

اثرات مهاری تیموکینون، ماده موثره سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)، بر انقباضات خودبخودی و برانگیخته ایلئوم خوچه هندی

سیاوش پرورده^{۱*}، محمد فاتحی^۲

۱- استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

۲- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

*آدرس مکاتبه: اهواز، بلوار گلستان، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی،

صندوق پستی: ۱۸۹، تلفن: ۵۰ - ۳۳۶۷۵۴۳ داخلی ۲۳۲۶ (۰۶۱۱)، نمابر: ۳۳۳۲۰۳۶ (۰۶۱۱)

پست الکترونیک: parvardehss@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۵/۱۱/۳

تاریخ دریافت: ۸۴/۸/۳۰

چکیده

مقدمه: به تازگی نشان داده شده که اسانس دانه‌های سیاه‌دانه و ماده شاخص آن، تیموکینون، اثر شل‌کنندگی بر تراشه و ایلئوم دارند. مکانیسم‌های مختلفی از جمله مهار کانال‌های کلسیمی برای اثرات شل‌کنندگی اسانس دانه‌های سیاه‌دانه پیشنهاد شده است. اما در یک بررسی نشان داده شده است که تیموکینون اثرات شل‌کنندگی خود را احتمالاً با مهار گیرنده‌های هیستامینرژیک و سروتونرژیک اعمال می‌کند.

هدف: در این تحقیق، به منظور ارزیابی دقیق‌تر مکانیسم عملکرد تیموکینون بر فعالیت انقباضی عضلات صاف، اثرات فارماکولوژیک آن بر پاسخ‌های انقباضی ایلئوم جدا شده خوچه هندی بررسی گردید.

روش بررسی: از آزمایش‌های ثبت کششی بر روی ایلئوم جدا شده خوچه هندی در حمام بافتی با استفاده از ترانسدوسر ایزومتریک متصل به دستگاه فیزیوگراف استفاده گردید. بدین ترتیب که انقباضات خودبخودی ایلئوم و پاسخ‌های انقباضی برانگیخته توسط استیل‌کولین ($10 \mu\text{M}$)، هیستامین ($100 \mu\text{M}$)، پتاسیم کلراید (10 mM) و تحریک الکتریکی (فرکانس 20 Hz)، مدت زمان 0.2 ms ، شدت 130 V)، قبل و بعد از افزودن تیموکینون ($100 \mu\text{M}$ ، $80 \mu\text{M}$ ، $40 \mu\text{M}$ ، $20 \mu\text{M}$) ثبت گردید. هم‌چنین به منظور ارزیابی نقش کانال‌های کلسیمی در اثرات مهاری تیموکینون، انقباضات ناشی از تحریک الکتریکی، قبل و بعد از افزودن تیموکینون، ابتدا در محیط عاری از کلسیم و سپس در حضور غلظت‌های تجمعی کلسیم کلراید (2 mM ، 1 mM ، 0.4 mM ، 0.2 mM)، ثبت و مقایسه گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که تیموکینون با حداقل غلظت $20 \mu\text{M}$ ، ارتفاع انقباضات خودبخودی ($p < 0.01$) و انقباضات ایجاد شده توسط هیستامین و تحریک الکتریکی ($p < 0.05$)، و با حداقل غلظت $40 \mu\text{M}$ ، ارتفاع انقباضات ناشی از استیل‌کولین ($p < 0.01$) و پتاسیم کلراید ($p < 0.01$) را کاهش داده است. بیشترین اثر مهاری تیموکینون با غلظت $100 \mu\text{M}$ مشاهده شد ($p < 0.01$). علاوه بر این در آزمایش‌های انجام شده در محیط عاری از کلسیم، تیموکینون ($80 \mu\text{M}$) مانع از افزایش ارتفاع پاسخ‌های انقباضی ایلئوم در پاسخ به غلظت‌های افزایشی کلسیم کلراید گردید ($p < 0.01$).

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده از این بررسی نشان می‌دهد که تیموکینون دارای اثرات شل‌کنندگی بر روی انقباضات ایلئوم بوده و می‌تواند مسؤول اثرات شل‌کنندگی مشاهده شده از اسانس دانه‌های سیاه‌دانه باشد. هم‌چنین تیموکینون بخشی از این اثر را از طریق مهار کانال‌های کلسیمی و جلوگیری از ورود کلسیم مورد نیاز برای انقباض عضله صاف اعمال می‌کند.

کلواژگان: تیموکینون، کانال‌های کلسیمی، ایلئوم خوچه هندی، ثبت کششی



مقدمه

سیاه‌دانه^۱ گیاهی است از خانواده^۲ آلانه^۳ که اثرات درمانی متعددی برای آن شناخته شده است [۱]. به عنوان مثال در برخی بررسی‌ها مشخص شده که عصاره و اسانس دانه‌های سیاه‌دانه دارای اثرات شل‌کنندگی بر روی عضلات صاف از جمله عروق خونی [۲،۳،۴،۵]، روده کوچک [۶،۷]، تراشه [۷،۸،۹،۱۰،۱۱] و رحم [۳،۱۲] است. پیشنهاد شده بخشی از این اثرات احتمالاً از طریق مهار کانال‌های کلسیمی اعمال می‌شوند [۲،۶،۷،۸]. اما تاکنون مشخص نشده که آیا تیموکیون^۴ به عنوان فراوان‌ترین ماده مؤثره اسانس دانه‌های سیاه‌دانه [۱۳]، مسؤول ایجاد اثرات مهاری بر کانال‌های کلسیمی و در نتیجه بروز اثرات شل‌کنندگی بر عضلات صاف است یا نه.

تیموکیون مهم‌ترین ماده مؤثره موجود در دانه‌های گیاه سیاه‌دانه بوده و دارای اثرات فارماکولوژیکی متعددی است که از آن جمله می‌توان به اثرات آرامبخشی [۱۴]، ضد ایسکمی [۱۵]، ضد تشنجی [۱۶،۱۷،۱۸]، ضد دردی [۱۹]، ضد التهابی [۲۰]، ضد سرطانی [۲۱،۲۲،۲۳،۲۴]، محافظت کبدی [۲۵،۲۶،۲۷]، محافظت کلیوی [۲۸] و شلی عضلات صاف [۲۹] اشاره کرد.

در تحقیقی که توسط الماجد^۴ و همکاران صورت گرفت، مشخص شد که تیموکیون قادر است انقباضات ایجاد شده توسط کارباکول را در عضله صاف تراشه کوچک هندی مهار کند. هم‌چنین تیموکیون توانست از انقباضات ایجاد شده توسط هیستامین و سروتونین در تراشه و ایلئوم جدا شده کوچک هندی جلوگیری کند. این بررسی‌ها نشان داد که حداقل بخشی از اثرات مهاری تیموکیون بر انقباضات تراشه و ایلئوم، احتمالاً از طریق مهار تولید محصولات ناشی از متابولیسم آراشیدونیک اسید در مسیر لیپواکسیژناز و نیز مهار غیراختصاصی گیرنده‌های هیستامینرژیک و سروتونرژیک صورت می‌گیرد [۲۹]. از آنجا که کلسیم و جریان‌های ورودی آن به درون سلول از طریق کانال‌های کلسیمی، نقش اساسی در

روند انقباضی عضلات صاف دارند، و چون تاکنون پژوهشی به منظور بررسی نقش کانال‌های کلسیمی در ارتباط با اثرات مهاری تیموکیون بر پاسخ‌های انقباضی عضلات صاف صورت نگرفته است، در این تحقیق، ضمن ارزیابی دقیق‌تر اثرات تیموکیون بر فعالیت‌های انقباضی عضلات صاف ایلئوم، به بررسی نقش کانال‌های کلسیمی، به عنوان مهم‌ترین اجزای شرکت کننده در روند انقباضی عضلات صاف، در ارتباط با اثرات تیموکیون پرداخته شد.

ایلئوم کوچک هندی یکی از مهم‌ترین بافت‌های احشایی است که به دلیل وجود شبکه‌های عصبی مختلف مانند سیستم عصبی درون روده، اعصاب کولینرژیک و آدرنرژیک و انواع ناقل‌های عصبی، در بررسی‌های فارماکولوژیک بسیار استفاده می‌شود و یک مدل استاندارد برای بررسی گیرنده‌های کولینرژیک و هیستامینرژیک به حساب می‌آید. هم‌چنین از ایلئوم به منظور بررسی حرکات خودبخودی که مهم‌ترین مکانیسم کنترلی برای عبور غذا در روده است، استفاده می‌شود [۳۰].

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی بافت

در این بررسی کوچک‌های هندی نر به وزن ۵۰۰-۳۰۰ گرم استفاده شدند. حیوانات در ۷ گروه ۴ تایی تقسیم شدند. پس از نخاعی کردن حیوانات، بلافاصله قسمت تحتانی شکم باز شد و بخشی از ایلئوم (کمی بالاتر از سکوم) خارج گردید و در محلول کربس گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) و اکسیژنه (۹۵ درصد اکسیژن - ۵ درصد دی‌اکسید کربن) قرار گرفت. سپس عضله ایلئوم از عروق خونی و بافت‌های همبند اطراف پاک شد و قطعه‌ای به طول ۳ سانتی‌متر از آن جدا گردید. قطعات جدا شده ایلئوم به مدت ۱ ساعت تحت کشش ۱ گرم در داخل محفظه بافتی به حجم ۵۰ میلی‌لیتر حاوی محلول کربس اکسیژنه و گرم قرار گرفت.

^۱ *Nigella sativa* L.^۲ Ranunculaceae^۳ Thymoquinone^۴ Al-Majed

داروها و محلول‌ها

استیل‌کولین^۱، هیستامین^۲ و تیموکینون از شرکت Sigma و سایر مواد شیمیایی جهت تهیه محلول کربس از شرکت Merck تهیه شدند. کلیه داروها در داخل آب مقطر حل شدند. در مورد تیموکینون به منظور انحلال بهتر، از توئین ۸۰ به عنوان کمک حلال استفاده گردید (۰/۸ درصد حجمی/حجمی). کلیه داروها و محلول‌ها به صورت تازه تهیه شدند. حداکثر حجم مورد استفاده از داروها در محفظه بافتی، ۰/۵ میلی‌لیتر بود.

ترکیب شیمیایی محلول کربس برحسب میلی‌مولار (mM) عبارت بود از: NaCl (۱۱۷/۴)، KCl (۴/۷)، MgSO₄ (۱/۴)، KH₂PO₄ (۱/۲)، CaCl₂ (۲/۵)، NaHCO₃ (۲۵) و Glucose (۱۱/۱). در برخی آزمایش‌ها از محلول کربس عاری از کلسیم محلول بدون CaCl₂ استفاده شد.

ثبت انقباضات ایجاد شده در ایلئوم توسط استیل‌کولین، هیستامین و پتاسیم کلراید

سه گروه از حیوانات برای انجام آزمایشات مربوط به ثبت پاسخ‌های انقباضی ایلئوم به استیل‌کولین، هیستامین و پتاسیم کلراید در نظر گرفته شدند. پس از آنکه ایلئوم جدا شده به مدت ۱ ساعت تحت کشش اولیه ۱ گرم در داخل محفظه بافتی حاوی محلول کربس گرم و اکسیژنه قرار گرفت، کار ثبت کششی با استفاده از یک ترانس‌دیوسر ایزومتریک (E. Zimmermann, Eipzig, Berlin) که به دستگاه فیزیوگراف (Oscillograph, 400 MD/2, George Washington Ltd., England) متصل بود آغاز شد. به این ترتیب که تغییرات انقباضی عضله ایلئوم در پاسخ به محرک‌های آگروژن شامل استیل‌کولین (۱۰ μM)، هیستامین (۱۰۰ μM) و پتاسیم کلراید (۱۰ mM) به تنهایی یا در حضور تیموکینون ثبت گردید. غلظت‌های مختلف تیموکینون (۱۰۰ μM، ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰) نیم ساعت قبل از استیل‌کولین، هیستامین و پتاسیم کلراید به محفظه بافتی اضافه شد.

ثبت انقباضات خودبخودی ایلئوم

گروه چهارم حیوانات برای ثبت انقباضات خودبخودی در نظر گرفته شدند. در این گروه، حیوانات از ۲۴ ساعت قبل از آزمایش، از دسترسی به غذا محروم شدند. در روز آزمایش، پس از نخاعی کردن حیوانات و باز کردن شکم، بخش‌هایی از ایلئوم که کاملاً خالی از محتویات بود، جدا شده و به مدت ۱ ساعت تحت کشش اولیه ۱ گرم در داخل محفظه بافتی حاوی محلول کربس گرم و اکسیژنه انکوبه گردید. سپس بدون افزودن آگونیست‌های آگروژن، کار ثبت کششی انقباضات خودبخودی با استفاده از فیزیوگراف آغاز شد. حرکات دودی شکل ایلئوم به صورت انقباضات آهسته نیزه‌ای شکل، به طور مستمر به مدت یک ساعت ثبت گردید. پس از آن، غلظت‌های مختلف تیموکینون (۱۰۰ μM، ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰) به حمام بافتی اضافه شد.

پاسخ انقباضی ایلئوم به تحریک الکتریکی

در گروه پنجم حیوانات، پس از آماده‌سازی بافت در حمام بافتی، تحریک الکتریکی توسط یک الکتروود حلقوی و با استفاده از دستگاه تحریک‌کننده Grass S88 بر روی عضله ایلئوم اعمال شد. این تحریک به صورت تکرار شونده با فرکانس ۲۰ هرتز، مدت زمان ۰/۲ میلی‌ثانیه و شدت ۱۳۰ ولت انجام شد. هر تحریک الکتریکی موجب یک انقباض مشخص و سریع در عضله ایلئوم می‌شود که به صورت یک تکانه عضلانی توسط دستگاه فیزیوگراف ثبت می‌شود. در این آزمایش غلظت‌های مختلف تیموکینون به صورت افزایشی (۱۰۰ μM، ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰) نیم ساعت قبل از تحریک الکتریکی، به محفظه بافتی اضافه شد.

پاسخ انقباضی ایلئوم به تحریک الکتریکی در محیط عاری از کلسیم

در این آزمایش، از محلول کربس عاری از کلسیم استفاده شد که در آن کلسیم کلراید از محلول کربس حذف شده بود. یک ساعت پس از انکوباسیون ایلئوم جدا شده در محلول کربس عاری از کلسیم، تحریک الکتریکی توسط یک الکتروود حلقوی و به صورت تکرار شونده بر روی عضله انجام شد.

¹ Acetylcholine

² Histamine



ترتیب از $2/1 \pm 23/5$ به $0/9 \pm 14/5$ ($p < 0/01$) و از $2/7 \pm 32/1$ به $1/2 \pm 12/3$ میلی نیوتن ($p < 0/001$) در ایلئوم کاهش داد. بیشترین اثر مهارى تیمو کینون در هر سه گروه، با غلظت $100 \mu\text{M}$ دیده شد ($p < 0/001$). این اثر تیمو کینون برگشت پذیر بوده، به گونه ای که پس از 120 دقیقه شست و شو با محلول کربس، پاسخ های انقباضی ایجاد شده توسط استیل کولین، هیستامین و پتاسیم کلراید به ترتیب 56 ، 46 و 25 درصد برگشت پیدا کرد. لازم به ذکر است، به منظور ارزیابی تاثیر احتمالی توئین بر پاسخ های انقباضی، گروه کنترل (کربس نرمال + توئین) با یک گروه کنترل توئین (کربس نرمال بدون توئین) مقایسه گردید که اختلاف معنی داری از نظر آماری مشاهده نشد.

اثر تیمو کینون بر انقباضات خودبخودی ایلئوم خو کچه هندی

در محلول کربس نرمال، انقباضات خودبخودی ایلئوم در کلیه بافت های جدا شده وجود داشت. ولی پس از افزودن تیمو کینون با حداقل غلظت $20 \mu\text{M}$ ، ارتفاع انقباضات خودبخودی ایلئوم خو کچه هندی از $1/7 \pm 25/9$ به $1/1 \pm 15/2$ میلی نیوتن کاهش یافت ($P < 0/01$) (شکل ۴). بیشترین اثر مهارى تیمو کینون با غلظت $100 \mu\text{M}$ مشاهده شد به گونه ای که این غلظت توانست انقباضات خودبخودی ایلئوم خو کچه هندی را از $1/7 \pm 25/9$ به $0/1 \pm 1/3$ میلی نیوتن کاهش دهد. میزان برگشت پذیری اثر تیمو کینون حداکثر 61 درصد بود و پس از 120 دقیقه شست و شو با محلول کربس به دست آمد (شکل شماره ۴).

اثر تیمو کینون بر پاسخ انقباضی ایلئوم به تحریک الکتریکی

اثر غلظت های مختلف تیمو کینون بر پاسخ های انقباضی ایلئوم خو کچه هندی به تحریک الکتریکی، در شکل ۵ نشان داده شده است. انکوباسیون عضله صاف ایلئوم خو کچه هندی با حداقل غلظت $20 \mu\text{M}$ تیمو کینون، توانست پاسخ های انقباضی این بافت به تحریک الکتریکی را از $2/7 \pm 26/1$ به $1/8 \pm 17/3$ میلی نیوتن کاهش دهد ($p < 0/05$). بیشترین اثر

در این آزمایش ابتدا اثرات تقویتی غلظت های تجمعی کلسیم کلراید (2 ، 1 ، $0/4$ ، $0/2$ ، $0/1$) بر روی پاسخ های انقباضی عضله ایلئوم در محیط عاری از کلسیم به عنوان کنترل ثبت شد (گروه ششم). در مرحله بعد، آزمایش در حضور تیمو کینون ($80 \mu\text{M}$) تکرار شد (گروه هفتم). به این ترتیب که تیمو کینون نیم ساعت قبل از افزودن غلظت های تجمعی کلسیم کلراید به داخل حمام بافتی اضافه شد و مجدداً پاسخ های انقباضی عضله ایلئوم به تحریک الکتریکی ثبت گردید و با گروه کنترل (گروه ششم) مقایسه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تغییرات ارتفاع پاسخ های انقباضی (میزان کشش بافت) که توسط فیزیوگراف بر حسب گرم ثبت شده بود، پس از تبدیل به واحد نیرو (نیوتن)، به صورت میانگین \pm انحراف معیار از میانگین^۱ برای چهار حیوان در هر گروه آزمایش ثبت و مقایسه شد. سپس به منظور بررسی وجود اختلاف بین پاسخ های کنترل و هر یک از نمونه های مورد آزمایش در هر گروه، از آزمون آماری Student's t-test استفاده شد (برنامه آماری SPSS). نتایجی که دارای ارزش P کوچکتر از $0/05$ بود، به عنوان نتایج معنی دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

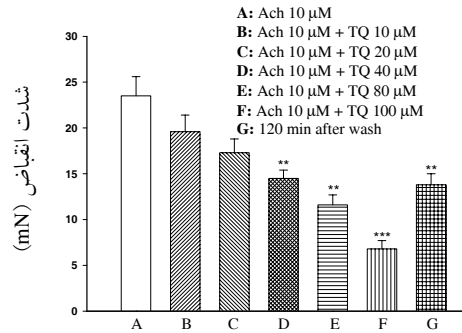
اثر تیمو کینون بر پاسخ های انقباضی ایلئوم به استیل کولین، هیستامین و پتاسیم کلراید

اثر غلظت های مختلف تیمو کینون بر انقباضات ایجاد شده در ایلئوم خو کچه هندی توسط استیل کولین ($10 \mu\text{M}$)، هیستامین ($100 \mu\text{M}$) و پتاسیم کلراید (10 mM) در شکل های شماره ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.

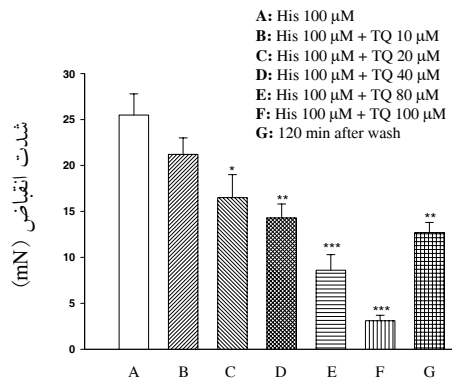
در این آزمایش ها، تیمو کینون با حداقل غلظت $20 \mu\text{M}$ توانست ارتفاع انقباضات برانگیخته توسط هیستامین را از $2/3 \pm 25/5$ به $2/5 \pm 16/5$ میلی نیوتن کاهش دهد ($p < 0/05$). هم چنین تیمو کینون با حداقل غلظت $40 \mu\text{M}$ ارتفاع پاسخ های انقباضی ایجاد شده توسط استیل کولین و پتاسیم کلراید را به

¹ Standard error of mean

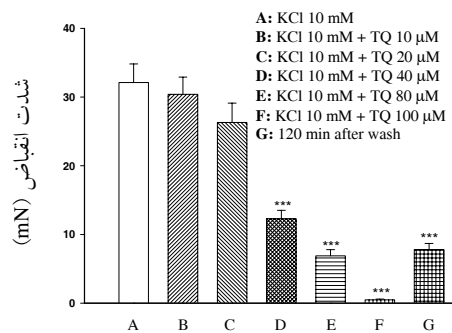




شکل شماره ۱- اثر تیموکینون (TQ) بر پاسخ‌های انقباضی ایجاد شده توسط ۱۰ μM استیل‌کولین (ACh) در ایلئوم جدا شده‌ی خوکچه هندی. تیموکینون نیم ساعت قبل از استیل‌کولین به محفظه بافتی اضافه شد. شدت انقباض ایلئوم بر اساس واحد نیرو، میلی‌نیوتن (mN) بیان شده است. ستون‌ها بیانگر میانگین \pm SEM (انحراف معیار از میانگین) برای ۴ بافت هستند. نتایج آماری، از مقایسه بین گروه کنترل (ACh) و گروه‌های آزمایش (ACh + TQ) در آزمون t- student به دست آمده است ($p < 0.01$ و $p < 0.001$).

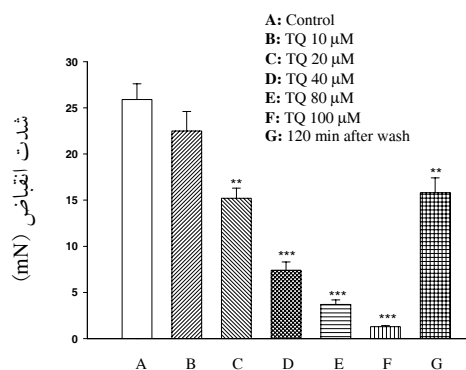


شکل شماره ۲- اثر تیموکینون (TQ) بر پاسخ‌های انقباضی ایجاد شده توسط ۱۰۰ μM هیستامین (His) در ایلئوم جدا شده‌ی خوکچه هندی. تیموکینون نیم ساعت قبل از هیستامین به محفظه بافتی اضافه شد. شدت انقباض ایلئوم بر اساس واحد نیرو، میلی‌نیوتن (mN) بیان شده است. ستون‌ها بیانگر میانگین \pm SEM (انحراف معیار از میانگین) برای ۴ بافت هستند. نتایج آماری، از مقایسه بین گروه کنترل (His) و گروه‌های آزمایش (His + TQ) در آزمون t- student به دست آمده است ($p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$).



شکل شماره ۳- اثر تیموکینون (TQ) بر پاسخ‌های انقباضی ایجاد شده توسط ۱۰ mM پتاسیم کلراید (KCl) در ایلئوم جدا شده‌ی خوکچه هندی. تیموکینون نیم ساعت قبل از پتاسیم کلراید به محفظه بافتی اضافه شد. شدت انقباض ایلئوم بر اساس واحد نیرو، میلی‌نیوتن (mN) بیان شده است. ستون‌ها بیانگر میانگین \pm SEM (انحراف معیار از میانگین) برای ۴ بافت هستند. نتایج آماری، از مقایسه بین گروه کنترل (KCl) و گروه‌های آزمایش (KCl + TQ) در آزمون t- student به دست آمده است ($p < 0.001$).





شکل شماره ۴- اثر غلظت‌های تجمعی تیموکینون (TQ) بر انقباضات خودبخودی ایلئوم جدا شدهٔ خوکچهٔ هندی. ثبت انقباضات خودبخودی ایلئوم، نیم ساعت پس از افزودن هر یک از غلظت‌های تیموکینون به محفظه بافتی انجام شد. در این آزمایش، غلظت‌های مختلف تیموکینون به صورت تجمعی به بافت اضافه شد. شدت انقباض عضلهٔ ایلئوم بر اساس واحد نیرو، میلی‌نیوتن (mN) بیان شده است. هر یک از ستون‌ها بیانگر میانگین \pm SEM (انحراف معیار از میانگین) برای ۴ بافت هستند. نتایج آماری از مقایسه بین گروه کنترل (محلول کربس نرمال) و گروه‌های آزمایش (TQ) در آزمون t-student بدست آمده است ($p < 0.01$ و $p < 0.001$).

انقباضی ایلئوم به تحریک الکتریکی را احیا کند (شکل شماره ۶). تیموکینون با غلظت $80 \mu\text{M}$ از ایجاد انقباض توسط غلظت‌های تجمعی کلسیم کلراید در ایلئوم جلوگیری کرد، به نحوی که ارتفاع پاسخ‌های انقباضی در همان حد صفر باقی ماند.

بحث

در آزمایش‌های انجام شده بر ایلئوم جدا شده خوکچه هندی، مشخص شد که تیموکینون دارای فعالیت مهارى بر انقباضات خودبخودی و برانگیخته توسط استیل‌کولین، هیستامین و پتاسیم کلراید است. استیل‌کولین به عنوان مهم‌ترین ناقل شیمیایی موجود در عضله صاف ایلئوم خوکچه هندی عمدتاً با تأثیر بر گیرنده‌های موسکارینی M_3 موجب انقباض ایلئوم می‌شود [۳۱]. با توجه به اثرات مهارى مشاهده شده از تیموکینون بر پاسخ‌های انقباضی ایلئوم به استیل‌کولین آگروژن، نخستین فرضیه‌ای که مطرح می‌شود، فعالیت آنتاگونیستی تیموکینون برگیرنده‌های M_3 در عضلات صاف ایلئوم است.

از سوی دیگر، آزمایش‌های انجام شده با استفاده از تحریک الکتریکی ایلئوم، نتایج مشابهی دال بر اثرات مهارى تیموکینون بر گیرنده‌های موسکارینی در اختیار ما قرار می‌دهد. زیرا تحریک الکتریکی ایلئوم، موجب آزاد شدن استیل‌کولین از انتهای نورون‌های کولینرژیک و در نتیجه، انقباض ایلئوم

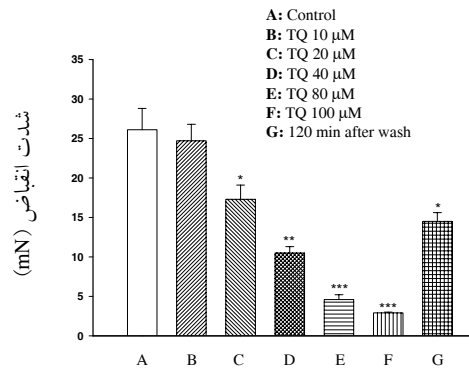
مهارى تیموکینون در غلظت $100 \mu\text{M}$ مشاهده شد، به نحوی که ارتفاع پاسخ‌های انقباضی تا $0.1 \pm 2/9$ میلی‌نیوتن کاهش یافت ($p < 0.001$). میزان برگشت‌پذیری اثر تیموکینون حداکثر ۵۵ درصد بود که پس از ۱۲۰ دقیقه شست و شو با محلول کربس حاصل شد (شکل شماره ۵).

اثر غلظت‌های تجمعی CaCl_2 بر پاسخ‌های انقباضی ایلئوم به تحریک الکتریکی، قبل و بعد از افزودن تیموکینون، در محیط عاری از کلسیم

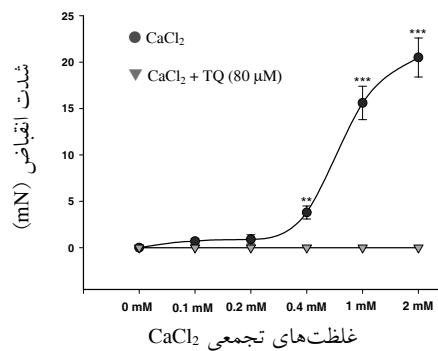
یک ساعت پس از قرار دادن بافت در محلول کربس عاری از کلسیم، میزان پاسخ‌های انقباضی ایلئوم خوکچه هندی به تحریک الکتریکی کاهش یافت و به صفر رسید. در این شرایط و در غیاب تیموکینون، افزودن غلظت‌های تجمعی کلسیم کلراید ($1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 \mu\text{M}$) به داخل محفظهٔ بافتی، ارتفاع پاسخ‌های انقباضی ایلئوم خوکچه هندی به تحریک الکتریکی را به طور وابسته به غلظت افزایش داد. حداکثر پاسخ انقباضی در این آزمایش، با غلظت 2 mM کلسیم کلراید حاصل شد به نحوی که ارتفاع پاسخ‌های انقباضی از صفر به $2/1 \pm 20/5$ میلی‌نیوتن افزایش یافت ($p < 0.001$) (شکل شماره ۶).

اما در محیط عاری از کلسیم و در حضور تیموکینون، افزودن غلظت‌های تجمعی کلسیم کلراید نتوانست پاسخ‌های





شکل شماره ۵ - اثر تیموکینون (TQ) بر پاسخ‌های انقباضی ایجاد شده توسط تحریک الکتریکی در ایلئوم جدا شدهٔ خوکیچهٔ هندی. ثبت پاسخ‌های انقباضی ایلئوم خوکیچهٔ هندی به تحریک الکتریکی، نیم ساعت پس از افزودن هر یک از غلظت‌های تیموکینون به محفظه بافتی انجام شد. در این آزمایش، غلظت‌های مختلف تیموکینون به صورت تجمعی به بافت اضافه شد. شدت انقباض عضلهٔ ایلئوم بر اساس واحد نیرو، میلی‌نیوتن (mN) بیان شده است. ستون‌ها بیانگر میانگین \pm SEM (انحراف معیار از میانگین) برای ۴ بافت هستند. نتایج آماری از مقایسه بین گروه کنترل (محلول کریس نرمال) و گروه‌های آزمایش (TQ) در آزمون t- student به دست آمده است ($p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$).



شکل شماره ۶ - اثر غلظت‌های تجمعی کلراید کلسیم (CaCl₂) بر پاسخ‌های انقباضی ایلئوم جدا شدهٔ خوکیچهٔ هندی به تحریک الکتریکی در محیط عاری از کلسیم، به تنهایی و در حضور تیموکینون (TQ) با غلظت ۸۰ μM. ثبت پاسخ‌های انقباضی ایلئوم به تحریک الکتریکی، نیم ساعت پس از افزودن هر یک از غلظت‌های کلراید کلسیم کلراید و تیموکینون به محفظه بافتی انجام شد. در این آزمایش، غلظت‌های مختلف کلراید کلسیم به صورت تجمعی به بافت اضافه شد. شدت انقباض ایلئوم خوکیچهٔ هندی بر اساس واحد نیرو، میلی‌نیوتن (mN) بیان شده است. هر یک از نقاط، بیانگر میانگین \pm SEM (انحراف معیار از میانگین) برای ۴ بافت هستند. نتایج آماری از مقایسه بین گروه کنترل (دریافت کننده CaCl₂ به تنهایی) و گروه‌های آزمایش (دریافت کننده CaCl₂+TQ) در آزمون t- student به دست آمده است ($p < 0.01$ و $p < 0.001$).

اسانس دانه‌های سیاهدانه، کاملاً مطابقت دارد [۶،۷]. با این حال، اثبات نهایی این فرضیه نیازمند آزمایش‌های دقیق‌تر با استفاده از آگونست و آنتاگونست‌های اختصاصی گیرنده‌های موسکارینی در حضور تیموکینون نشان‌دار است. از سوی دیگر، شواهد به دست آمده از آزمایش‌های انجام شده در محیط عاری از کلسیم، نشان‌دهندهٔ اثرات مهارتی تیموکینون بر کانال‌های کلسیمی است. دلیل این امر آن است

می‌گردد. با مشاهده اثرات مهارتی تیموکینون بر پاسخ‌های انقباضی ناشی از تحریکات الکتریکی در ایلئوم (شکل شماره ۵)، این احتمال مطرح می‌شود که حداقل بخشی از اثرات شل‌کنندگی تیموکینون بر انقباضات ایلئوم، به واسطه مهار گیرنده‌های موسکارینی در عضله صاف ایلئوم صورت می‌گیرد. این نتیجه‌گیری در خصوص تیموکینون، با شواهد به دست آمده از سایر تحقیقات، که نشان‌دهندهٔ اثرات آنتی‌موسکارینی



را مطرح می‌سازد که تیموکینون بر گیرنده‌های هیستامینی H_1 موجود در ایلئوم، اثرات مهارى دارد (شکل شماره ۲). با آن‌که این نتایج با گزارش‌های موجود مبنی بر اثرات مهارى غیراختصاصی تیموکینون بر گیرنده‌های هیستامینی [۲۹] مطابقت دارد، نمی‌توان عملکرد مهارى تیموکینون بر پاسخ‌های انقباضی ایلئوم خوکیچه هندی را به اثرات آنتاگونیستی آن بر گیرنده‌های H_1 نسبت داد. زیرا با فرض پذیرفتن فعالیت مهارى تیموکینون بر گیرنده‌های هیستامینی، باید برای تیموکینون اثرات تشنج‌زایی قائل شد که با اثرات ضد تشنجی مشاهده شده از تیموکینون در سایر پژوهش‌ها [۱۶، ۱۷، ۱۸] مغایرت دارد. لازم به توضیح است ترکیباتی که باعث افزایش هیستامین در CNS می‌شوند (نظیر متوپرین^۱ و I-histidine) همانند خود هیستامین، اثرات ضد تشنجی از خود نشان می‌دهند [۳۴، ۳۵، ۳۶].

گزارش‌های موجود حاکی از آن است که این اثرات به واسطه تحریک گیرنده‌های H_1 در سیستم اعصاب مرکزی صورت می‌گیرد [۳۵]. بنابراین به نظر می‌رسد تیموکینون با مکانیسمی غیر از اثر آنتاگونیستی بر گیرنده‌های هیستامینی، موجب مهار پاسخ‌های انقباضی ایلئوم به هیستامین می‌شود. در همین ارتباط، با توجه به روند مشابه پیام‌رسانی داخل سلولی گیرنده‌های M_3 و H_1 که هر دو از طریق افزایش IP_3 داخل سلولی موجب فعال کردن کانال‌های کلسیمی و افزایش غلظت کلسیم داخل سیتوپلاسمی و در نهایت انقباض عضله صاف می‌شوند، می‌توان مهار کانال‌های کلسیمی را به عنوان مکانیسم مشترک اثرات مهارى تیموکینون بر انقباضات ایلئوم بواسطه عملکرد این دو گیرنده دانست.

در آزمایش‌های انجام شده بر روی انقباضات خودبخودی ایلئوم، شواهد بیشتری در خصوص اثرات مهارى تیموکینون بر کانال‌های کلسیمی به دست آمد. به طور کلی انقباضات ریتمیک لوله گوارشی عمدتاً توسط امواج آهسته غشای عضله صاف تعیین می‌شود. این امواج، تغییرات آهسته نوسان‌دار در پتانسیل استراحت غشاء به شمار می‌روند که در نهایت موجب دیپلاریزاسیون غشای سلول عضله صاف و در نتیجه، انقباضات

که در محیط عاری از کلسیم و در حضور تیموکینون ($80 \mu M$)، افزودن غلظت‌های تجمعی کلسیم کلراید نتوانست پاسخ‌های انقباضی ایلئوم به تحریکات الکتریکی را افزایش دهد (پاسخ‌ها در حد صفر باقی ماندند). از آنجا که انقباض عضله صاف ایلئوم به جریان‌های ورودی کلسیم از طریق کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ (VDCCs)^۱ از نوع L وابسته است، و چون در حضور تیموکینون، افزودن کلسیم کلراید نتوانست انقباضات ایلئوم را احیا کند (شکل شماره ۶)، اثرات مهارى تیموکینون بر کانال‌های کلسیمی در ایلئوم مطرح می‌شود.

علاوه بر این کاهش ارتفاع انقباضات ایجاد شده توسط پتاسیم کلراید در ایلئوم در حضور تیموکینون، دلیل دیگری بر وجود اثرات مهارى تیموکینون بر کانال‌های کلسیمی است، زیرا انقباض عضلات صاف در پاسخ به پتاسیم کلراید ناشی از دیپلاریزاسیون غشای سلول عضله صاف، فعال شدن VDCCs و ورود کلسیم است [۳۲]. بر این اساس اگر ترکیبی قادر به مهار پاسخ‌های انقباضی ناشی از پتاسیم کلراید در عضلات صاف باشد، به احتمال قوی دارای اثرات مهارى بر کانال‌های کلسیمی نیز است [۳۳]. بر این اساس اثرات مهارى تیموکینون بر پاسخ‌های انقباضی ایلئوم، حداقل بخش مهمی از طریق جلوگیری از ورود یون‌های کلسیم به داخل سلول عضله صاف، به واسطه مهار کانال‌های کلسیمی اعمال می‌شود.

نتایج مشابهی در بررسی‌های انجام شده با عصاره و اسانس سیاه‌دانه بر روی عضلات صاف شریان آئورت در خرگوش [۲] و عضلات صاف تراشه خوکیچه هندی و خرگوش [۷، ۸] گزارش شده است. بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیقات، پیشنهاد شده که اثرات شل‌کنندگی اسانس سیاه‌دانه بر روی عضلات صاف، ناشی از فعالیت مهارى آن بر کانال‌های کلسیمی است. در نتیجه به نظر می‌رسد اثرات مهارى اسانس دانه‌های سیاه‌دانه بر کانال‌های کلسیمی، ناشی از وجود تیموکینون به عنوان مهم‌ترین ماده مؤثره موجود در آن است.

هم‌چنین، نتایج به دست آمده از اثرات تیموکینون بر پاسخ‌های انقباضی عضله صاف ایلئوم به هیستامین این احتمال

^۱ Metoprine^۲ Inositol triphosphate^۱ Voltage-dependent calcium channels

از طریق مهار کانال‌های کلسیمی عضلات صاف اعمال می‌کند. هر چند احتمال وجود اثرات مهارتی تیموکینون بر گیرنده‌های موسکارینی M_3 را نیز نباید از نظر دور داشت.

بر این اساس می‌توان تیموکینون را به عنوان یک ترکیب شل‌کننده با منشای گیاهی، به منظور برطرف کردن اسپاسم‌های عضلات صاف گوارشی به خصوص ایلئوم، در کارآزمایی‌های بالینی مطرح نمود. همچنین احتمال وجود اثرات مهارتی تیموکینون بر کانال‌های کلسیمی، اهداف درمانی دیگری را از جمله هیپرتانسیون، آریتمی و آنژین صدری برای تیموکینون به عنوان یک مهار کننده کانال‌های کلسیمی، مطرح می‌سازد.

ریتمیک در عضله صاف ایلئوم می‌شوند که خود به طور عمده وابسته به جریان‌های کلسیمی هستند [۳۷]. با توجه به اثرات مهارتی تیموکینون بر انقباضات خودبخودی عضله صاف ایلئوم، به نظر می‌رسد فعالیت مهارتی تیموکینون بر جریان‌های کلسیمی از طریق VDCCs، مهم‌ترین مکانیسم در این خصوص باشد.

در مجموع نتایج به دست آمده از این آزمایش‌ها نشان می‌دهند که تیموکینون علاوه بر مهار انقباضات خودبخودی ایلئوم، قادر است انقباضات ایجاد شده توسط استیل‌کولین، هیستامین، پتاسیم کلراید و تحریک الکتریکی را در عضله صاف ایلئوم کوچک‌هندی کاهش دهد و این اثرات را عمدتاً

منابع

1. Ali BH and Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother. Res.* 2003; 17: 299-305.
2. Aqel-Mahmoud B. The relaxing effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on vascular smooth muscle. *Dirasat Series B. Pure Appl. Sci.* 1993; 19: 91-100.
3. El-Tahir KEH, Al-Tahir AY, and Ageel AM. Pharmacological studies on sesame and *Nigella sativa* fixed oil: Effects on the sensitivities of the adrenoceptors, baroreceptors, platelets and the uterus of the rat. *Saudi. Pharmac. J.* 1997; 7: 205-215.
4. El-Tahir KEH, Ashour MMS, and Al-Harbi MM. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: Elucidation of the mechanism of action. *Gen. Pharmacol.* 1993; 24: 1123-1131.
5. Zaoui A, Cherrah Y, Lacaille-Dubois MA, Settaf A, Amarouch H, and Hassar M. Diuretic and hypotensive effects of *Nigella sativa* on the spontaneously hypertensive rat. *Therapie* 2000; 55: 379-382.
6. Aqel-Mahmoud B. Effects of *Nigella sativa* seeds on intestinal smooth muscle. *Int. J. Pharmacol.* 1993; 31: 55 - 60.
7. Gilani AH, Aziz N, and Khurram IM. 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: 115-120.
8. Aqel-Mahmoud B. The calcium antagonistic effect of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *Dirasat Series B. Pure Appl. Sci.* 1993; 19: 119-133.
9. Boskabady MH, and Shahabi M. Bronchodilatory and anticholinergic effects of *Nigella sativa* on isolated guinea pig tracheal chains. *Ir. J. Med. Sci.* 1997; 22: 127-133.
10. Boskabady MH and Sheiravi N. Inhibitory effects of *Nigella sativa* on histamine (H_1) receptors of isolated guinea pig tracheal chains. *Pharmac. Biol.* 2002; 40: 596-602.
11. Boskabady MH, Shirmohammadi B, Jandaghi P and Kiani S. Possible mechanism (s) for relaxant effects of aqueous and macerated extracts from *Nigella sativa* on tracheal chains of guinea pig. *BMC Pharmacol.* 2004; 4: 3.
12. Aqel M and Shaheen R. Effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on the uterine smooth



- muscle of rat and guinea pig. *J. Ethnopharmacol.* 1996; 52: 23-26.
- 13.** Filippo D'Antuono L, Moretti A, and Lovato AFS. Seed yield, yield components, oil content and essential oil content and composition of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. *Indust. Crops. Prod.* 2002; 15: 59-69.
- 14.** Parvardeh S and Hosseinzadeh H. Hypnosis and muscular relaxant activity of thymoquinone of *Nigella sativa* seeds and its effect on locomotion and coordination in mice. *Medicinal Plants* 2003; 2, 17-25.
- 15.** Parvardeh S, Nasiri Asl M, Hosseinzadeh H. Protective effects of thymoquinone against ischemia-reperfusion injury in rat brain. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2004; 7: 65-70.
- 16.** Parvardeh S and Hosseinzadeh H. Role of opioid receptors on anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa*, in mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2003; 6: 202-206.
- 17.** Hosseinzadeh H, and Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine* 2004; 11: 56-64.
- 18.** Hosseinzadeh H, Parvardeh S, Nassiri-Asl M, and Mansouri MT. Intra-cerebroventricular administration of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, suppresses epileptic seizures in rats. *Med. Sci. Monit.* 2005; 11, 106-110.
- 19.** Abdel-Fattah AM, Matsumoto K, and Watanabe H. Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone, in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 400: 89-97.
- 20.** Houghton PI, Zarka R, Delas Heras B and Hoult RS. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med.* 1995; 61: 33 - 36.
- 21.** Badary OA. Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 67: 135-142.
- 22.** Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N and Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs* 2004; 15: 389-399.
- 23.** Hassan M and El-Dakhakhny M. Effect of some *Nigella sativa* Constituents on chemical carcinogenesis in hamster cheek pouch. *J. Egypt. Soci. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; 11: 675-677.
- 24.** Worthen DR, Ghosheh OA and Crooks PA. The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of black seed, *Nigella sativa* L. *Anticancer Res.* 1998; 18 (3 A): 1527-1532.
- 25.** Al-Gharably NM, Badary OA, Nagi MN, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Rikabi AC. Protective effect of thymoquinone against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Res. Commun. Pharmacol. Toxicol.* 1997; 2: 41-50.
- 26.** Daba MH and Abdel-Rahman MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 1998; 95: 23-9.
- 27.** Nagi MN, Alam K, Badary OA, al-Shabanah OA, al-Sawaf HA and Al-Bekairi AM. Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1999; 47: 153-159.
- 28.** Badary OA, Nagi MN, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Sohaibani MO and Al-Bekairi AM. Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1997; 75: 1356-1361.
- 29.** Al-Majed AA, Daba MH, Asiri YA, Al-Shabanah OA, Mostafa AA and El-Kashef HA. Thymoquinone-induced relaxation of guinea-pig isolated trachea. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 2001; 110: 333-345.
- 30.** Daniel EE, Kwan CY and Janssen L. Pharmacological techniques for the in vitro study



- of intestinal smooth muscles. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 2000; 45: 141-158.
31. Eglen RM, Reddy H, Watson N and Challis RAJ. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol. Rev.* 1996; 48: 531-565.
32. Bolton TB. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 1979; 59: 606 – 718.
33. Godfraind T, Miller R and Wibo M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol. Rev.* 1986; 38: 321 – 416.
34. Scherkl R, Hashem A and Frey HH. Histamine in brain: its role in regulation of seizure susceptibility. *Epilepsy Res.* 1991; 10: 111-118.
35. Yokoyama H, Onodera K, Iinuma K and Watanabe T. 2-Thiazolyethylamine, a selective histamine H1 agonist, decreases seizure susceptibility in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1994; 47: 503-507.
35. Yokoyama H, Onodera K, Maeyama K, Yanai K, Iinuma K, Tuomisto L and Watanabe T. Histamine levels and clonic convulsions of electrically-induced seizures in mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1992; 346: 40-45.
36. Horowitz B, Ward SM and Sanders KM. Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. *Annu. Rev. Physiol.* 1999; 61: 19-43.

