

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

برانگیخته ایلئوم خوکچه هندی

سیاوش پروردۀ^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: ۰۶۱۱۳۳۳۷۵۴۳ - ۲۳۲۶، داخلی ۰۶۱۱۳۳۳۲۰۳۶

پست الکترونیک: parvardehss@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۵/۱۱/۳

تاریخ دریافت: ۸۴/۸/۳۰

چکیده

مقدمه: به تازگی نشان داده شده که انسانس دانه‌های سیاهدانه و ماده شاخص آن، تیموکینون، اثر شلکنندگی بر تراشه و ایلئوم دارند. مکانیسم‌های مختلفی از جمله مهار کانال‌های کلسیمی برای اثرات شلکنندگی انسانس دانه‌های سیاهدانه پیشنهاد شده است. اما در یک بررسی نشان داده شده است که تیموکینون اثرات شلکنندگی خود را احتمالاً با مهار گیرنده‌های هیستامینزیک و سروتونرزیک 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 خوکچه هندی بررسی گردید.

روش بررسی: از آزمایش‌های ثبت کششی بر روی ایلئوم جدا شده خوکچه هندی در حمام بافتی با استفاده از ترانسdiyosr ایزومنتریک متصل به دستگاه فیزیوگراف استفاده گردید. بدین ترتیب که انقباضات خودبخودی ایلئوم و پاسخ‌های انقباضی برانگیخته توسط استیل کولین ($10 \mu\text{M}$)، هیستامین ($10 \mu\text{M}$)، پتاسیم کلراید (10 mM) و تحریک الکتریکی (فرکانس 20 Hz ، مدت زمان 0.2 ms ، شدت 130V ، قبل و بعد از افزودن تیموکینون ($100 \mu\text{M}$ ، 40 ، 20 ، 10) 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 ، 0.4 ، 0.1 ، 0.05 ، 0.01 ، 0.001 ، 0.0001)، ثبت و مقایسه گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که تیموکینون با حداقل غلظت $10 \mu\text{M}$ ، 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 استیل کولین ($p < 0.01$) و پتاسیم کلراید ($p < 0.001$) را کاهش داده است. بیشترین اثر مهاری تیموکینون با غلظت $100 \mu\text{M}$ مشاهده شد ($p < 0.001$). 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 ($p < 0.001$).

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 انسانس 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.

گل واژگان: تیموکینون، کانال‌های کلسیمی، ایلئوم خوکچه هندی، ثبت کششی



مقدمه

روند انقباضی عضلات صاف دارند، و چون تاکنون پژوهشی به منظور بررسی نقش کانال‌های کلسیمی در ارتباط با اثرات مهاری تیموکینون بر پاسخ‌های انقباضی عضلات صاف صورت نگرفته است، در این تحقیق، ضمن ارزیابی دقیق‌تر اثرات تیموکینون 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 تیموکینون پرداخته شد.

ایلئوم خوکچه 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 خوکچه‌های هندی نر به وزن ۵۰۰-۳۰۰ گرم استفاده شدند. حیوانات در ۷ گروه ۴ تایی تقسیم شدند. پس از نخاعی کردن حیوانات، بلافصله 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 دی اکسید 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.

سیاهدانه^۱ گیاهی است از خانواده آلله^۲ 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 [۸،۹،۱۰] و رحم [۱۱،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 تیموکینون^۳ 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.

تیموکینون مهم‌ترین ماده موثره 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 تیموکینون قادر است انقباضات ایجاد شده توسط کارباکول را در عضله صاف تراشه خوکچه هندی گیرنده شده. همچنین تیموکینون توانست از انقباضات ایجاد شده توسط هیستامین و سروتونین در تراشه و ایلئوم جدا شده خوکچه هندی جلوگیری کند. این بررسی‌ها نشان داد که حداقل بخشی از اثرات مهاری تیموکینون 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

¹ *Nigella sativa* L.

³ Thymoquinone

² Ranunculaceae

⁴ Al-Majed



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 انکویه گردید. سپس بدون افزودن آگونیست‌های آگزوژن، 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 (μM , ۱۰۰، 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 الکترود 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 $0\frac{1}{2}$ 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 (μM , ۱۰۰، 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 الکترود حلقوی و به صورت تکرار شونده بر روی عضله انجام شد.

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 تؤین 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 (۱۱۸/۴)، KCl (۱/۴)، MgSO₄ (۰/۷)، Glucose (۰/۲)، CaCl₂ (۰/۵)، NaHCO₃ (۰/۵) و KH₂PO₄ (۰/۱). 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 ترانسیدیوسر ایزومتریک (E. Zimmermann, Eipzig, Berlin) که به دستگاه Oscillograph, 400 MD/2, George (Washington Ltd., England) متصل بود آغاز شد. به این ترتیب که تغیرات انقباضی عضله ایلئوم در پاسخ به محرك‌های آگزوژن شامل استیل‌کولین (μM , ۱۰)، هیستامین (μM , ۱۰۰) و پتاسیم کلراید (μM , ۱۰) به تنها یا در حضور تیموکینون ثبت گردید. غلظت‌های مختلف تیموکینون (μM , ۱۰۰، ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰) نیم ساعت قبل از استیل‌کولین، هیستامین و پتاسیم کلراید به محفظه بافتی اضافه شد.

¹ Acetylcholine

² Histamine

ترتیب از $۲/۱ \pm ۰/۹$ به $۲۳/۵ \pm ۱۴/۵$ ($p < 0.01$) و از $۲/۷ \pm ۳۲/۱$ به $۱۲/۳ \pm ۱/۲$ میلی نیوتون ($p < 0.001$) در ایلئوم کاهش داد. بیشترین اثر مهاری تیموکینون در هر سه گروه، با غلظت μM ۱۰۰ دیده شد ($p < 0.001$). این اثر تیموکینون برگشت پذیر بوده، به گونه ای که پس از ۱۲۰ دقیقه شست و شو با محلول کربس، پاسخ های انقباضی ایجاد شده توسط استیل کولین، هیستامین و پتاسیم کلرايد به ترتیب ۵۶، ۴۶ و ۲۵ درصد برگشت پیدا کرد. لازم به ذکر است، به منظور ارزیابی تاثیر احتمالی تؤین بر پاسخ های انقباضی، گروه کنترل (کربس نرمال + تؤین) با یک گروه کنترل تؤین (کربس نرمال بدون تؤین) مقایسه گردید که اختلاف معنی داری از نظر آماری مشاهده نشد.

اثر تیموکینون بر انقباضات خودبخودی ایلئوم خوکچه هندی
در محلول کربس نرمال، انقباضات خودبخودی ایلئوم در کلیه بافت های جدا شده وجود داشت. ولی پس از افزودن تیموکینون با حداقل غلظت μM ۲۰، ارتفاع انقباضات خودبخودی ایلئوم خوکچه هندی از $۱/۷ \pm ۲۵/۹$ به $۱/۱ \pm ۱۵/۲$ میلی نیوتون کاهش یافت ($p < 0.01$) (شکل ۴).
بیشترین اثر مهاری تیموکینون با غلظت μM ۱۰۰ مشاهده شد به گونه ای که این غلظت توانست انقباضات خودبخودی ایلئوم خوکچه هندی را از $۱/۷ \pm ۲۵/۹$ به $۰/۱ \pm ۱/۳$ میلی نیوتون کاهش دهد. میزان برگشت پذیری اثر تیموکینون حداقل ۶۱ درصد بود و پس از ۱۲۰ دقیقه شست و شو با محلول کربس به دست آمد (شکل شماره ۴).

اثر تیموکینون بر پاسخ انقباضی ایلئوم به تحریک الکتریکی
اثر غلظت های مختلف تیموکینون بر پاسخ های انقباضی ایلئوم خوکچه هندی به تحریک الکتریکی، در شکل ۵ نشان داده شده است. انکوباسیون عضله صاف ایلئوم خوکچه هندی با حداقل غلظت μM ۲۰ تیموکینون، توانست پاسخ های انقباضی این بافت به تحریک الکتریکی را از $۲/۷ \pm ۲۶/۱$ به $۱/۸ \pm ۱۷/۳$ میلی نیوتون کاهش دهد ($p < 0.05$). بیشترین اثر

در این آزمایش ابتدا اثرات تقویتی غلظت های تجمعی کلسیم کلرايد (mM ۱، ۲، $۰/۴$ ، $۰/۲$ ، $۰/۱$) 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 تیموکینون (μM ۸۰) تکرار شد (گروه هفتم). به این ترتیب که تیموکینون نیم ساعت قبل از افروzen غلظت های تجمعی کلسیم کلرايد 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

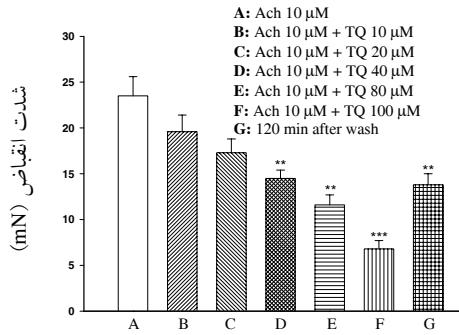
تغییرات ارتفاع پاسخ های انقباضی (میزان کشش بافت) که توسط فیزیوگراف بر حسب گرم ثبت شده بود، پس از تبدیل به واحد نیرو (نیوتون)، به صورت میانگین \pm انحراف معیار از میانگین^۱ برای چهار حیوان در هر گروه آزمایش ثبت و مقایسه شد. سپس به منظور بررسی وجود اختلاف بین پاسخ های کنترل و هر یک از نمونه های مورد آزمایش 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

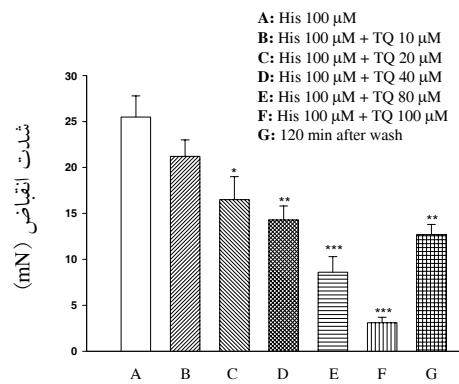
اثر تیموکینون بر پاسخ های انقباضی ایلئوم به استیل کولین، هیستامین و پتاسیم کلرايد
اثر غلظت های مختلف تیموکینون بر انقباضات ایجاد شده در ایلئوم خوکچه هندی توسط استیل کولین (μM ۱۰)، هیستامین (μM ۱۰۰) و پتاسیم کلرايد (mM ۱۰) در شکل های شماره ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.
در این آزمایش ها، تیموکینون با حداقل غلظت μM ۲۰ توانست ارتفاع انقباضات برانگیخته توسط هیستامین را از $۲/۳ \pm ۲۵/۵$ به $۲/۵ \pm ۱۶/۵$ میلی نیوتون کاهش دهد ($p < 0.05$). همچنین تیموکینون با حداقل غلظت μM ۴۰ ارتفاع پاسخ های انقباضی ایجاد شده توسط استیل کولین و پتاسیم کلرايد را به

^۱ Standard error of mean

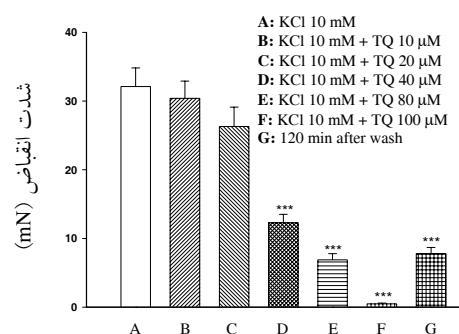




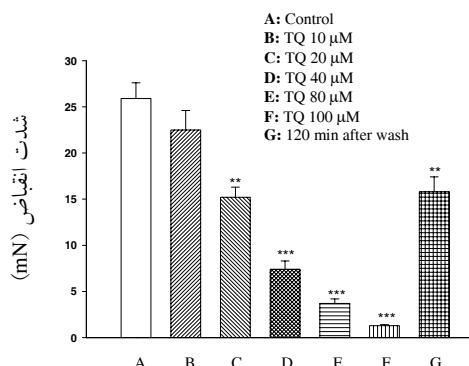
شکل شماره ۱- اثر تیموکینون (TQ) بر پاسخ‌های انقباضی ایجاد شده توسط $10 \mu\text{M}$ استیل کولین (ACh) در ایلنوم جدا شده خوکچه هندی. تیموکینون نیم ساعت قبل از استیل کولین به محفظه بافتی اضافه شد. شدت انقباض ایلنوم بر اساس واحد نیترو، میلی نیوتون (mN) بیان شده است. ستون‌ها بیانگر SEM ± (انحراف معیار از میانگین) برای \bar{x} بافت هستند. نتایج آماری، از مقایسه بین گروه کنترل (ACh) و گروه‌های آزمایش (ACh + TQ) در آزمون t -student به دست آمده است ($***p < 0.001$ و $**p < 0.01$).



شکل شماره ۲- اثر تیموکینون (TQ) بر پاسخ‌های انقباضی ایجاد شده توسط $100 \mu\text{M}$ هیستامین (His) در ایلنوم جدا شده خوکچه هندی. تیموکینون نیم ساعت قبل از هیستامین به محفظه بافتی اضافه شد. شدت انقباض ایلنوم بر اساس واحد نیترو، میلی نیوتون (mN) بیان شده است. ستون‌ها بیانگر SEM ± (انحراف معیار از میانگین) برای \bar{x} بافت هستند. نتایج آماری، از مقایسه بین گروه کنترل (His) و گروه‌های آزمایش (His + TQ) در آزمون t -student به دست آمده است ($***p < 0.005$ ، $*p < 0.05$ و $**p < 0.01$).



شکل شماره ۳- اثر تیموکینون (TQ) بر پاسخ‌های انقباضی ایجاد شده توسط 10 mM پتاسیم کلراید (KCl) در ایلنوم جدا شده خوکچه هندی. تیموکینون نیم ساعت قبل از پتاسیم کلراید به محفظه بافتی اضافه شد. شدت انقباض ایلنوم بر اساس واحد نیترو، میلی نیوتون (mN) بیان شده است. ستون‌ها بیانگر SEM ± (انحراف معیار از میانگین) برای \bar{x} 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. 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 عضله ایلئوم بر اساس واحد نیرو، میلی‌نیوتون (mN) یا نیوتن (N) 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 بdest 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.

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

بحث

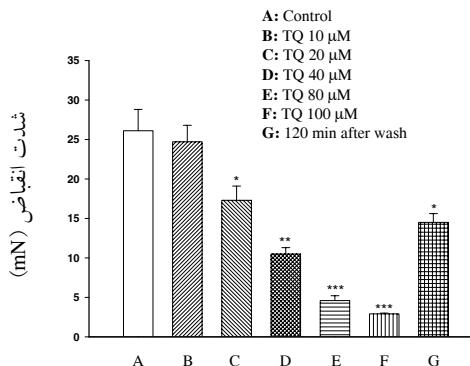
در آزمایش‌های انجام شده بر ایلئوم جدا شده خوکچه هندی، مشخص شد که تیموکینون دارای مهارت تحریک عضله ایلئوم را از ایجاد انقباض خودبخودی و برانگیخته توسط استیل‌کولین، هیستامین و پتاسیم کلراید است. استیل‌کولین به عنوان مهم‌ترین ناقل شیمیایی موجود در عضله صاف ایلئوم خوکچه هندی عمدهاً با تاثیر بر گیرنده‌های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

از سوی دیگر، آزمایش‌های انجام شده با استفاده از تحریک الکتریکی ایلئوم، نتایج مشابهی دال بر اثرات مهارت 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

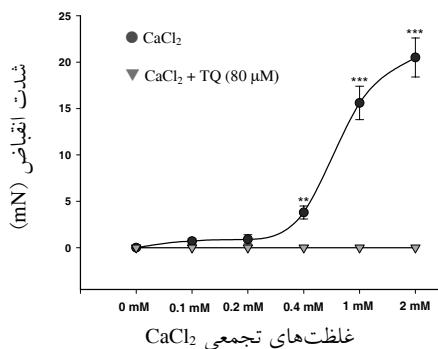
اثر غلظت‌های تجمعی CaCl_2 بر پاسخ‌های انقباضی ایلئوم به تحریک الکتریکی، قبل و بعد از افزودن تیموکینون، در محیط عاری از کلسیم

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 (۱، ۲ mM، $0/۰۲$ ، $۰/۰۱$) به داخل محفظه بافتی، ارتفاع پاسخ‌های انقباضی ایلئوم خوکچه هندی به تحریک الکتریکی را به طور وابسته به غلظت افزایش داد. حداقل پاسخ انقباضی در این آزمایش، با غلظت 2 mM کلسیم کلراید حاصل شد به نحوی که ارتفاع پاسخ‌های انقباضی از صفر به $2/1 \pm 20/5$ میلی‌نیوتون 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 شده خوکچه هندی. ثبت پاسخ‌های انقباضی ایلئوم خوکچه 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 عضله 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 ($***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*$ p < 0.05).



شکل شماره ۶ - اثر غلظت‌های تجمعی کلسیم کلراید (CaCl₂) بر پاسخ‌های انقباضی ایلئوم جدا شده خوکچه هندی به تحریک الکتریکی در محیط عاری از کلسیم، به تنهایی و در حضور تیموکینون (TQ) با غلظت $80 \mu\text{M}$. ثبت پاسخ‌های انقباضی ایلئوم به تحریک الکتریکی، نیم ساعت پس از افزودن هر یک از غلظت‌های کلسیم کلراید و تیموکینون به محفظه بافتی انجام شد. در این آزمایش، غلظت‌های مختلف کلسیم کلراید به صورت تجمعی به بافت اضافه شد. شدت انقباض ایلئوم خوکچه هندی بر اساس واحد نیرو، میلی‌نیوتن (mN) بیان شده است. هریک از نقاط، بیانگر میانگین \pm SEM (انحراف معیار از میانگین) برای ۴ بافت هستند. نتایج آماری از مقایسه بین گروه کنترل (دریافت کننده CaCl₂+TQ) در آزمون t-student به دست آمده است ($***p < 0.001$ و $**p < 0.01$).

اسانس دانه‌های سیاهدانه، کاملاً مطابقت دارد [۶,۷]. با این حال، اثبات نهایی این فرضیه نیازمند آزمایش‌های دقیق‌تر با استفاده از آگونیست و آنتاگونیست‌های اختصاصی گیرنده‌های موسکارینی در حضور تیموکینون نشان دار است. از سوی دیگر، شواهد به دست آمده از آزمایش‌های انجام شده در محیط عاری از کلسیم، نشان‌دهنده اثرات مهاری تیموکینون بر کanal‌های کلسیمی است. دلیل این امر آن است

می‌گردد. با مشاهده اثرات مهاری 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 نشان‌دهنده اثرات آنتی‌موسکارینی



را مطرح می‌سازد که تیموکینون بر گیرنده‌های هیستامینی H_1 موجود در ایلنوم، اثرات مهاری دارد (شکل شماره ۲). با آن‌که این نتایج با گزارش‌های موجود مبنی بر اثرات مهاری غیراختصاصی تیموکینون بر گیرنده‌های هیستامینی [۲۹] مطابقت دارد، نمی‌توان عملکرد مهاری تیموکینون بر پاسخ‌های انقباضی ایلنوم خوکچه هندی را به اثرات آنتاگونیستی آن بر گیرنده‌های H_1 نسبت داد. زیرا با فرض پذیرفتن فعالیت مهاری تیموکینون بر گیرنده‌های هیستامینی، باید برای تیموکینون اثرات تشنج‌زاوی 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 متوبرین^۱ و l-histidine) همانند خود هیستامین، اثرات ضدتشنجی 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 ایلنوم به هیستامین می‌شود. در همین ارتباط، با توجه به روند مشابه پیام رسانی داخل سلولی گیرنده‌های M_3 و H_1 که هر دو از طریق افزایش IP_3 ^۲ داخل سلولی موجب فعل کردن کanal‌های کلسیمی و افزایش غلظت کلسیم داخل سیتوپلاسمی و در نهایت انقباض عضله صاف می‌شوند، می‌توان مهار کanal‌های کلسیمی را به عنوان مکانیسم مشترک اثرات مهاری تیموکینون بر انقباضات ایلنوم بواسطه عملکرد این دو گیرنده دانست.

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

که در محیط عاری از کلسیم و در حضور تیموکینون (μM ۸۰)، افروden غلظت‌های تجمعی کلسیم کلراید نتوانست پاسخ‌های انقباضی ایلنوم به تحریکات الکتریکی را افزایش دهد (پاسخ‌ها در حد صفر باقی ماندند). از آنجا که انقباض عضله صاف ایلنوم به جریان‌های ورودی کلسیم از طریق کanal‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ (VDCCs)^۱ از نوع L وابسته است، و چون در حضور تیموکینون، افروden کلسیم کلراید نتوانست انقباضات ایلنوم را احیا کند (شکل شماره ۶)، اثرات مهاری تیموکینون بر کanal‌های کلسیمی در ایلنوم مطرح می‌شود.

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

نتایج مشابهی در بررسی‌های انجام شده با عصاره و انسنس سیاهدانه بر روی عضلات صاف شریان آئورت در خرگوش [۷۸] و عضلات صاف تراشه خوکچه هندی و خرگوش [۷۲] گزارش شده است. بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیقات، پیشنهاد شده که اثرات شلکنندگی انسنس سیاهدانه بر روی عضلات صاف، ناشی از فعالیت مهاری آن بر کanal‌های کلسیمی است. در نتیجه به نظر می‌رسد اثرات مهاری انسنس دانه‌های سیاهدانه بر کanal‌های کلسیمی، ناشی از وجود تیموکینون به عنوان مهم‌ترین ماده مؤثره موجود در آن است.

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

¹ Metoprine

² Inositol triphosphate

¹ Voltage-dependent calcium channels

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

بر این اساس می‌توان تیموکینون را به عنوان یک ترکیب شلکنده با منشای گیاهی، به منظور برطرف کردن اسپاسم‌های عضلات صاف گوارشی به خصوص ایلئوم، در کارآزمایی‌های بالینی مطرح نمود. همچنین احتمال وجود اثرات مهاری 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 مهاری تیموکینون بر انقباضات خودبخودی عضله صاف ایلئوم، به نظر می‌رسد فعالیت مهاری 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 استیل کولین، هیستامین، پتاسیم کلراید و تحریک الکتریکی را در عضله صاف ایلئوم خوکچه هندی کاهش دهد و این اثرات را عمدتاً

منابع

- Ali BH and Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother. Res.* 2003; 17: 299-305.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Aqel-Mahmoud B. Effects of *Nigella sativa* seeds on intestinal smooth muscle. *Int. J. Pharmacol.* 1993; 31: 55 - 60.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 thymoquinet 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, Hossinzadeh 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-Thiazolylethylamine, 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.

