these data imply that the relaxing effect of the extracts includes an inhibition for calcium – induced contraction. The study should further continued to examine a possible effect of extract on calcium storage inside the cell.

Key words: *Achillea Fragrantissima*, phenylephrine, α_1 adrenoceptors, Nitroglycerine, Prazosin, Diltiazem.

* Department of pharmaceutical science, Faculty of pharmacy, the International University for science and technology (IUST), Jebab, Darra.

** Department of toxicology and pharmacology, faculty of pharmacy, Damascus University.

*** Department of pharmaceutical technology, faculty of pharmacy, Damascus University.

مقدمة:

أثبتت العديد من النباتات الطبية وغير الطبية أنّ لها خاصية واضحة موسعة للأوعية الدموية الرئيسية في الجسم، وهناك تراكم كبير في الأدبيات العلمية للبحوث التي تتمحور حول هذه الصفة المهمة طبياً[1، 2، 3]، إذ بقدر ما تكون هذه الخاصة ذات فائدة معتبرة أيضاً تحتاج إلى التحري المتعدد لكشف مستوى أو آلية التأثير سواء للخلاصات المحضرة من النبات المدروس أو المواد المعزولة منها، فهذا ضروري وبشكل خاص حين التفكير بالاستفادة من هذا التأثير، إذ لا بدَّ من معرفة الطريقة التي تسبب فيها الخلاصات أو المركبات المعزولة منها تأثيرها المرخي لجدار الأوعية الدموية، ولا سيَّما أن هذه الآليات متشعبة ومعقدة [4] وكثيراً ما يلزم إجراء عدة بحوث للمركب الواحد للكشف عن الأوجه المتعددة في تأثيره الوعائي [5، 6].

يحتوي جنس الأخيلية والعائد للفصيلة النباتية المركبة *Asteraceae* على أكثر من 80 نوعاً [7، 8] وهناك العديد منها تنمو في سورية، ويعدُّ نوع *fragrantissima* أكثرها انتشاراً، الشكل 1.

الشكل 1: الأخيلية من نوع *Achillea fragrantissima*.

وجنس الأخيلية عموماً مشهود له بكثير من الميزات الطبية [9، 10]، كما أنه يحوي كثيراً من المكونات الفعّالة، وخاصة تلك المرتبطة بالفعّالية الوعائية [11].

وفي عملية التقلص والارتخاء للأوعية الدموية تتداخل كل من الخلايا البطانية وأيونات الكالسيوم Ca+2 وعوامل إنزيمية أخرى، ويكون المحور النهائي لكل ما سبق الخلايا العضلية الملساء بما يؤدي إلى إرخائها أو تقلصها. ولأيونات الكالسيوم دور أساسي في التقلص في هيولى الخلية العضلية الملساء، إذْ تبدأ العملية بارتفاع تركيز الكالسيوم خارجياً عبر الغشاء البلاسمي، وداخلياً من المختزنات الداخلية للخلية خاصة الشبكة الهيولية الداخلية sarcoplasmic reticulum (SR) [12، 13].

ويؤدي تنبيه المستقبلات الأدرينيرجية α1 الموجودة في جدران الأوعية الدموية إلى تقلص مديد في العضلات الملساء الجدارية [14، 15]، وهذا ما يحدث مثلاً عند تنبيه المستقبلات المذكورة بالفينيل إيفرين phenylephrine، إذ يعقب ذلك تشكل عوامل وسيطة أهمها مركب: Phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate (PI(3,4,5)P3) الذي يحث على دخول أيونات الكالسيوم من قنوات الكالسيوم المعتمدة على الفولتاج: L-type Ca2+ channel [16] . وكذلك مركب phospholipase C (PLC) الذي يؤثر مباشرة في مختزنات الكالسيوم الداخلية في الشبكة الهيولية الداخلية (SR) ويدفعها لتحرير هذه الأيونات بكميات معتبرة وإحداث التقلص [17].

إن هناك أهمية لحركة أيونات الكالسيوم أساسي عبر الليف العضلي الأملس في جدران الأوعية الدموية عند دراسة الأثر الإرخائي أو الموسع الوعائي للمركبات أو الخلاصات النباتية، وما دور مستقبلات α1 إلا مؤازر في هذا العبور للكالسيوم صوب الداخل عند إحداث التقلص. لذا فإنه عند تقييم التأثير الموسع لبعض المواد أو الخلاصات النباتية، تؤخذ عدة آليات بالحسبان، ويعبر عن ذلك بعدة طرائق يمكن أن يتبعها الباحث في الدراسة.

أتى هدف هذا البحث لدراسة تأثير الخلاصتين المائية والكحولية لنبات الأخيلية الموسع للحلقات الأبهرية المعزولة من الأرنب، من خلال تحري التأثير في حركة أيونات الكالسيوم عبر تحديد دور المستقبلات α1 الأدرينيرجية التي تستجيب للفينيل إيفرين بإحداث تقلص مديد، ورصد أي تثبيط قد تبديه الخلاصتان المذكورتان لاستجابة لدور هذه المستقبلات في التقلص [18، 19]. كما جرى بيان تأثير الخلاصتين في التقلص الناجم عن تعرض الحلقات الأبهرية لتركيز مرتفع من أيونات البوتاسيوم الذي يعدُّ أحد المقلصات الوعائية. ثم عمدنا إلى المقارنة المرجعية للخلاصة مع بعض الموسعات الوعائية النموذجية: البرازوسين والنتروغليسرين والديلتيازيم.

طرائق العمل:

مواد العمل: المواد الكيميائية والدوائية: اِسْتُعْمِلَتِ المواد الآتية: الفينيل إيفرين على شكل هيدرو كلورايد Phenylephrine hydrochloride، البرازوسين Prazocin، النتروغليسرين Nitroglycerin (جميعها من تحضير شركة سيجما Sigma).

التجهيزات:

§ الجهاز الأساسي في العمل هو جهاز العمل على أعضاء معزولة IOS (Isolated Organ System) طراز (electronique) Dei lierre/ فرنسا. ويتضمن هذا الجهاز 4 أحواض تجريبية، و4 نواقل، ووحدة تغذية وتكبير 4 مخارج، وراسمة طراز Recorder Company من شركة CP/ أمريكا.

§ حوض حمام مائي مع ترموستات طراز (Polystat Bioblock (86602/ فرنسا.

§ مكبرة مجسمة طراز (PZO 25997) Warszawa مزودة بوحدة تغذية.

§ مجموعة أدوات تشريح مجهرية تشمل ملاقط ومقصات دقيقة.

§ مقياس الحموضة PH-meter طراز (inolab PH/cond inolab (level 1/ المانيا.

§ ميزان حساس طراز Sartorius (0.000) (BC-1201)/ المانيا.

جمع النبات وتعرّفه: جرى أولاً البحث عن الأماكن المحتملة التي توجد فيها الأخيلية، وجُمِعَ العديد من العينات النباتية كاملة التي تحوي الأوراق والأزهار، وقام بتعرّف على النبات بدقة وتمييزه كل من الدكتور عماد القاضي من كلية العلوم والدكتور محمد عودات في قسم الوقاية بهيئة الطاقة الذرية، وذلك اعتماداً على أجزاء النبات المختلفة والقرائن الوصفية. وبعدها جمع النبات بحالة غضة ومن مكان ووقت واحد في أحد أطراف الحقول الجبلية المرتفعة في بلدة بلودان في محافظة ريف دمشق منتصف شهر تموز عام 2010.

تحضير الخلاصات النباتية: عقب جمع النبات فصلت الأوراق مباشرةً وهي الجزء المستعمل وغسلت بتيار من الماء المقطر البارد مدة قصيرة، ثم تركت بعد نشرها على مساحة واسعة في الظلام الدامس وضمن درجة حرارة الغرفة التي كانت جيدة التهوية مدة خمسة عشر يوماً حتى الجفاف التام والتأكد من ذلك بثبات وزن الأوراق خلال ثلاث عمليات وزن متعاقبة، ثم حولت إلى مسحوق ناعم مرر على منخل ذي فتحة 0.16 ملي متر وحفظت في أكياس كتيمة ومعزولة عن الضوء والحرارة والرطوبة إلى حين الاستعمال.

حضرت خلاصات مائية وإيثانولية من مسحوق الأوراق السابق على النحو الآتي:

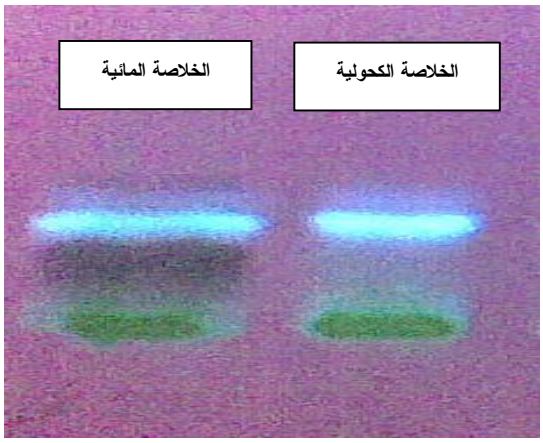
1- تحضير الخلاصة المائية: أخذ 10 غرامات من مسحوق الأوراق المجففة ووضع في عمود تزحيل مناسب. غمر المسحوق الموجود في العمود بمقدار كاف من الماء المقطر وترك مدة أربع وعشرين ساعة بمعزل عن الضوء. بعد ذلك جمعت الخلاصة المائية الزاحلة من العمود حتى انتهاء الاستخلاص واستنفاذ المسحوق. أخذت الخلاصة المائية تحت ضغط منخفض وبدرجة حرارة 55 درجة مئوية بالمبخر الدوار مدة 20 دقيقة، ونقلت البقية

المائية إلى دوارق جهاز التجفيد وأخضعت لعملية التجفيد حتى الحصول على مسحوق جاف تماماً.

2- تحضير الخلاصة الإيثانولية: اِسْتُخْلِصَ 10 غرامات من مسحوق الأوراق المجففة بـــ 100 مل مزيج إيثانول/ ماء (70/ 30) حيث وضع المزيج في عمـــود تزحيـــل مناسب، وجمعت بعد ذلك الخلاصة الزاحلة حتى اســـتنفد المسحوق. بُخِّرَ الإيثانول تحت ضغط منخفض وبدرجـــة حرارة 55 درجة مئوية بالمبخر الدوار مـــدة 20 دقيقـــة، ونقلت البقية المائية إلى دوارق جهاز التجفيد وأخـــضعت لعملية التجفيد حتى الحصول على مسحوق جاف تماماً.

الترحيل على طبقة رقيقة TLC Fingerprint:

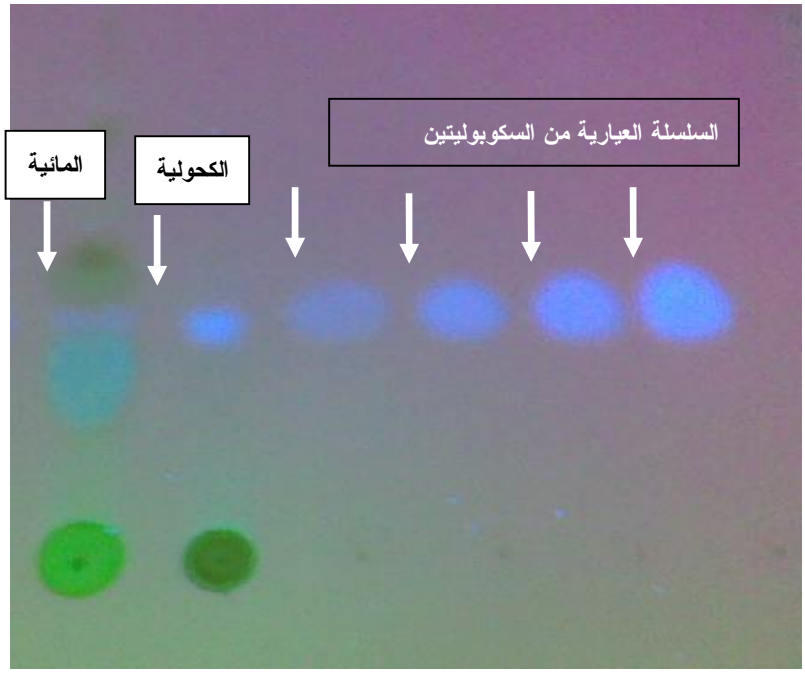
أُجْرِيَتْ عملية التفريق اللوني على طبقة رقيقة TLC للخلاصات المستخدمة، وباستخدام سائل ترحيل مكون من: كلوروفورم/ خلات الإيتيل: 95/ 5، الشكل 2.



الشكل 2: ترحيل خلاصتي الأخيلية على الطبقة الرقيقة

الترحيل على طبقة رقيقة يكشف عن وجود كميات معتبرة من السكوبوليتين في الخلاصات السابقة:

بناء على نتائج الفقرة السابقة، أجري الترحيل على طبقة رقيقة من جديد بهف التحري عن مادة موجودة بكميات معتبرة وهي السكوبوليتين scopoletin، الذي أُحْضِرَتْ على شكل مادة عيارية ورُحِّلَتْ مع الخلاصات وبالمقارنة نجد أنّ هذه المادة موجودة في الخلاصات، الشكل 3.



الشكل 3: ترحيل خلاصتي الأخيلية على طبقة رقيقة كشف عن وجود مادة السكوبوليتين بكميات معتبرة (سائل الترحيل: كلوروفورم 40، تولول 40، خلات الإيتيل 20، حمض الخل 2).

تحضير الحلقات الوعائية من الشريان الأبهر Aortic rings: استخدمت أرانب ذكور بالغة أعمارها متقاربة ومن ذات الفصيلة، ويتراوح وزنها ما بين 2.5- 3 كلغ. ضُحيّ بالحيوانات يوم التجربة بنحر الرقبة، وتم مباشرة عزل وأخذ القسم الصدري النازل من الشريان الأبهر thoracic aorta ونُظف جيداً من الأنسجة الضامة والشحمية المحيطة به، ثم قطع إلى حلقات طول كل منها 1.5 ملم تقريباً.

جرى العمل على جهاز الأعضاء المعزولة I.O.S آنف الذكر الذي يتكون من أربعة حمامات وكل حمام مكون من حجرة داخلية سعتها 20 مل، يوضع بداخلها محلول كريبس Krebs solution ذو التركيب الآتي بالميلي مول [mM]:

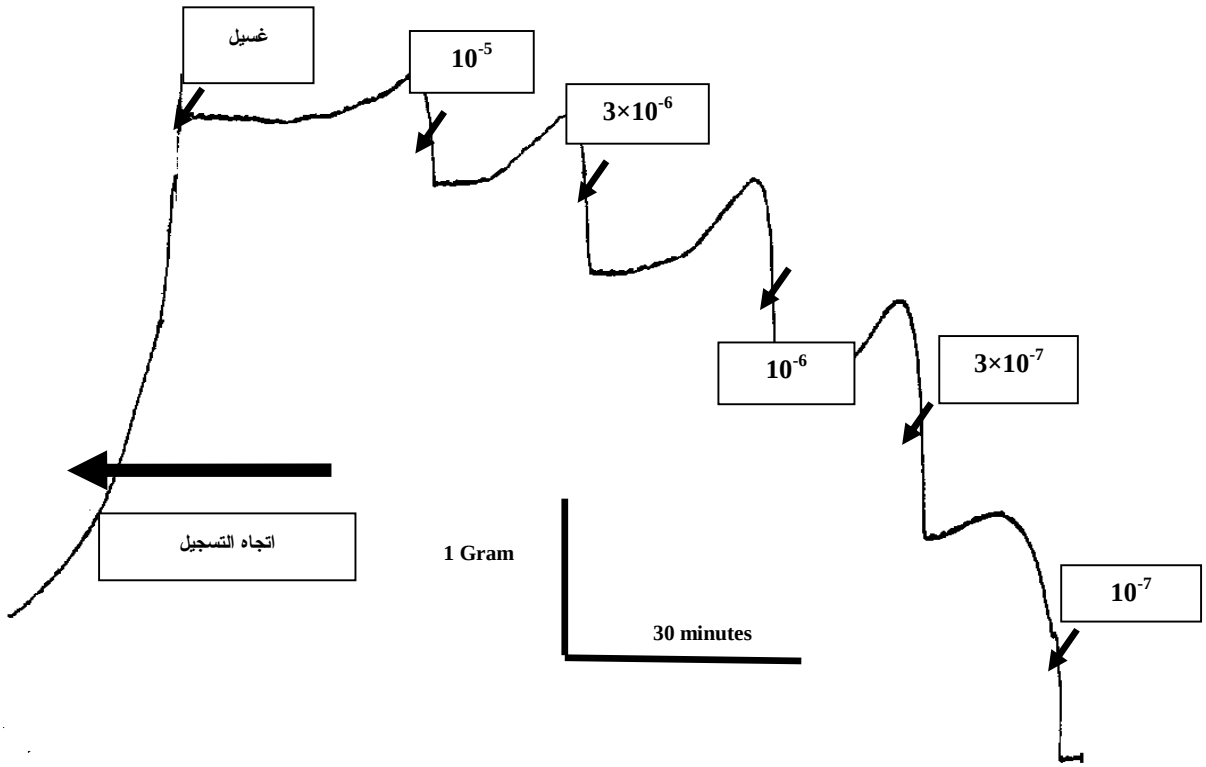
NaCl 119, KCl 4.7, NaHCO3 25, CaCl2 2.5, MgCl2 1, KH2PO4 1.2 and D-Glucose 11.

وضعت كل حلقة وحدها في الحمام مائي بدرجة 37°م ودرجة باهاء PH=7.4، مع ضخ الأكسجين إلى داخل الحمام بشكل مستمر عبر مسرب خاص. علقت الحلقة بين خطافين على شكل حرف L من الستانليس ستيل، الخطاف العلوي يوصل مباشرة إلى ناقل الحركة السابق، أمَّا الخطاف السفلي فهو ثابت لا يتحرك. تُقاسُ الحركة التقلصية وتغيراتها على الراسمة الورقية.

خطوات الدراسة Study protocol:

التهيئة الأولية للحلقات: بعد تعليق الحلقات في الحمام المائي أخضعت إلى قوة شد سلبية Resting tension تعادل 1 غرام، وبعد مرور 30 دقيقة اِخْتُبِرَتْ قابلية الحلقات للتقلص بواسطة الفينيل ايفرين. غسلت بعد ذلك الحلقات بمحلول كريبس حتى العودة إلى مستوى التوتر الأولي، وبقيت بعده مدة توازن تبلغ 90 دقيقة. بعدها أضيف الفينيل ايفرين إلى الحمام المائي بحيث يكون تركيزه 10-6 مول ضمن الحمام المائي، وانْتُظِرَ حتى الحصول على التقلص الأعظم لننتهي بالخطوات اللاحقة. و كانت هذه الخطوة أساسية في مراحل العمل جميعها. عدد الحلقات في كل تجربة 8 حلقات.

إنشاء منحنى جرعة استجابة للفينيل إيفرين والتحقق من مصداقية الطريقة: جرى أولاً إنشاء منحنى استجابة تقلصية للحلقة الأبهرية لتركيز متزايدة ومتراكمة من الفينيل إيفرين وفقاً للتراكيز الآتية: 10-7، 3×10-7، 10-6، 3×10-6 وَ 10-5 مول/ لتر، الشكل 4، إذْ عُدَّتِ الحلقات في هذه الحالة شاهدة إيجابية. أعيدت الخطوات نفسها بعد الغسل والانتظار دون وضع أي خلاصة أو دواء وذلك عدة مرات، وكان القصد الواضح من هذه التجارب التأكد تجريبياً من صلاحية الحلقات الأبهرية والفينيل إيفرين لهذه التجارب من حيث كون الحلقات الأبهرية لا تتغير استجابتها التقلصية مع تكرار إنشاء المنحنى التقلصي السابق؛ بل تبقى محافظة تقريباً على شدة الاستجابة التقلصية نفسها عند التكرار عدة مرات. وقد ثبت من خلال هذه التجارب أنها فعلاً تحافظ على استجابتها متماثلة ولا تتناقص مع التكرار.



الشكل 4: الاستجابة التقلصية المتزايدة للحلقة الأبهرية بفعل حقن تراكيز متدرجة من الفينيل إيفرين (مول/ لتر).

تأثير الخلاصات النباتية في منحنى الفينيل إيفرين: جرى أولاً إنشاء منحنى استجابة تقلصية للحلقة الأبهرية لتركيز متزايدة ومتراكمة من الفينيل إيفرين كما سبق شرحه، ثم غسلت الحلقات نفسها وأضيف إليها الخلاصة النباتية بتراكيز مختلفة: 200، 300، 400 ملغ/ لتر. وأعيد المنحنى السابق بعد مدة حضانة بوجود الخلاصة بلغت 30 دقيقة، إذْ يتبيّن تأثير الخلاصة التثبيطي في حال وجوده في استجابة الحلقات الأبهرية للفينيل إيفرين.

تأثير البرازوسين والنتروغليسرين في منحنى الفينيل إيفرين: جرى إعداد مجموعات أخرى من الحلقات الأبهرية عوملت المعاملة السابقة نفسها، ولكن أعيد المنحنى بوجود الموسعين الوعائيين: البرازوسين والنتروغليسرين وبالمدة نفسها والخطوات المتبعة مع الخلاصات النباتية السابقة.

- إحداث تقلص مديد للحلقات الأبهرية باستعمال تركيز عالٍ من أيونات البوتاسيوم:

أعد محلول كريبس خاص لهذا النوع من التجارب الذي يكون حاوياً على تركيز مرتفع من أيونات البوتاسيوم يبلغ تركيزها 35 ميلي مولاً من أيونات البوتاسيوم الممثلة بكلور البوتاسيوم، وجرى ذلك برفع تركيز كلور البوتاسيوم إلى 35 ميلي مولاً. إن وجود تركيز مرتفع من أيونات البوتاسيوم سيؤدي إلى تقلص مديد للعضلات الملساء الوعائية نتيجة تدفق أيونات الكالسيوم عبر قنواتها إلى داخل الليف العضلي.

بعد وصول هذا التقلص إلى السعة القصوى الثابتة، يبتدئ العمل بالإضافة المتدرجة والتراكمية cumulatively (جرعة إثر جرعة) لمحلول الخلاصة النباتية المفحوصة إلى الحمام المائي المعلقة ضمنه الحلقة الأبهرية، ومن ثم

تُلاحَظُ التغيّرات الحاصلة على منحنى التقلص الأولي للحلقة. جرت الإضافات للخلاصة النباتية بعد إذابة 20 ملغ من المسحوق الجاف للخلاصة في 250 مكرولتراً من سائل كريبس نفسه المستخدم، لتجري بعده الإضافة من هذا المحلول إلى الحمام المائي تدريجياً بواسطة الممص الآلي. أضيف إلى مجموعة الحلقات الشاهدة سائل كريبس فقط بالطريقة نفسها وبالأحجام نفسها المضافة إلى حلقات المعالجة بالخلاصات.

جرى أيضاً إضافة مادة الديلتيازيم (موسع وعائي ومن حاصرات الكالسيوم) إلى مجموعة من الحلقات المقلصة أيضاً بأيونات البوتاسيوم كما سبق أعلاه.

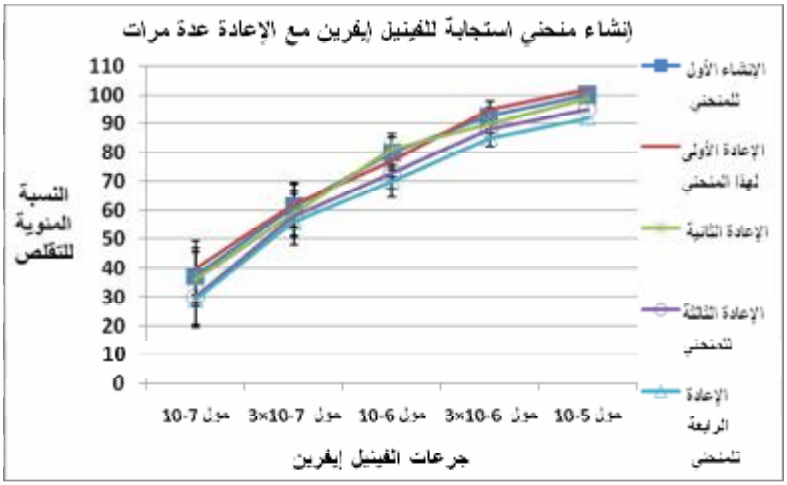
الدراسة الإحصائية: قدمت النتائج على شكل نسب مئوية لتثبيط تقلص الفينيل إيفرين للحلقات بفعل تأثير الخلاصات بجرعاتها المختلفة (الارتخاء)، وكان التعبير عنها على الشكل الآتي:

الوسطي ± الخطأ المعياري للوسطي Mean ± Standard error of mean.

طُبِّقَ اختبار ستيودنت (Student Test) للعينات صغيرة الحجم الخاص بالمجموعات غير المستقلة حين دراسة التغيّرات التي تطرأ على المجموعات نفسها نتيجة إخضاعها للمعالجة اللاحقة (حالة منحنى تقلص الفينيل إيفرين وتغيّراته مع الخلاصات والأدوية). ويعتمد مستوى تقدير الأهمية الإحصائية P لتحديد الفروق المعتد بها وإقرارها بين المجموعات المختلفة عند مستوى مساوٍ أو أقل من 5% ($P \leq 0.05$). ومن أجل تعبير مناسب واضح لقوة الخلاصة النباتية الإرخائية وتغيُّر هذه القوة بتغير الظروف التجريبية المختلفة، حُسِبَتْ جرعة الخلاصة المسببة لـ 50% من الارتخاء (IC50) بطريقة رياضية اعتماداً على الخط البياني والمعادلة اللوغاريتمية التي تربط بين المتغيرين الرئيسين، الجرعة والنسبة المئوية للارتخاء.

النتائج :

- **التحقق من مصداقية الطريقة**: ثبت من خلال النتائج الخاصة بهذه الخطوة أنّ الحلقات الأبهرية تحافظ فعلاً على استجابتها متماثلة ولا تتناقص مع التكرار، الشكل 5.



الشكل 5: تكرار إنشاء منحنى جرعة استجابة للفينيل إيفرين أربع مرات في الحلقات الأبهرية نفسها.

- **تأثير الخلاصة الإيثانولية في منحنى جرعة استجابة للفينيل إيفرين**: جرى تثبيط واضح لهذا المنحنى التقلصي، ودل اختبار ستيودنت للعينات صغيرة الحجم وغير المستقلة أنَ الفارق الجوهري بدأ بعد حضنها بأول جرعة وهي 200 ملغ/ لتر ($P \leq 0.05$)، وكان تثبيط هذا المنحنى يزداد مع زيادة الجرعة المحضونة. الشكل 6، الجدول 1.

الجدول 1: تأثير الخلاصة الإيثانولية للأخيلية في مقدار الاستجابة العظمى Emax للفينيل إيفرين.

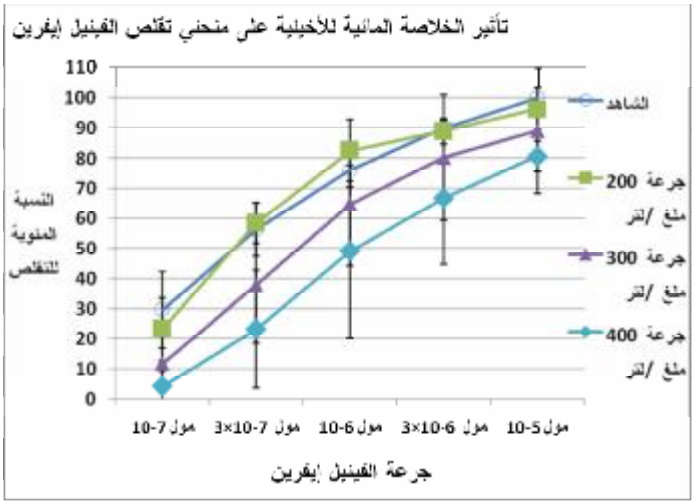
الحلقات الخاضعة للتقلص المتزايد بالفينيل إيفرين	مقدار الاستجابة العظمى Emax للفينيل إيفرين
قبل المعالجة	%100
بعد المعالجة بـــ 200 ملغ/ لتر	%90.8± 4.8
بعد المعالجة بـــ 300 ملغ/ لتر	%88.4± 6.3
بعد المعالجة بـــ 400 ملغ/ لتر	%70.1± 6

الشكل 6: تأثير الخلاصة الإيثانولية للأخيلية في الاستجابة التقلصية المتزايدة للفينيل إيفرين من قبل الحلقات الأبهرية.

تأثير الخلاصة المائية: ابتدأ تثبيط هذه الخلاصة للتأثير التقلصي للجرعات المتراكمة من الفينيل إيفرين، ولكن بدءاً من الجرعة 300 ملغ/ لتر ($P \leq 0.03$)، الشكل 7، الجدول 2.

الجدول 2: تأثير الخلاصة المائية للأخيلية في مقدار الاستجابة العظمى Emax للفينيل إيفرين

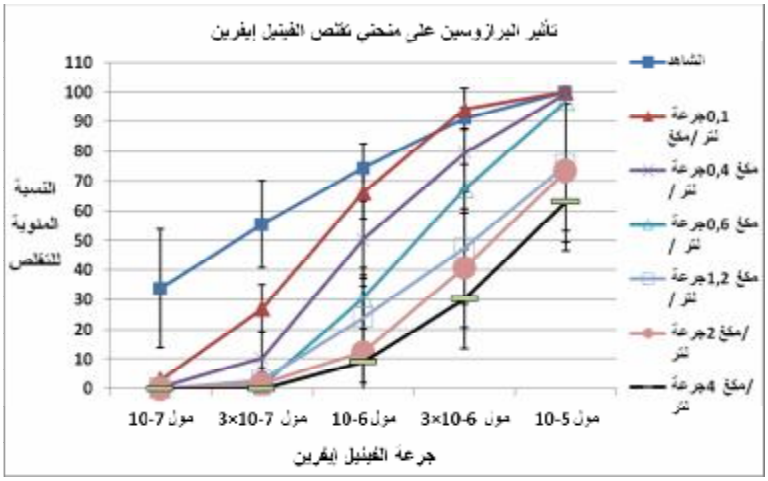
الحلقات الخاضعة للتقلص المتزايد بالفينيل إيفرين	مقدار الاستجابة العظمى Emax للفينيل إيفرين
قبل المعالجة	% 100
بعد المعالجة بـــ 200 ملغ/ لتر	% 96.3± 2.5
بعد المعالجة بـــ 300 ملغ/ لتر	% 89± 7.4
بعد المعالجة بـــ 400 ملغ/ لتر	%80.8± 2



الشكل 7: تأثير الخلاصة المائية للأخيلية في الاستجابة التقلصية للفينيل إيفرين.

تأثير البرازوسين في منحنى الاستجابة التقلصية للفينيل إيفرين:

ثُبِّطَ البرازوسين بطريقة ممتازة معتمدة على الجرعة الاستجابة التقلصية للفينيل إيفرين، وبدأ الفارق الجوهري الإحصائي مع الجرعة 0.6 مكغ/ لتر ($P \leq 0.05$). وذلك متوقع نظراً إلى التضاد في آلية التأثير الدوائي بين المركبين (البرازوسين من حاصرات $\alpha 1$، والفينيل إيفرين منبه قوي لها). الشكل 8 والجدول 3.

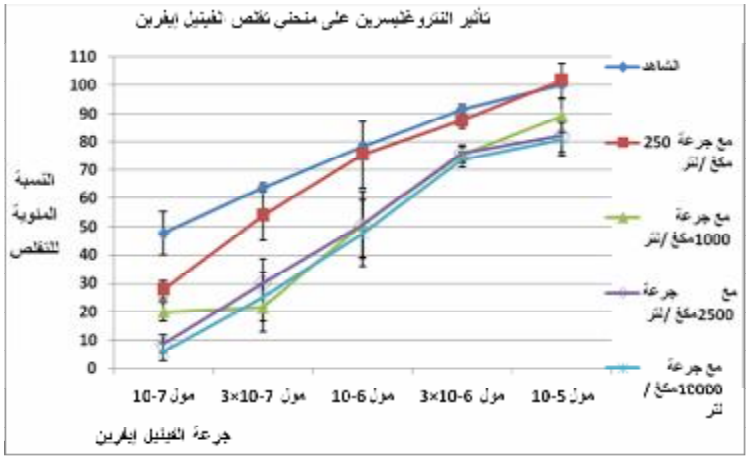


الشكل 8: البرازوسين مثبط قوي لاستجابة الحلقات الأبهرية لمنحنى الفينيل إيفرين.

الجدول 3: تأثير البرازوسين بجرعات مختلفة في مقدار الاستجابة العظمى Emax للفينيل إيفرين.

الحلقات الخاضعة للتقلص المتزايد بالفينيل إيفرين	مقدار الاستجابة العظمى Emax للفينيل إيفرين
قبل المعالجة بالبرازوسين	%100
مع 0,2 مكغ/ لتر	%98.4± 1.6
مع 0,6 مكغ/ لتر	%96.9± 2
مع 1,2 مكغ/ لتر	%75.4± 10.8
مع 2 مكغ/ لتر	%73.3± 11
مع 4 مكغ/ لتر	%63.1± 5.6

- **تأثير النتروغليسرين في منحنى الاستجابة التقلصية للفينيل إيفرين**: كان للنتروغليسرين تثبيط محدود لمنحنى الفينيل إيفرين، رغم الجرعات الكبيرة التي استخدمت، وكان هناك فارق إحصائي مع الحلقات نفسها قبل المعالجة عند الجرعة 2500 مكغ/ لتر ($P \leq 0.05$)، الشكل 9 والجدول 4.



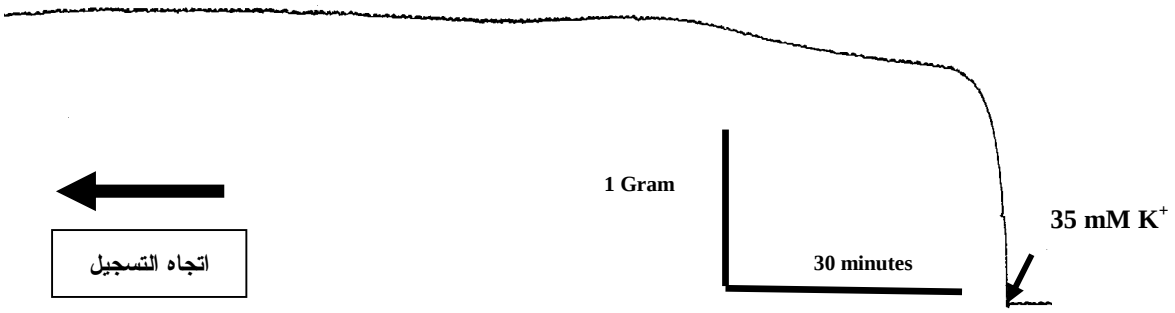
الشكل 9: النتروغليسرين ومنحنى التقلص للفينيل إيفرين.

الجدول 4: تأثير النتروغليسرين بجرعات مختلفة في مقدار الاستجابة العظمى Emax للفينيل إيفرين.

الحلقات الخاضعة للتقلص المتزايد بالفينيل إيفرين	مقدار الاستجابة العظمى Emax للفينيل إيفرين
قبل المعالجة بالنتروغليسرين	100 %
مع 250 مكغ/ لتر	101± 1.8 %
مع 1000 مكغ/ لتر	89.2± 2.5 %
مع 2500 مكغ/ لتر	82.4± 6.8 %
مع 10000 مكغ/ لتر	80.9± 11 %

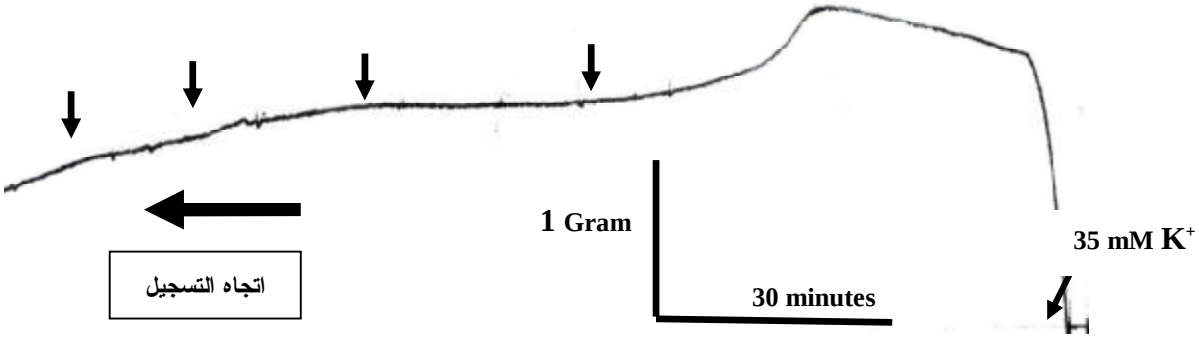
الفعل المرخي لخلاصتي الأخيلية في الحلقات المقلصة بتركيز عالٍ من أيونات البوتاسيوم (35 ميلي مولاً):

أحدث التركيز العالي من أيونات البوتاسيوم في محلول كريبس تقلصاً قوياً وثابتاً ومديداً، الشكل 10، وحين وصول هذا التقلص إلى مداه الأقصى الثابت جرى البدء بإضافة الخلاصة النباتية تدريجياً.

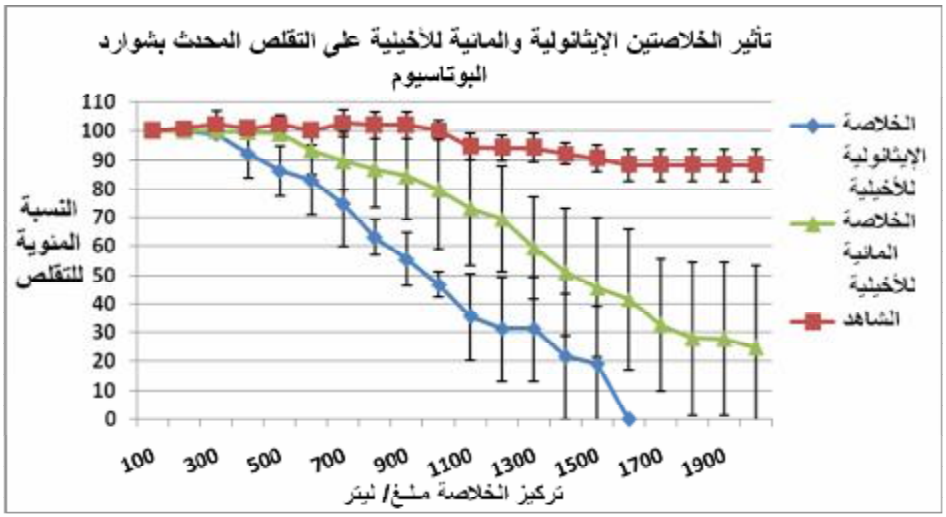


الشكل 10: تقلص الحلقة الأبهرية بفعل تركيز عالٍ من أيونات البوتاسيوم (35 ميلي مول).

تأثير الخلاصة الإيثانولية: أعطت إضافات الخلاصة الإيثانولية تأثيراً مرخياً لهذا للحلقات المتقلصة مقارنة بالحلقات الشاهدة التي سُرِّبَ الحامل المائي لها، وذلك بفارق إحصائي بين ($P \leq 0.05$) (الشكلان 11 وَ 12)، وبدأ الفعل الارتخائي للخلاصة ذو الفارق الإحصائي مع الشاهد عند جرعة 500 ملغ/ لتر يقابله مستوى تقلص يبلغ 5±86,25%، واستمر هذا حتى النهاية المتمثلة بعودة الحلقات لمستوى ما قبل إخضاعها للتقلص المديد بالبوتاسيوم، وبلغت قيمة الـــ IC50 في هذه الحالة 811 ملغ/ لتر.



الشكل 11: تأثير الخلاصة الإيثانولية للأخيلية في الحلقة الأبهرية المقلصة بشوارد البوتاسيوم.

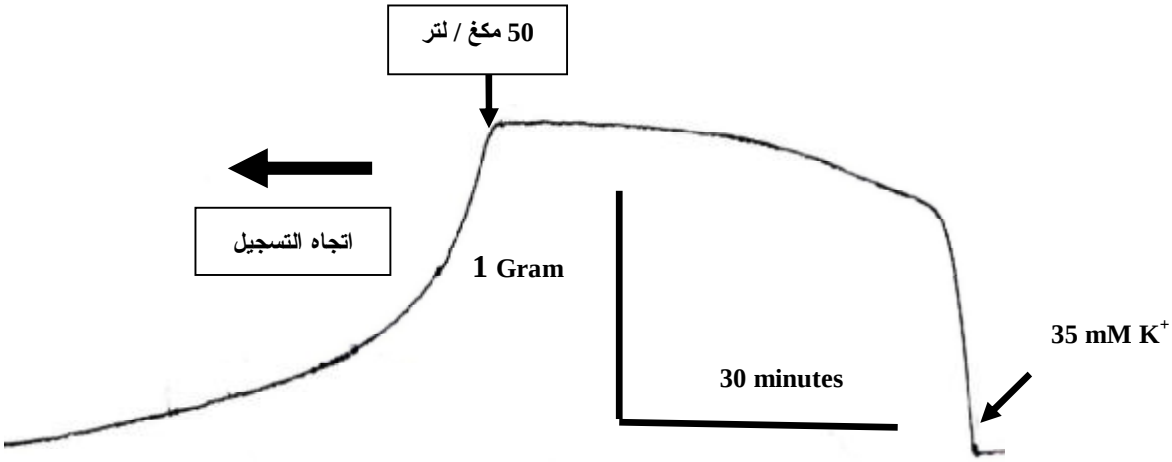


الشكل 12: تأثير كل من الخلاصتين الإيثانولية والمائية في التقلص المحدث بشوارد البوتاسيوم.

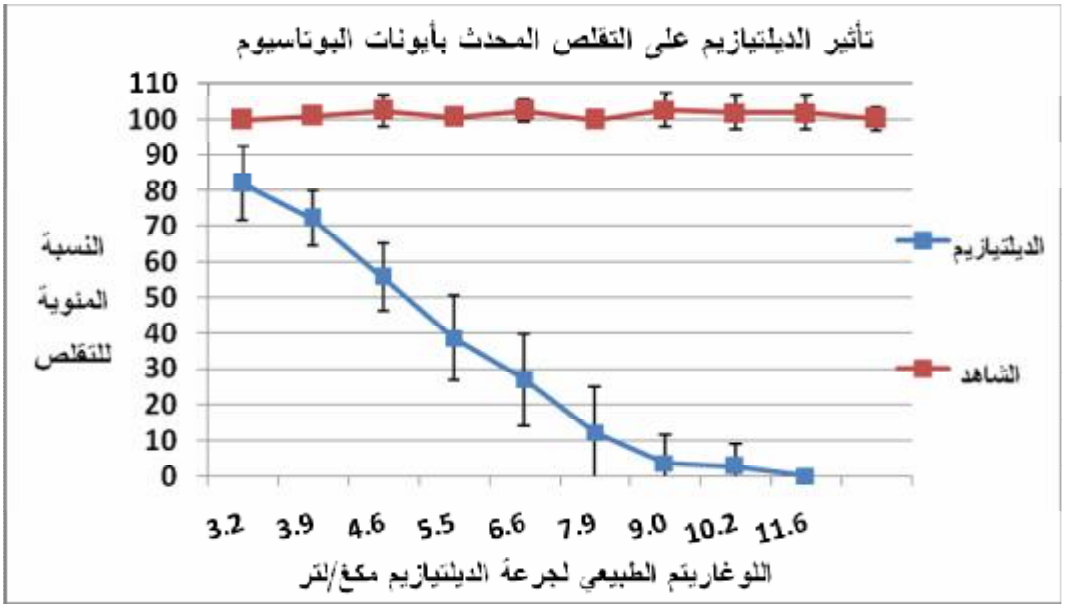
تأثير الخلاصة المائية: سببت الخلاصة المائية للأخيلية ارتخاء للحلقات المقلصة بالبوتاسيوم، لكن فعاليتهـــا الإرخائيـــة كانت أقل من تلك الإيثانولية وبفارق إحصائي كبير ($P \leq 0.05$)، الشكل 12. وبلغت قيمة الـــ IC50 1620 ملغ/ لتر.

تأثير الديلتيازيم في الحلقات المتقلصة بأيونات البوتاسيوم:

كان تأثير الديلتيازيم إرخائياً واضحاً في الحلقات المتقلصة بتركيز مرتفع من أيونات البوتاسيوم، الشكلان 13 وَ 14.



الشكل 13: تأثير الديلتيازيم المرخي لحلقة مقلصة بأيونات البوتاسيوم يظهر سريعاً وبقوة عند حقن جرعة ضئيلة.



الشكل 14: تأثير الديلتيازيم في الحلقات مسبقة التقلص بأيونات البوتاسيوم.

المناقشة:

إن أيونات الكالسيوم المحدثة لعملية حدوث التقلص تأتي من مصدر داخلي ومصدر خارجي. وعن طريق مستقبلات α1 على سطح غشاء الليف العضلي الأملس للأوعية الدموية، تقوم بعض المنبهات النوعية كالفينيل إيفرين Phenylephrine والنورأدرينالين Noradrenaline بالحث على دخول الكالسيوم من الوسط الخارجي إلى داخل الليف العضلي وإحداث تقلص مديد [16، 17]. ومن المعروف عن هذه المنبهات أنها تعمل نتيجة لارتباطها بالمستقبلات المذكورة على تكوين مركب inositol 1, 4, 5- triphosphate (IP3) الذي يرتبط بدوره بمستقبلات نوعية تدعى IP3-receptors في الشبكة الهيولية الداخلية sarcoplasmic reticulum ويلي ذلك إطلاق الكالسيوم المختزن بداخلها وإحداث ما يدعى بالتقلص الطوري phasic contraction. ولذا كانت هذه الحوادث المتسلسلة هدفاً للبحث حين التقصي عن الفعالية الوعائية لبعض

الخلاصات. وقد أكد Huang وزملاؤه أن التثبيط الناجم لبعض الخلاصات أو للمواد المعزولة منها للاستجابة التقلصية للحلقات الأبهرية المعزولة لتراكيز متزايدة من الفينيل إيفرين يدل على وجود تثبيط تنافسي لتأثير الفينيل إيفرين عند المستقبلات α1 [19]، وأيد الفكرة تلك العديد من الباحثين مثل Ramírez وزملائه الذي أكد أهمية تحري الفعالية الوعائية للخلاصات خلال الساعات الخمس الأولى من تعريض الحلقات الوعائية للتقلص الناجم عن المنبهات النوعية وخاصة الفينيل إيفرين، ولكنه عزى تأثير الخلاصة لديه والمثبط لتقلص تراكيز متزايدة من الفينيل إيفرين إلى تثبيط غير تنافسي؛ ربما بسبب احتواء الخلاصات على عديد من المكونات الفعالة[19].

ويأتي توضيح دور المستقبلات الأدرينيرجية عبر إجراء منحنى جرعة استجابة لتراكيز متزايدة من الفينيل إيفرين، وهو منبه نوعي لها، على الحلقات الأبهرية. ورغم تعدد البحوث التي تستخدم هذا الإجراء أو البروتوكول [20]، فقد كان لا بدَّ لنا من التحقق من مصداقية هذه الطريقة، وجرى ذلك بإعادة إجراء هذا المنحنى عدة مرات للحلقات نفسها ودون أية إضافات، فكانت الاستجابات التقلصية في كل مرة ثابتة تقريباً ولم تتغيّر مع الإعادة، وذلك بتكرار بلغ أربع مرات، الشكل 5. وبذلك يمكن الاطمئنان إلى نجاعة هذا البروتوكول في التحري عن أي تأثير تثبيطي محتمل لخلاصة نباتية مدروسة، وذلك حينما يعاد تكرار هذا المنحنى بعد حضنها بتراكيز معينة من هذه الخلاصة.

وقد أظهرت الخلاصتان السابقتان نسباً متفاوتة في تثبيط الاستجابة التقلصية للحلقات الأبهرية للتراكيز المتزايدة للفينيل إيفرين، ولكنها استطاعت تثبيط هذا المنحنى بشكل ملحوظ، الأشكال 5 و6 والجداول 1 و2. وقد يدل التأثير السابق على وجود تثبيط، سواء كان تنافسياً أو غير تنافسي، لتأثير الفينيل إيفرين في المستقبلات α1، وهو الاحتمال الأكثر قبولاً لدى بعضهم في مثل هذه الحالات [20]. ويذهب بعضهم مثل Park وزملائه إلى أن مثل هذا التثبيط هو تأثير بتضاد الفعل الدوائي للفينيل إيفرين عند تحريره للكالسيوم من مختزناته الداخلية [21]، والخلاصات السابقة قد تعاكس التأثير الفيزيولوجي اللاحق لتحرر الكالسيوم، وقد ثبطت كلتا الخلاصتين هذا المنحنى مع تأثير أقوى للخلاصة الإيثانولية، والأمر مرده غالباً للمواد التي تحويها الخلاصتان، وقد بَيَّنَ الترحيل على طبقة رقيقة أن الخلاصة الإيثانولية تحوي تركيزاً يبدو أعلى من تلك المائية من مادة السكوبوليتين scopoletin، وهذا قد يفسر جزئياً الاختلاف في قوة التأثير بين الخلاصتين إلا أنه حتماً لا يجيب عن السؤال بشكل واضح الذي يلزمه مزيد من العمل لعزل المواد جميعها. علماً أن تأثير الخلاصة أياً كانت يعود إلى مجموع ما تحويه من مواد.

ثبط البرازوسين بطريقة ممتازة ومعتمدة على الجرعة الاستجابة التقلصية للفينيل إيفرين، الشكل 8 والجدول 3، وذلك متوقع نظراً إلى التضاد في آلية التأثير الدوائي بين المركبين (البرازوسين من حاصرات α1، والفينيل إيفرين منبه قوي لها). وكان للنتروغليسرين تثبيط معقول لمنحنى الفينيل إيفرين، إلا أنه لم يكن بقوة البرازوسين، الشكل 9 والجدول 4. وتبدو هذه النتيجة منطقية لأنّ طبيعة تأثير النتروغليسرين وآليته لا علاقة لها بمستقبلات α1، بل تعتمد على أكسيد الآزوت (NO).

إنَ مزيدا من الضوء على آلية الفعل المرخي للأخيلية قد يوضحها تأثيرها المرخي في الحلقات التي جرى تقليصها بتركيز عالٍ من أيونات البوتاسيوم (35 ميلي مول). هذا التركيز المرتفع من أيونات البوتاسيوم خارج الغشاء يعني إنقاص التدرج الطبيعي الإلكتروكهربائي للبوتاسيوم من الداخل إلى الخارج ومن ثَمَّ عدم خروج أيونات البوتاسيوم إلى الخارج كما في الحالة الطبيعية؛ مما يتسبب في زوال استقطاب غشاء الخلية Depolarization وتنشيط قنوات الكالسيوم المعتمدة على الكهربية Voltage-gated calcium channels ومن ثَمَّ زيادة تدفق أيونات الكالسيوم إلى داخل ألياف العضلات الملساء وإحداث عملية تقلص مديد [5، 22].

وقد أظهرت الخلاصة الإيثانولية فعلاً ارتخائياً للحلقات المقلصة بالبوتاسيوم مقارنة بالمجموعة الشاهدة (الشكل

12). إذ بدأ الفعل الارتخائي ذو الفارق الإحصائي مع للخلاصة عند جرعة 500 ملغ/ لتر يقابله مستوى تقلص يبلغ 5±86,25%، و استمر هذا حتى النهاية المتمثلة بعودة الحلقات لمستوى ما قبل إخضاعها للتقلص المديد بالبوتاسيوم، وبلغت قيمة الـ IC50 811 ملغ/ لتر. أمَّا المائية فقد احتاجت إلى جرعات أكبر وبلغت قيم الـ IC50 1620 ملغ/ لتر. ومرة أخرى نشاهد قوة إرخائية أكبر للخلاصة الإيثانولية. ومهما يكن، فإنَ هذا التثبيط يدفع للقول: إنَّ هناك مواد في الخلاصة ربما لها دور مباشر في تثبيط دخول أيونات الكالسيوم إلى داخل الليف العضلي عبر قنوات الكالسيوم الموجودة على سطح الليف العضلي.

الاستنتاج: يتعلق جزء كبير من التأثير الموسع العائد لخلاصتي الأخيلية المائية والإيثانولية بتثبيط لتأثير الفينيل إيفرين في مستقبلات α1، وكذلك بإنقاص دخول الكالسيوم في أثناء طور التقلص من الوسط الخارجي عبر قنوات الكالسيوم. وهذا التأثير بحاجة إلى متابعة خاصة فيما يتعلق بالتأثير في مخزونات الكالسيوم الداخلية التي يعتمد عليها الفينيل إيفرين عند بدء العملية التقلصية. ولا شك أن ذلك متلازم مع عزل لبعض المكونات الفعّالة التي تحتويها الخلاصتان السابقتان وتحليلها.

References

1-Toru Ilzuka, Hiroyoshi Moriyama and Masahiro Nagai. Vasorelaxation Effect of Methyl Brevifolincarboxylate from the Leaves of Phyllanthus niruri. Biol. Pharm. Bull, 2006, 29(1): 177-179,.

2- Donald F. Slish , Hiroko Ueda, Rosita Arvigo, Michael J. Balick. Ethnobotany in the search for vasoactive herbal medicines. J of Ethnopharmacology, 1999, 66:159–165.

3- Sriramaneni RN, Omar AZ, Ibrahim SM, Amirin S, Mohd Zaini A. Vasorelaxant effect of diterpenoid lactones from Andrographis paniculata chloroform extract on rat aortic rings. Pharmacognosy Res, 2010;2(4):242-6.

4- Golan D E., Tashjian A H. Principles of Pharmacology: The pathophysiology basis of drug therapy. Lippincott Williams and Wilkins, 2005, Philadelphia.

5- Ivan Yuen Fan Wong, Yu Huang, Zhen-Dan He, Chi-Wai Lau, Zhen –Yu Chen. Relaxing effect of Ligstrum purpurascens extract and purified Acteoside in rat aortic rings. Planta Medica; 2001, 317-321.

6- YunHwanKang andHeungMook Shin. Cinnamomi ramulus Ethanol Extract Exerts Vasorelaxation through Inhibition of Ca2+ Influx and Ca2+ Release inRatAorta. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, Volume 2012, Article ID 513068.

7- Ali M. Al-Gaby and Reda F. Allam. Chemical Analysis, Antimicrobial Activity, and the Essential Oils from Some Wild Herbs in Egypt. J of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 2000: 7 (1): 15-24.

8- Al-Qura'n S. Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak, Jordan. J of Ethnopharmacol; 2009, 4; 123(1):45-50.

9- Sharififar F; Pournourmohammadi S. and Arabnejad M. Immunomodulatory activity of aqueous extract of Achillea wilhelmsii C. Koch in mice. Indian J Exp Biol; 2009, 47(8): 668-71.

10- Al-Mustafa AH. and Al-Thunibat OY. Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. Pak J Biol Sci; 2008, 11(3): 351-8.

11- Ali M. Al-Gaby and Reda F. Allam. Chemical Analysis, Antimicrobial Activity, and the Essential Oils from Some Wild Herbs in Egypt. J of Herbs; 2000, 7(1): 15-24.

12- M. J. Berridge, “Smooth muscle cell calcium activation mechanisms,” J of Physiology, 2008, vol. 586, part 21, pp. 5047– 5061.

13- V. Bito, F. R. Heinzel, L. Biesmans, G. Antoons, and K. R. Sipido, “Crosstalk between L-type Ca2+ channels and the sarcoplasmic reticulum: alterations during cardiac remodelling,” Cardiovascular Res, 2008, vol. 77, no. 2, pp. 315–324,.

14- B. M. Wynne, C. W. Chiao, and R. C. Webb, Vascular smooth muscle cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1, J of the American Society of Hypertension, 2009, vol. 3, no. 2, pp. 84–95.

15- D. R. Varma and X. F. Deng, Cardiovascular α1-adrenoceptor subtypes: functions and signalling. Canadian J of Physiology and Pharmacology, 2000, vol. 78, no. 4, pp. 267–292.

16- C. Le Blanc, C.Mironneau, C. Barbot et al. Regulation of vascular L-type Ca2+ channels by phosphatidylinositol 3,4,5-tris trisphosphate, Circulation Res, 2004, vol. 95, no. 3, pp. 300–307.

17- P. G. Suh, J. I. Park, L. Manzoli et al. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. J of Biochemistry and Molecular Biology, 2008, vol. 41, no. 6, pp. 415–434.

18- Wing-Huang Ko et al. Vasorelaxation and antiproliferation effects of berberine. European J of Pharmacology, 2000, 399:187-196.

19- Ramírez J H et al. Implementation of the technique in isolated organ vascular as tool for the validation of medicinal plants: Study of the vasodilator effect of the S. scutellarioides. Colombia Médica, 2007, Vol. 38 Nº 1.

20- Olmez,E., Ilhan, M. Evaluation of the alpha-adrenoceptor antiagonistic action of berberine in isolated organs. Arzneimittelforschung, 1992, 42:1095-1097.

21- 15- Park K E et al. Inhibitory Effect of Fentanyl on Phenylephrine-Induced Contraction of the Rat Aorta. Yonsei Med J, 2009, 50(3): 414-421.

22- Guedes D.N; Silva D.F; Barbosa-Filho J.M. and Medeiros I.A. Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. Braz J Med Biol Res; 2004, 37(12) 1881-1887.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2011/8/7.

تاريخ قبوله للنشر 2012/2/15.