بررسي فارماكولوژيك نقش كانالهاي كلسيمي در اثرات مهاري تيموكينون بر پاسخهاي انقباضي وازدفران جدا شده موش صحرائي

سیاوش پرورده[*1]، محمد فاتحی[**]

چکیده

هدف: اخیراً نشان داده شده است که تیموکینون، ماده مؤثرهٔ دانه‌های گیاه سیاهدانه[1] ، دارای اثر شل‌کنندگی بر تراشه و ایلئوم بوده و این اثر را احتمالاً با مهار غیر اختصاصی گیرنده‌های هیستامینرژیک و سروتونرژیک اعمال می‌کند. در مطالعهٔ حاضر، به منظور ارزیابی بیشتر مکانیسم عملکرد تیموکینون بر فعالیت انقباضی عضلات صاف، اثرات فارماکولوژیک آن بر پاسخهای انقباضی وازدفران موش صحرائی بررسی شد.

روش بررسی: موشهای صحرائی نر (شش گروه چهارتایی)، با زدن ضربه‌ای به سر بیهوش شده و هر دو وازدفران آنها خارج گردید و در محلول کربس قرار داده شد. پس از وصل کردن وازدفران به ترانسدیوسر، کشش اولیه به میزان ۰/۵ گرم به بافت اعمال شد. یک ساعت پس از قرارگیری بافت در حمام بافتی، کار ثبت انقباضات وازدفران در پاسخ به نوراپی‌نفرین (μM ۱۰)، دوپامین (μM ۱۰)، پتاسیم کلراید (mM ۸۰) و تحریک الکتریکی (فرکانس Hz ۲۰، مدت زمان ms ۰/۱، شدت V۱۳۰)، آغاز گردید. پس از ثبت پاسخهای انقباضی، ارتفاع پاسخها قبل و بعد از افزودن تیموکینون با یکدیگر مقایسه شد. همچنین، به منظور ارزیابی نقش کانالهای کلسیمی در اثرات مهاری تیموکینون، ارتفاع پاسخهای انقباضی ناشی از تحریک الکتریکی، قبل و بعد از افزودن تیموکینون، ابتدا در محیط عاری از کلسیم و سپس در حضور غلظت‌های تجمعی کلسیم کلراید، ثبت و بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که تیموکینون با حداقل غلظت μM ۲۰، ارتفاع انقباضات وازدفران را در پاسخ به پتاسیم کلراید و تحریک الکتریکی ($p<۰/۰۰۱$)، و با حداقل غلظت μM ۴۰، ارتفاع انقباضات وازدفران را در پاسخ به نوراپی‌نفرین و دوپامین ($p<۰/۰۱$) کاهش داده است. بیشترین اثر مهاری تیموکینون با غلظت μM ۱۰۰ مشاهده شد. علاوه بر این، آزمایشات انجام شده در محیط عاری از کلسیم نشان داد که تیموکینون (μM ۸۰)، مانع از افزایش ارتفاع پاسخهای انقباضی وازدفران در پاسخ به غلظت‌های تجمعی کلسیم کلراید گردیده است ($p<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده از این مطالعه، علاوه بر تأیید اثرات مهاری تیموکینون بر فعالیت انقباضی عضلات صاف، برای نخستین بار نشان می‌دهد یکی از مکانیسمهای شل‌کنندگی در وازدفران جدا شده موش صحرائی، از طریق مهار کانالهای کلسیمی صورت می‌پذیرد.

کلید واژگان: تیموکینون، وازدفران، کانالهای کلسیمی، موش صحرائی

مقدمه

سیاهدانه گیاهی است از خانوادهٔ آلاله[2] که اثرات درمانی متعددی برای آن شناخته شده است (۱). به عنوان مثال در برخی مطالعات نشان داده شده است که عصاره و اسانس دانه‌های سیاهدانه دارای اثرات شل‌کنندگی بر روی عضلات صاف از جمله عروق خونی(۲، ۳، ٤ و ۵)، رودهٔ کوچک (٦ و ۷)، تراشه(۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱)و رحم(۳و۱۲)

*استادیار، گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

**دانشیار، گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۱- نویسنده مسئول: سیاوش پرورده

دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۸/۲۲ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۱۲/۲ اعلام قبولی: ۱۳۸۵/۱۲/۲۱

1- Nigella satvia
2- Ranunculaceae

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

می‌باشد. پیشنهاد شده است که احتمالاً بخشی از این اثرات از طریق مهار کانالهای کلسیمی اعمال می‌شوند (۲، ٦، ۷ و ۸). اما تاکنون مشخص نشده است که اثرات شل کنندگی سیاهدانه بر روی عضلات صاف، ناشی از فعالیت کدامیک از مواد مؤثرهٔ تشکیل دهندهٔ آن می‌باشد. در این مطالعه، امکان وجود این اثرات در تیموکینون، به عنوان مهمترین و فراوانترین مواد مؤثرهٔ موجود در دانه‌های گیاه سیاهدانه (۱۳) ارزیابی شده است.

تیموکینون[1]، مهمترین مادهٔ مؤثرهٔ موجود در دانه‌های گیاه سیاهدانه بوده و دارای اثرات فارماکولوژیکی متعددی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به اثرات آرامبخشی (١٤)، ضد ایسکمی (۱۵)، ضد تشنجی (١٦، ۱۷ و ۱۸)، ضد دردی (۱۹)، ضد التهابی (۲۰)، ضد سرطانی (۲۱، ۲۲، ۲۳ و ٢٤) محافظت کبدی (۲۵، ٢٦ و ۲۷)، محافظت کلیوی (۲۸) و شلی عضلات صاف (۲۹)، اشاره کرد.

در مطالعه‌ای که توسط Al-Majed و همکاران صورت گرفت، مشخص شد که تیموکینون قادر است انقباض ایجاد شده توسط کارباکول[2] را در عضله صاف تراشه خوکچه هندی مهار نماید. همچنین تیموکینون توانست انقباضات ایجاد شده توسط هیستامین و سروتونین را در تراشه و ایلئوم جدا شده خوکچه هندی مهار کند. بررسی‌های انجام شده توسط این محققین نشان داد که اثرات مهاری تیموکینون بر انقباضات تراشه و ایلئوم جدا شده، حداقل بخشی از طریق مهار تولید محصولات ناشی از متابولیسم آراشیدونیک اسید در مسیر لیپواکسیژناز و نیز مهار غیراختصاصی گیرنده‌های هیستامینرژیک و سروتونرژیک صورت می گیرد (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 مطالعه‌ای به منظور بررسی نقش کانالهای کلسیمی در ارتباط با اثرات مهاری تیموکینون بر پاسخهای انقباضی عضلات صاف صورت نگرفته است، در این تحقیق به مطالعه این موضوع پرداخته شد.

همانگونه که اشاره شد، اثرات شل کنندگی اسانس دانه‌های گیاه سیاهدانه بر عضلات صاف در مطالعات مختلف گزارش شده (۲، ۳، ٤، ۵، ٦، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲) و فعالیت مهاری آن بر کانالهای کلسیمی به عنوان یکی از مکانیسمهای اثر، عنوان شده است (۲، ٦، ۷ و ۸). از آنجا که تیموکینون مهمترین و فراوانترین ماده مؤثره موجود در دانه‌های سیاهدانه می‌باشد، این احتمال مطرح می‌شود که اثرات مهاری سیاهدانه بر عضلات صاف (با مکانیسم احتمالی مهار کانالهای کلسیمی) به واسطهٔ عملکرد تیموکینون موجود در اسانس دانه‌ها باشد. لذا در این تحقیق به ارزیابی اثرات تیموکینون بر فعالیت انقباضی عضلات صاف وازدفران موش صحرائی پرداخته و علاوه بر مطالعه اثرات تیموکینون بر انواع پاسخهای انقباضی ایجاد شده در وازدفران، نقش کانالهای کلسیمی به عنوان مهمترین اجزای شرکت کننده در روند انقباضی عضلات صاف، مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

آماده سازی بافت:موشهای صحرائی نر از نژاد Sprague-Dawley به وزن ۳۰۰-۲۰۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. موشها در ٦ گروه ٤ تایی تقسیم شدند. پس از نخاعی کردن حیوان، بلافاصله قسمت تحتانی شکم باز شد و هر دو وازدفران حیوان خارج گردید و در محلول کربس گرم (۳۷ درجه سانتیگراد) و اکسیژنه (۹۵درصد اکسیژن و ۵درصد دی اکسید کربن) قرار گرفت. سپس عضلهٔ وازدفران از عروق خونی و بافتهای همبند اطراف پاک شد و قطعه‌ای به طول ۲ سانتیمتر از بخش اپیدیدیم[3] آن جدا گردید. قطعات جدا شده (۸ نمونه در هر گروه) به مدت ۱ ساعت تحت کشش ۰/۵ گرم (۳۰ و ۳۱) در داخل حمام بافتی به حجم ۵۰ میلی لیتر حاوی محلول

1-Thymoquinone (TQ)
2-Carbachol
3-Epididymis

Archive of SID
www.SID.ir

کربس اکسیژنه (۹۵درصد اکسیژن و ۵درصد دی اکسید کربن) و گرم (۳۷ درجه سانتیگراد) قرار گرفتند.

داروها و محلولها

نوراپی‌نفرین[1] ، دوپامین[2] و تیموکینون از شرکت Sigma خریداری شدند. سایر مواد شیمیایی جهت تهیهٔ محلول کربس از شرکت Merck تهیه گردیدند. کلیهٔ داروها در داخل آب مقطر حل شدند. در مورد تیموکینون به منظور انحلال بهتر، از توئین ۸۰ به عنوان کمک حلال استفاده گردید (۰/۸درصد حجمی/ حجمی). لازم به ذکر است کلیه داروها و محلولها به صورت تازه تهیه گردیدند و حداکثر حجم مورد استفاده از داروها در محفظهٔ بافتی، ۰/۵ میلی‌لیتر بود. ترکیب شیمیایی محلول کربس بر حسب میلی‌مولار (mM) عبارت بود از: NaCl (۱۱۸/٤)، KCl (٤/۷)، $MgSO_4$ (۱/٤) ، KH_2PO_4 (۱/۲) ، $CaCl_2$ (۲/۵) ، $NaHCO_3$ (۲۵) و Glucose (۱۱/۱). در برخی آزمایشات از محلول کربس عاری از کلسیم استفاده شد که در آن $CaCl_2$ از محلول کربس حذف گردید.

ثبت پاسخهای انقباضی وازدفران به NE ، DA و KCl

گروه اول تا سوم حیوانات، به ترتیب برای انجام آزمایشات مربوط به ثبت پاسخهای انقباضی وازدفران به NE، DA و KCl در نظر گرفته شدند. پس از آنکه عضلهٔ وازدفران به مدت ۱ ساعت تحت کشش ۰/۵ گرم در داخل محفظهٔ بافتی حاوی محلول کربس گرم و اکسیژنه قرار گرفت، کار ثبت کششی[3] 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 شدت انقباضات وازدفران در پاسخ به NE و DA هریک به غلظت ۱۰ میکرومولار (μM) و KCl (۸۰ mM)، قبل و بعد از افزودن تیموکینون ثبت گردید. غلظتهای مختلف تیموکینون (μM ۱۰۰، ۸۰، ٤۰، ۲۰، ۱۰) نیم ساعت قبل از NE ، DA و KCl به محفظهٔ بافتی اضافه شد.

پاسخ انقباضی وازدفران به تحریک الکتریکی

گروه چهارم حیوانات برای ثبت پاسخهای انقباضی وازدفران به تحریک الکتریکی آماده شدند. پس از آماده سازی بافت، تحریک الکتریکی توسط یک الکترود حلقوی و با استفاده از دستگاه تحریک کننده (Grass S88) بر روی وازدفران جدا شده اعمال شد. این تحریک به صورت تکرار شونده با فرکانس ۲۰ هرتز، مدت زمان ۰/۱ میلی ثانیه و شدت ۱۳۰ ولت اعمال شد (۳۲). هر تحریک الکتریکی باعث ایجاد یک انقباض تیپیک و سریع در عضلهٔ وازدفران می‌شود که به صورت یک تکانه عضلانی در دستگاه فیزیوگراف ثبت می‌گردد. در این آزمایش، غلظتهای افزایشی تیموکینون (μM ۱۰۰، ۸۰، ٤۰، ۲۰، ۱۰) نیم ساعت قبل از تحریک الکتریکی، بر روی وازدفران جدا شده در حمام بافتی اضافه گردید.

پاسخ انقباضی وازدفران به تحریک الکتریکی در محیط عاری از کلسیم

گروههای پنجم و ششم حیوانات، به ترتیب برای انجام آزمایشات تحریک الکتریکی در محیط عاری از کلسیم، یکبار در غیاب تیموکینون و سپس در حضور تیموکینون، استفاده شدند. در این آزمایشات، از محلول کربس عاری از کلسیم استفاده شد که در آن $CaCl_2$ از محلول کربس حذف شده بود. یک ساعت پس از قرار گرفتن عضلهٔ وازدفران در محلول کربس عاری از کلسیم، تحریک الکتریکی توسط یک الکترود حلقوی و به صورت تکرار شونده بر روی عضله اعمال شد. در گروه پنجم، اثرات تقویتی غلظتهای تجمعی کلسیم کلراید (mM ۲، ۱، ۰/٤، ۰/۲ و ۰/۱) بر روی پاسخهای انقباضی عضلهٔ صاف وازدفران در محیط عاری از کلسیم به عنوان کنترل ثبت

1-Norepinephrine (NE)
2-Dopamine (DA)
3-Tension Recording

Archive of SID
www.SID.ir

شد. در گروه ششم (گروه آزمایش)، تیموکینون با غلظت کلسیم کلراید به داخل حمام بافتی اضافه شد و سپس پاسخهای انقباضی عضله وازدفران به تحریک الکتریکی ثبت و با گروه کنترل مقایسه گردید.

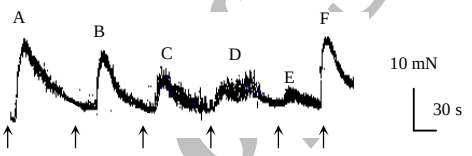
تجزیه و تحلیل آماری

تغییرات ارتفاع پاسخهای انقباضی که توسط فیزیوگراف بر حسب گرم کشش بافت ثبت شده بود، پس از تبدیل به واحد نیرو (نیوتن)، به صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین (SEM)[1] برای چهار حیوان (۸ نمونه) در هر گروه آزمایش گزارش شد. سپس به منظور بررسی وجود اختلاف بین پاسخهای کنترل و هر یک از نمونه‌های مورد آزمایش در هر گروه، از آزمون Student's t-test ۸۰ μM، نیم ساعت قبل از افزودن غلظتهای تجمعی استفاده شد. نتایجی که دارای ارزش P کوچکتر از ۰/۰۵ بود، به عنوان نتایج معنی‌دار در نظر گرفته شد.

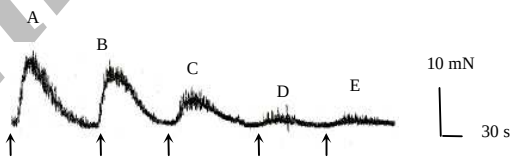
یافته ها

اثر تیموکینون بر پاسخ انقباضی وازدفران به NE، DA و KCl

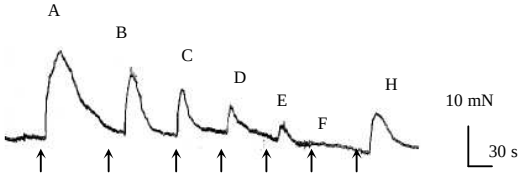
اثر غلظت‌های مختلف تیموکینون (۱۰۰ μM، ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰) بر انقباضات ایجاد شده در وازدفران توسط NE (۱۰ μM)، DA (۱۰ μM) و KCl (۸۰ mM) به ترتیب در نمودارهای ۱ ، ۲ و ۳ نشان داده شده است.



نمودار ۱: اثر تیموکینون بر پاسخهای انقباضی ایجاد شده توسط NE (۱۰ μM) در وازدفران موش صحرائی. تیموکینون توانست به صورت وابسته به غلظت (۱۰۰، ۸۰، ۴۰ μM) ارتفاع پاسخهای انقباضی را کاهش دهد. فلشها نشان دهندهٔ تزریق NE به درون محفظهٔ بافتی می‌باشد. A: کنترل (NE)، B: تیموکینون ۲۰ μM، C: تیموکینون ۴۰ μM، D: تیموکینون ۸۰ μM، E: تیموکینون ۱۰۰ μM، F: دو ساعت پس از شست و شو.



نمودار ۲: اثر تیموکینون بر پاسخهای انقباضی ایجاد شده توسط DA (۱۰ μM) در وازدفران موش صحرائی. تیموکینون توانست به صورت وابسته به غلظت (۱۰۰، ۸۰، ۴۰ μM) ارتفاع پاسخهای انقباضی را کاهش دهد. فلشها نشان دهندهٔ تزریق DA به درون محفظهٔ بافتی می‌باشد. A: کنترل (DA)، B: تیموکینون ۲۰ μM، C: تیموکینون ۴۰ μM، D: تیموکینون ۸۰ μM، E: تیموکینون ۱۰۰ μM.



نمودار ۳: اثر تیموکینون بر پاسخهای انقباضی ایجاد شده توسط KCl (۸۰ mM) در وازدفران موش صحرائی. تیموکینون توانست به صورت وابسته به غلظت (۱۰۰ μM، ۸۰، ۴۰، ۲۰) ارتفاع پاسخهای انقباضی را کاهش دهد. فلشها نشان دهندهٔ تزریق KCl به درون محفظهٔ بافتی

Archive of SID
www.SID.ir

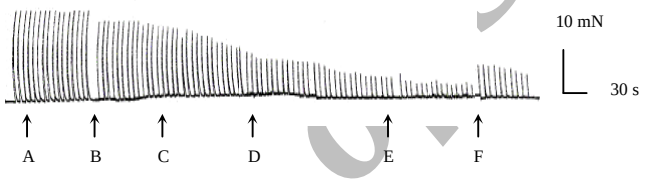
می‌باشد. A: کنترل (KCl)، B: تیموکینون μM ۱۰، C: تیموکینون μM ۲۰، D: تیموکینون μM ۴۰، E: تیموکینـون μM ۸۰، F: تیموکینـون μM ۱۰۰، H: دو ساعت پس از شست و شو.

1- Standard Error of Mean

در این آزمایشات، تیموکینون با حداقل غلظت μM ٤٠ توانست ارتفاع پاسخهای انقباضی ایجاد شده توسط NE و DA را در وازدفران جدا شده موش صحرائی کاهش دهد (p<۰/۰۱). همچنین تیموکینون با حداقل غلظت μM ۲۰ توانست ارتفاع پاسخهای انقباضی ایجاد شده توسط KCl را در وازدفران جدا شده موش صحرائی کاهش دهد (p<۰/۰۰۱). بیشترین اثر مهاری تیموکینون در هر سه گروه، با غلظت μM ۱۰۰ مشاهده شد (p<۰/۰۰۱). این اثر تیموکینون برگشت پذیر بوده، به طوریکه پس از ۱۲۰ دقیقه شست و شو با محلول کربس، پاسخهای انقباضی ایجاد شده توسط NE، DA و KCl به ترتیب به میزان ۸۱ ، ۷۸ و ٤٠ درصد برگشت پیدا کرد (جدول ۱).

اثر تیموکینون بر پاسخ انقباضی وازدفران به تحریک الکتریکی

اثر غلظتهای مختلف تیموکینون (μM ۱۰۰، ۸۰، ٤٠، ۲۰، ۱۰) بر پاسخهای انقباضی وازدفران به تحریک الکتریکی در نمودار ٤ نشان داده شده است.



نمودار ۴: اثر تیموکینون بر پاسخهای انقباضی وازدفران موش صحرائی به تحریک الکتریکی (فرکانس ۲۰ هرتز، مدت زمان ۰/۱ میلی ثانیه و شدت ۱۳۰ ولت). تیموکینون توانست به صورت وابسته به غلظت (μM ۱۰۰، ۸۰، ٤٠، ۲۰) ارتفاع انقباضات وازدفران را در پاسخ به تحریک الکتریکی کاهش دهد. A: کنترل (محلول کربس نرمال)، B: تیموکینون μM ۲۰، C: تیموکینون μM ۴۰، D: تیموکینون μM ۸۰، E: تیموکینون μM ۱۰۰، F: دو ساعت پس از شست و شو.

تیموکینون با حداقل غلظت μM ۲۰ توانست پاسخهای انقباضی وازدفران به تحریک الکتریکی را به طور معنی‌داری کاهش دهد (p<۰/۰۱). در این آزمایش، بیشترین اثر مهاری تیموکینون با غلظت μM ۱۰۰ مشاهده شد (p<۰/۰۰۱). شروع اثر تیموکینون ۵ دقیقه پس از اضافه کردن دارو و حداکثر پاسخ مهاری آن نیز پس از ۳۰ دقیقه ثبت شد. میزان برگشت پذیری اثر تیموکینون حداکثر ٤٠درصد بوده و پس از ۱۲۰ دقیقه شست و شو با محلول کربس حاصل شد (جدول ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

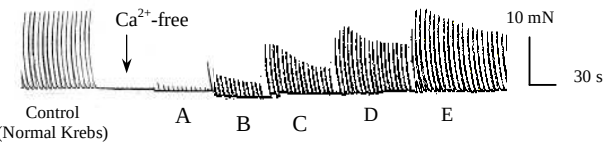
شدت انقباض عضلهٔ وازدفران در پاسخ به NE		شدت انقباض عضلهٔ وازدفران در پاسخ به DA		شدت انقباض عضلهٔ وازدفران در پاسخ به KCl		شدت انقباض عضلهٔ وازدفران در پاسخ به تحریک الکتریکی	
دارو (غلظت μM)	شدت انقباض (mN)	دارو (غلظت μM)	شدت انقباض (mN)	دارو (غلظت mM)	شدت انقباض (mN)	تحریک الکتریکی	شدت انقباض (mN)
کنترل: NE (۱۰)	۱۷/۵ ± ۱/۸	کنترل: DA (۱۰)	۱٤/۲ ±۰/۱	کنترل: KCl (۸۰)	۱۸/۵ ±۱/۱	کنترل: محلول کربس	۲۰/۵ ±۱/۸
(۱۰) TQ + (۱۰) NE	۱۵/۳ ± ۱/٦	(۱۰) TQ + (۱۰) DA	۱٤/۱ ± ۰/۵	(۰/۰۱) TQ + (۸۰) KCl	۱۲/۸ ± ۲/۳	(۱۰) TQ	۱۷/۸ ± ۲/۱
(۲۰) TQ + (۱۰) NE	۱۲/۷ ± ۲/۱	(۲۰) TQ + (۱۰) DA	۱۳/۵ ± ۰/۲	(۰/۰۲) TQ + (۸۰) KCl	۱۰/۱ ± ۱/۱***	(۲۰) TQ	۱۲/۳ ± ۱/۲**
(٤۰) TQ + (۱۰) NE	۸/۱ ± ۰/۵**	(٤۰) TQ + (۱۰) DA	۷/۳ ± ۰/۱**	(۰/۰٤) TQ + (۸۰) KCl	٦/۷ ± ۰/۷***	(٤۰) TQ	۷/۵ ± ۰/۹***
(۸۰) TQ + (۱۰) NE	٤/٤ ± ۰/۱***	(۸۰) TQ + (۱۰) DA	٤/۱ ± ۰/۰۸***	(۰/۰۸) TQ + (۸۰) KCl	٤/۲ ± ۰/۱***	(۸۰) TQ	٦/۳ ± ۰/۸***
(۱۰۰) TQ + (۱۰) NE	۲/٦ ± ۰/۳***	(۱۰۰) TQ + (۱۰) DA	۲/۱ ± ۰/۰۷***	(۰/۱) TQ + (۸۰) KCl	۲/۱ ± ۰/۰۹***	(۱۰۰) TQ	۵/۱ ± ۰/۷***
شست و شو (۲ ساعت)	۱٤/۲ ± ۲/۳	شست و شو (۲ ساعت)	۱۱/۲ ± ۱/۲	شست و شو (۲ ساعت)	۷/۲ ± ۰/٦	شست و شو (۲ ساعت)	۸/۲ ± ۰/۵

جدول ۱:اثر تیموکینون بر پاسخهای انقباضی وازدفران موش صحرائی به NE ، DA ، KCl و تحریک الکتریکی.

جدول ۱: اثر تیموکینون بر پاسخهای انقباضی وازدفران موش صحرائی به NE (۱۰ μM)، DA (۱۰ μM)، KCl (۸۰ mM) و تحریک الکتریکی (۲۰ Hz، ۰/۱ ms، ۱۳۰ V). تیموکینون نیم ساعت قبل از NE، DA، KCl و اعمال تحریک الکتریکی به محفظه بافتی اضافه شد. اعداد، بیانگر میانگین شدت انقباض بر حسب میلی نیوتن (mN) ± SEM برای ۸ بافت می‌باشند. P<۰/۰۱ و P***<۰/۰۰۱ ، آزمون t-student.**

اثر غلظتهای تجمعی کلسیم کلراید بر پاسخهای انقباضی وازدفران 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 عضلهٔ وازدفران به تحریک الکتریکی کاهش یافت و به صفر رسید. در این شرایط، افزودن غلظتهای مختلف کلسیم کلراید (۲ mM، ۱، ۰/٤، ۰/۲، ۰/۱) به صورت تجمعی به داخل محفظهٔ بافتی، پاسخهای انقباضی عضلهٔ وازدفران را به تحریک الکتریکی به طور کامل احیاء کرد. حداکثر پاسخ انقباضی در این آزمایش، با غلظت ۲ mM کلسیم کلراید حاصل شد (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۵).



Archive of SID
www.SID.ir

نمودار ۵: اثر غلظتهای تجمعی $CaCl_2$ بر پاسخهای انقباضی وازدفران موش صحرائی به تحریک الکتریکی (فرکانس ۲۰ هرتز، مدت زمان ۰/۱ میلی ثانیه و شدت ۱۳۰ ولت) در محیط عاری از کلسیم. A: کلسیم کلراید ۰/۱ mM، B: کلسیم کلراید ۰/۲ mM، C: کلسیم کلراید ۰/۴ mM، D: کلسیم کلراید ۱ mM، E: کلسیم کلراید ۲ mM .

اما در محیط عاری از کلسیم، افزودن غلظتهای تجمعی کلسیم کلراید در حضور تیموکینون (۸۰ μM)، نتوانست پاسخهای انقباضی وازدفران به تحریک الکتریکی را احیاء کند (نمودار ٦).

نمودار ۶: اثر غلظتهای تجمعی $CaCl_2$ بر پاسخهای انقباضی وازدفران به تحریک الکتریکی (فرکانس ۲۰ هرتز، مدت زمان ۰/۱ میلی ثانیه و شدت ۱۳۰ ولت) در محیط عاری از کلسیم، در حضور تیموکینون (۸۰ μM). A: کلسیم کلراید ۰/۱ mM، B: کلسیم کلراید ۰/۲ mM، C: کلسیم کلراید ۰/۴ mM، D: کلسیم کلراید ۱ mM، E: کلسیم کلراید ۲ mM.

تغییرات ارتفاع پاسخهای انقباضی وازدفران به تحریک الکتریکی در محیط عاری از کلسیم و اثر غلظتهای تجمعی کلسیم کلراید در حضور یا عدم حضور تیموکینون در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: اثر غلظتهای تجمعی کلسیم کلراید بر پاسخهای انقباضی وازدفران موش صحرائی به تحریک الکتریکی در محیط عاری از کلسیم، قبل و بعد از افزودن تیموکینون (۸۰ μM).

دارو (غلظت mM)	شدت انقباض عضلهٔ وازدفران (mN)	
	کنترل (قبل از افزودن تیموکینون)	پس از افزودن تیموکینون (۸۰ μM)
کلسیم کلراید (۰)	۰	۰
کلسیم کلراید (۰/۱)	۱/۱ ± ۰/۷	۰
کلسیم کلراید (۰/۲)	۱/۵ ± ۰/۹	۰
کلسیم کلراید (۰/٤)	۵/۵ ± ۰/۸***	۰
کلسیم کلراید (۱)	۱۳/۱ ± ۱/۱***	۰
کلسیم کلراید (۲)	۱۵/۸ ± ۱/۵***	۰

www.SID.ir
Archive of SID

جدول ۲: اثر غلظتهای تجمعی کلسیم کلراید بر پاسخهای انقباضی وازدفران به تحریک الکتریکی (۲۰ Hz، ۰/۱ ms، ۱۳۰ V) در محلول کربس عاری از کلسیم، به تنهایی و در حضور تیموکینون ۸۰ µM اعداد، بیانگر میانگین شدت انقباض بر حسب میلی نیوتن (mN) ± SEM برای ۸ بافت می‌باشند. P<۰/۰۰۱* ، آزمون t-student.**

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که تیموکینون دارای فعالیت مهاری بر انقباضات ایجاد شده در عضلات صاف وازدفران می‌باشد. ضمن اینکه آزمایشات تکمیلی به منظور ارزیابی مکانیسمهای احتمالی اثرات تیموکینون بر عضلات صاف وازدفران، منجر به کسب نتایجی دال بر اثرات مهاری تیموکینون بر کانالهای کلسیمی گشت.

پاسخهای انقباضی وازدفران به تحریک الکتریکی، ناشی از آزاد شدن NE از انتهای نورونهای آدرنرژیک که به عضلهٔ صاف وازدفران عصب‌دهی می‌کنند، صورت می‌گیرد (۳۳ و ۳۴). همانطور که در بخش نتایج اشاره شد، پاسخهای انقباضی وازدفران به تحریک الکتریکی توسط تیموکینون به طور قوی مهار شد (جدول ۱). از آنجا که اثرات مهاری تیموکینون بر پاسخهای انقباضی وازدفران به NE اگزوژن در این آزمایشات به تأیید رسید، این احتمال مطرح می‌شود که تیموکینون گیرنده های آدرنرژیک موجود در عضله صاف وازدفران را مهار می‌کند.

تیموکینون اثرات مهاری مشابهی بر روی پاسخهای انقباضی ایجاد شده توسط DA در وازدفران موش صحرائی از خود نشان داد. بر این اساس، احتمال اثرات مهاری تیموکینون بر گیرنده‌های دوپامینرژیک موجود در وازدفران موش صحرائی نیز مطرح می‌شود. ولی نتایج بدست آمده از آزمایشات انجام شده در محیط عاری از کلسیم، این فرضیه را به طور قوی مطرح می‌سازد که تیموکینون بر جریانهای ورودی کلسیم مورد نیاز جهت انقباض عضلهٔ صاف وازدفران اثرات مهاری اعمال می‌کند. همانطور که در شکل ۵ مشاهده شد، حذف کلسیم از محلول کربس موجب از بین رفتن کلیه فعالیتهای انقباضی وازدفران در پاسخ به تحریک الکتریکی گردید (علامت فلش در شکل ۵). ولی با افزودن تدریجی کلسیم کلراید به حمام بافتی و نزدیک شدن غلظت کلسیم به مقدار اصلی آن در محلول کربس، پاسخهای انقباضی وازدفران مجدداً احیا شدند (بخشهای A، B، C، D و E در شکل ۵). این آزمایش که در غیاب تیموکینون صورت گرفت، نقش کلسیم خارج سلولی را در انقباضات عضله صاف وازدفران به وضوح نشان می‌دهد. تکرار همین آزمایش در شکل ٦ مشاهده می‌شود، با این تفاوت که تیموکینون با غلظت ۸۰ µM به محلول کربس اضافه شده است. همانطور که در شکل ٦ نمایان است، پس از حذف کلسیم از محیط، فعالیت انقباضی عضلهٔ وازدفران به صفر کاهش یافت. ولی اینبار، افزودن تدریجی کلسیم کلراید به محیط در حضور تیموکینون (۸۰ µM)، دیگر نتوانست ارتفاع پاسخهای انقباضی وازدفران به تحریک الکتریکی را به حالت اولیهٔ خود برگرداند. افزایش غلظت داخل سیتوپلاسمی کلسیم یکی از مهمترین شرایط مورد نیاز برای انقباض عضلات صاف می‌باشد. این افزایش کلسیم داخل سیتوپلاسمی، می‌تواند با افزایش عبور کلسیم به درون سلول از طریق کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ از نوع L که در غشای پلاسمایی سلول عضلهٔ صاف قرار دارند صورت گیرد و یا توسط ذخایر محدود کلسیم داخل سلولی تامین شود. افزایش ورود کلسیم به داخل سلول عضلهٔ صاف وازدفران از طریق فعال شدن کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع L، بدنبال دپلاریزه شدن غشای سلول عضلهٔ صاف و در نتیجه فعال شدن این کانالها رخ می‌دهد (۳۴ و ۳۵).

بر این اساس، احتمال اثر مهاری تیموکینون بر جریانهای ورودی کلسیم از عرض غشای سلول عضله صاف وازدفران مطرح می‌شود. به منظور بررسی بیشتر این فرضیه، یک غلظت بالای KCl (۸۰ mM) جهت

Archive of SID
www.SID.ir

دپلاریزه کردن بافت استفاده شد. نتایج نشان داد که تیموکینون توانسته است به صورت وابسته به غلظت موجب کاهش انقباض وازدفران در پاسخ به تحریک KCl گردد.

انقباض عضلهٔ وازدفران در پاسخ به KCl از طریق دپلاریزاسیون غشای سلولهای عضلهٔ صاف، باز شدن کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ و ورود کلسیم به داخل سلول عضلهٔ صاف وازدفران صورت می‌گیرد (۳۴، ۳۶ و ۳۷). شواهدی در دست است که نشان می‌دهد ترکیباتی که قادر به مهار پاسخ انقباضی ناشی از KCl باشند، واجد اثرات مهاری بر کانالهای کلسیمی می‌باشند (۳۸). بر این اساس، مهار انقباضات عضلهٔ وازدفران در پاسخ به KCl که توسط تیموکینون صورت گرفت، فعالیت مهاری تیموکینون را بر کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ مطرح می‌سازد. در نتیجه، مکانیسم اثرات مهاری تیموکینون بر پاسخهای انقباضی وازدفران جدا شده موش صحرائی، حداقل بخشی از طریق مهار کانالهای کلسیمی صورت می‌گیرد. نتایج مشابهی در مورد عصاره و اسانس سیاهدانه در مطالعات انجام شده بر روی عضلات صاف شریان آئورت در خرگوش (۲) و عضلات صاف تراشهٔ خوکچه هندی و خرگوش (۷ و ۸) گزارش شده است. بر اساس این نتایج پیشنهاد شده است که اثرات شل کنندگی اسانس سیاهدانه بر روی عضلات صاف، ناشی از فعالیت آنتاگونیستی آن بر روی کانالهای کلسیمی می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد اثرات مهاری اسانس دانه‌های سیاهدانه بر روی کانالهای کلسیمی، ناشی از وجود تیموکینون در آن باشد. در مجموع نتایج بدست آمده از این آزمایشات نشان می‌دهد که تیموکینون قادر است فعالیت انقباضی وازدفران موش صحرائی را در پاسخ به NE، DA، KCl و تحریک الکتریکی کاهش دهد و این اثر را حداقل بخشی از طریق مهار کانالهای کلسیمی عضله صاف اعمال می‌کند. بر این اساس می‌توان تیموکینون را به عنوان یک ترکیب ضد اسپاسم با منشا گیاهی، به منظور برطرف نمودن انقباضات عضلات صاف مجاری ادراری در کارآزمایی‌های بالینی مطرح نمود.

منابع

1-Ali BH, 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, Ageel AM. Pharmacological studies on sesame and Nigella sativa fixed oil: Effects on the sensitivities of the adrenoceptors, baroreceprors, platelets and the uterus of the rat. Saudi Pharmac J 1997 7: 205-15.

4-El-Tahir KEH, Ashour MMS, 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: 1123-31.

5-Zaoui A, Cherrah Y, Lacaille-Dubois MA, Settaf A, Amarouch H, Hassar M. Diuretic and hypotensive effects of Nigella sativa on the spontaneously hypertensive rat. Therapie 2000 55: 379-82.

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, 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: 115-20.

8-Aqel-Mahmoud B. The calcium antagonistic effect of the volatile oil of Nigella sativa seeds. Dirasat Series B Pure Appl Sci 1993 19: 119-33.

9-Boskabady MH, Shahabi M. Bronchodilatory and anticholinergic effects of Nigella sativa on isolated guinea pig tracheal chains. Ir J Med Sci 1997 22: 127-33.

Archive of SID

www.SID.ir

10-Boskabady MH, 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, 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, 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: 23-6.

13-Filippo D'Antuono L, Moretti A, 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.

۱۴- پرورده س، حسین زاده ح. بررسی اثرات خواب‌آوری و شلی عضلانی تیموکینون، ماده موثره سیاهدانه (Nigella sativa) و تاثیر آن بر فعالیت و هماهنگی سیستم حرکتی موش. فصلنامه گیاهان دارویی ۱۳۸۲، سال دوم، ص ۱۷-۲۵.

۱۵- پرورده س، نصیری اصل م، حسین زاده ح. اثرات محافظتی تیموکینون بر آسیب ناشی از ایسکمی و پرفیوژن مجدد مغزی در رت. مجله علوم پایه پزشکی ایران ۱۳۸۳، سال هفتم، ص ۶۵-۷۰

۱۶- پرورده س، حسین زاده ح. نقش گیرنده‌های اوپیوئیدی در اثر ضد تشنجی تیموکینون، ماده موثره سیاهدانه (Nigella sativa) در موش. مجله علوم پایه پزشکی ایران ۱۳۸۲، سال ششم، ص۲۰۲- ۲۰۶

17-Hosseinzadeh H, 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, Mansouri MT. Intra-cerebroventricular administration of thymoquinone, the major constituent of Nigella sativa seeds, suppresses epileptic seizures in rats. Med Sci Monit 2005 11, 106-10.

19-Abdel-Fattah AM, Matsumoto K, 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, Hoult RS. Fixed oil of Nigella sativa and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. Planta Med 1995 61: 33-6.

21-Badary OA. Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. J Ethnopharmacol 1999 67: 135- 42.

22-Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. Anticancer Drugs 2004 15: 389-99.

23-Hassan M, El-Dakhakhny M. Effect of some Nigella sativa Constituents on chemical carcinogenesis in hamster cheek pouch. J Egypt Soci Pharmacol Exp Ther 1992 11: 675-7.

24-Worthen DR, Ghosheh OA, 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): 1527-32.

25-Al-Gharably NM, Badary OA, Nagi MN, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Rikabi AC, et al. Protective effect of thymoquinone against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. Res Commun Pharmacol Toxicol 1997 2: 41-50.

26-Daba MH, 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, al-Bekairi AM. Thymoquinone protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice via an antioxidant mechanism. Biochem Mol Biol Int 1999 47: 153-9.

28-Badary OA, Nagi MN, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Sohaibani MO, Al-Bekairi AM. Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. Can J Physiol Pharmacol 1997 75: 1356-61.

29-Al-Majed AA, Daba MH, Asiri YA, Al-Shabanah OA, Mostafa AA, El-Kashef HA. Thymoquinone-induced relaxation of guinea-pig isolated trachea. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 2001 110: 333-45.

30-Amobi NIB, Sugden D, Smith ICH. Pharmacomechanical coupling in rat vas deferens: Effects of agents that modulate intracellular release of calcium and protein kinase C activation. Life Sci 1999 65: 145-56.

31-Matsuki N, Higo K, Saito H, Nakazawa K. Regional differences in sympathetic neurotransmitter and Ca^{2+} channel-mediated responses in rat vas deferens. Gen Pharmacol 1996 27: 689-93.

Archive of SID

www.SID.ir

32-Nagao T, Fujita A, Takeuchi T, Hata F. Change in neuronal contribution to contractility responses of vas deferens of young and adult guinea pigs. J Auton Nerv Sys 1994 50: 87-92.

33-Sneddon P, Machaly M. Regional variation in purinergic and adrenergic responses in isolated vas deferens of rat, rabbit and guinea-pig. J Aut Pharmacol 1992 12: 421-8.

34-Bolton TB. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Physiol Rev 1979 59: 606–718.

35-Spedding M, Paoletti R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. Pharmacol Rev 1992 44: 363–76.

36-Hay DW, Wadsworth RM. Effects of some organic calcium antagonists and other procedures affecting the Ca^{2+} translocation on KCl-induced contractions in the rat vas deferens. Br J Pharmacol 1982 76: 103–13.

37-Khoyi MA, Westfall DP, Buxton ILO, Akhtar-Kahavari F, Rezaei E, Salaices M, et al. Norepinephrine and potassium induced calcium translocation in rat vas deferens. J Pharmacol Exp Ther 1988 246: 917–23.

38-Godfraind T, Miller R, Wibo M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. Pharmacol Rev 1986 38: 321–416.

Archive of SID

www.SID.ir