اثرات شل‌کنندگی تیموکینون، ماده مؤثره سیاه‌دانه (*Nigella sativa*)، بر عضلات اسکلتی

سیاوش پرورده[1*]، مهسا مقیمی[2]

۱- استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- دانشجوی دکتری فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
*آدرس مکاتبه: تهران، ولنجک، بلوار دانشگاه، خیابان کودکیار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، طبقه پنجم، گروه فارماکولوژی، تلفن و نمابر: ۲۲٤۳۹۹٦۹ (۰۲۱)
پست الکترونیک: parvardehs@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/٤/۱۰ **تاریخ تصویب:** ۹۳/۹/۱۲

چکیده

مقدمه: مطالعات انجام شده روی سیاه‌دانه (*Nigella sativa*) نشان می‌دهد که این گیاه دارای اثرات فارماکولوژیک متعددی است که از آن جمله می‌توان به اثرات آرامبخشی، کاهش فعالیت حرکتی و شلی عضلانی اشاره کرد. از آنجا که تیموکینون، مهم‌ترین ماده‌ی مؤثره‌ی موجود در سیاه‌دانه می‌باشد، این فرضیه مطرح می‌شود که اثرات مهاری سیاهدانه بر سیستم حرکتی - عضلانی، ناشی از تیموکینون باشد.

هدف: در این تحقیق، اثر تیموکینون بر انقباضات عضله‌ی اسکلتی در مدل‌های آزمایشگاهی، بررسی شده است.

روش بررسی: ابتدا بافت عصب - عضله‌ی اسکلتی، از گردن جوجه جدا و در حمام بافتی قرار گرفت. سپس، با انجام آزمایش‌های ثبت کششی، تأثیر تیموکینون بر انقباضات عضله‌ی اسکلتی ناشی از به کارگیری استیل‌کولین، پتاسیم کلراید و تحریک الکتریکی، ارزیابی شد. همچنین، در مطالعات رفتاری شامل **traction test** و **rotarod**، ابتدا دوزهای مختلف تیموکینون به صورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق و سپس توانایی حیوانات در بالا رفتن از میله‌ی بارفیکس و همچنین حفظ تعادل حرکتی بر روی میله‌ی گردان، بررسی شد.

نتایج: تیموکینون (٤۰، ۸۰ و۱۰۰ میکرومولار) توانست پاسخ‌های انقباضی ایجاد شده توسط استیل‌کولین (۱۰۰ میکرومولار) و تحریک الکتریکی را مهار کند. این درحالی است که تیموکینون نتوانست تغییری در انقباضات برانگیخته در عضله‌ی اسکلتی توسط پتاسیم کلراید (۸۰ میلی‌مولار) ایجاد کند. در آزمون **traction test** در موش، تیموکینون با دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در آزمون **rotarod** با دوزهای ۸۰ و ٤۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست مدت زمان ماندگاری حیوانات بر روی میله‌ی بارفیکس و میله‌ی گردان را به طور معنی‌داری کاهش دهد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که تیموکینون قادر است به عنوان یک شل‌کننده‌ی عضلانی عمل کرده و اسپاسم‌های ایجاد شده در عضلات اسکلتی را مهار کند.

گل‌واژگان: استیل‌کولین، تیموکینون، ثبت کششی، سیاه‌دانه، شلی عضلانی

www.SID.ir

مقدمه

داروهای شل‌کننده‌ی عضلانی و عوامل ضداسپاسم، داروهایی هستند که به منظور پیشگیری و درمان انقباض‌ها و اسپاسم‌های عضلات اسکلتی، در شرایط مختلفی نظیر اعمال جراحی، اسپاسم‌های عضلانی ناشی از ضایعات عصبی و نخاعی و همچنین رفع توییچ‌های عضلات اسکلتی، مورد استفاده قرار می‌گیرند. داروهایی نظیر دیازپام و باکلوفن، با مکانیسم مرکزی و از طریق تقویت اینترنورون‌های گابارژیک در مسیرهای حرکتی سیستم اعصاب مرکزی، اثرات خود را اعمال می‌کنند. شل‌کننده‌های دپلاریزان و غیردپلاریزان نیز با مهار روند انقباضی در پایانه‌ی عصب – عضله، به عنوان شل‌کننده‌های عضلانی در حین اعمال جراحی و سایر اقدامات پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. شل‌کننده‌های عضلانی و داروهای ضد اسپاسم، علی‌رغم کاربرد وسیعی که در پزشکی و درمان بیماری‌ها دارند، دارای عوارض جانبی متعددی بوده که ممکن است موجب محدودیت در مصرف این داروها شود. به عنوان مثال، خواب آلودگی، فراموشی و وابستگی، از جمله عوارض دیازپام و سایر داروهای بنزودیازپینی است که ممکن است موجب محدودیت در مصرف این داروها به عنوان عوامل ضداسپاسم، در درمان مشکلات عضلانی – حرکتی بیماران مبتلا به آسیب‌های مغزی و نخاعی شود [۱]. به همین دلیل، تحقیق و پژوهش به منظور دستیابی به داروهای شل‌کننده‌ی عضلانی و ضداسپاسم با اثربخشی بهتر و عوارض کمتر، همچنان در حال انجام است. گیاهان دارویی، یکی از مهم‌ترین منابع تحقیقاتی در همین ارتباط هستند. گزارش‌های متعددی تاکنون از اثرات شل‌کنندگی عصاره یا اسانس گیاهان دارویی بر عضلات اسکلتی منتشر شده است [٤ – ۲]. این در حالی است که اثرات شل‌کنندگی مواد مؤثره‌ی موجود در گیاهان دارویی بر عضلات اسکلتی، کمتر مورد بررسی قرار گرفته است [٤]. در مطالعه‌ی حاضر، اثرات شل‌کنندگی تیموکینون به عنوان مهم‌ترین ماده‌ی مؤثره موجود در دانه‌های سیاهدانه، مورد بررسی قرار گرفته است.

سیاه‌دانه (*Nigella sativa*) گیاهی است از خانواده‌ی آلاله (Ranunculaceae) که در طب سنتی در درمان بیماری‌های مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه بومی مناطق حاشیه‌ی دریای مدیترانه، جنوب غربی آسیا، جنوب اروپا و شمال آفریقا می‌باشد ولی در سایر کشورها نظیر هند، پاکستان و مناطق مختلف ایران نیز به فراوانی یافت می‌شود. سیاه‌دانه گیاهی است یک‌ساله، که تا ارتفاع ۹۰ – ۲۰ سانتی‌متر رشد می‌کند و دارای برگ‌های حاوی برگچه‌های کوچک منقسم و باریک می‌باشد. گل‌های سیاه‌دانه دارای ۵ تا ۱۰ گلبرگ بوده و به رنگ سفید، زرد، صورتی، آبی روشن یا بنفش روشن دیده می‌شود. میوه‌های گیاه به شکل کپسول بوده و حاوی تعداد بسیار زیادی دانه می‌باشد که درون فولیکول‌های متعددی (۳ تا ۷ فولیکول) جای گرفته‌اند [٦، ۵].

سیاه‌دانه گیاهی است که علاوه‌بر مصارف خوراکی به عنوان ادویه و چاشنی، در طب سنتی در درمان بیماری‌های مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرد که از آن جمله می‌توان به بیماری‌های گوارشی و تنفسی اشاره کرد [٦، ۵]. مطالعات فارماکولوژیک نشان می‌دهند سیاه‌دانه دارای اثرات ضددردی و ضدالتهابی [۹ – ۷]، ضدمیکروبی [١٤ – ١٠]، ضدسرطانی [١٥]، پایین‌آورندگی قندخون [١٧، ١٦] آنتی‌اکسیدانت [١٨]، دیورتیک و پایین‌آورندگی فشار خون [٢٠، ١٩] می‌باشد. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که بسیاری از خواص درمانی سیاه‌دانه، مربوط به تیموکینون، مهم‌ترین ماده‌ی مؤثره موجود در اسانس دانه‌های این گیاه می‌باشد. تیموکینون، فراوان‌ترین آلکالوئید موجود در اسانس سیاه‌دانه، یک ترکیب کینونی فعالی است که اثرات فارماکولوژیک متعددی تاکنون برای آن شناخته شده است [٢٢، ٢١]. از جمله مهم‌ترین اثرات تیموکینون، می‌توان به اثرات ضدایسکمی [٢٣]، ضدتشنجی [٢٦ – ٢٤]، ضددردی [٢٧]، ضدالتهابی [٢٩، ٢٨]، ضدسرطانی [٣٣ – ٣٠] و شل‌کنندگی عضلات صاف [٣٥، ٣٤]، اشاره کرد.

در برخی مطالعات نشان داده شده است که اسانس سیاه‌دانه دارای اثرات تضعیفی بر سیستم حرکتی بوده به نحوی که موجب کاهش فعالیت حرکتی و افزایش بی‌تحرکی و سکون در موش می‌شود. پیشنهاد شده است که این اثرات اسانس سیاه‌دانه، با مکانیسم مرکزی از طریق تقویت سیستم گابارژیک و همچنین شلی عضلانی، اعمال می‌شود [٣٦، ٦، ۵]. از آنجا

Archive of SID
www.SID.ir

که تیموکینون مهم‌ترین و فراوان‌ترین ماده مؤثره موجود در اسانس سیاه‌دانه می‌باشد، این فرضیه مطرح می‌شود که اثرات مشاهده شده از سیاه‌دانه بر سیستم حرکتی و عضلانی، ناشی از عملکرد تیموکینون باشد. این درحالی است که تاکنون اثرات تیموکینون بر فعالیت عضلات اسکلتی، مورد مطالعه قرار نگرفته و امکان استفاده از این ماده‌ی مؤثره‌ی گیاهی به عنوان شل‌کننده‌ی عضلانی به منظور رفع اسپاسم‌های عضلات اسکلتی، مطرح نشده است. بر همین اساس در مطالعه‌ی حاضر، به بررسی اثرات تیموکینون بر انقباضات عضلات اسکلتی پرداخته و با انجام آزمایش‌های برون‌تنی به روش ثبت کششی (Tension Recording) بر عضله‌ی اسکلتی و همچنین مطالعات رفتاری در حیوانات آزمایشگاهی، تأثیر تیموکینون را بر انقباضات طبیعی و اسپاسم‌های برانگیخته در عضلات اسکلتی، مورد ارزیابی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

حیوان

در این مطالعه، برای انجام آزمایش‌های ثبت کششی بر روی عضله‌ی اسکلتی، از بافت عصب – عضله‌ی جدا شده از گردن جوجه (Chick Biventer Cervicis; CBC) استفاده شد. برای این منظور، از جوجه‌های ۳ روزه جهت تهیه‌ی بافت ایزوله، استفاده شد. همچنین به منظور بررسی تأثیر تیموکینون بر تونیسیته‌ی طبیعی عضلات اسکلتی، از روش‌های آزمایشگاهی درون‌تنی با استفاده از موش‌های سوری نر با محدوده وزنی ۲۵ – ۲۰ گرم استفاده شد. این حیوانات در شرایط سیکل روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته در دمای ۲ ± ۲۱ درجه سانتی‌گراد و با دسترسی آزاد به آب و غذا، نگهداری می‌شدند. کلیه آزمایش‌های رفتاری در زمان روشنایی، بین ساعات ۸ صبح الی ۱۲ ظهر، به منظور جلوگیری از تأثیر ریتم شبانه‌روزی حیوان بر آزمایش‌ها، انجام گرفت. حیوانات یک ساعت قبل از شروع آزمایش‌ها به آزمایشگاه منتقل می‌شدند تا با شرایط آزمایشگاه خو بگیرند.

داروها و محلول‌ها

تیموکینون و استیل‌کولین (ACh) از شرکت Sigma و دیازپام از شرکت کیمیدارو خریداری شدند. توین ۸۰ (Tween-80) و سایر مواد شیمیایی جهت تهیه‌ی محلول کربس، از شرکت Merck تهیه شدند. کلیه‌ی داروها در آب مقطر حل شدند. فقط در مورد تیموکینون به منظور انحلال بهتر، از توین ۸۰ به عنوان کمک حلال استفاده شد (حداکثر ۰/۸ درصد از حجم نهایی محلول). مبنای انتخاب دوز، مطالعات انجام شده قبلی بر روی تیموکینون بوده است [۳۵، ۳٤، ۲٦، ۲۳]. در آزمایش‌های درون‌تنی، کلیه‌ی تزریقات به صورت داخل صفاقی بوده و در صورت تزریق بیش از یک دارو، محل‌های جداگانه‌ای در سطح شکمی حیوان در نظر گرفته می‌شد. لازم به ذکر است تمامی داروها و محلول‌ها، به صورت تازه تهیه شده و حجم تزریق در مطالعات درون‌تنی، برابر با ۰/۱ میلی‌لیتر بود. همچنین در آزمایش‌های ثبت کششی، حداکثر حجم مورد استفاده از داروها در محفظه‌ی بافتی، ۰/۵ میلی‌لیتر بود. ترکیب شیمیایی محلول کربس در آزمایش‌های ثبت کششی بر اساس غلظت (میلی‌مولار) عبارت بود از: NaCl (۱۱۸/٤)، KCl (٤/۷)، $MgSO_4.7H_2O$ (۱/٤)، KH_2PO_4 (۱/۲)، $CaCl_2$ (۲/۵)، $NaHCO_3$ (۲۵) و Glucose (۱۱/۱).

آماده‌سازی بافت عصب – عضله‌ی جدا شده از گردن جوجه

به منظور تهیه‌ی بافت عصب – عضله جدا شده، از عضله‌ی اسکلتی CBC استفاده شد. عضلهٔ CBC شامل هر دو نوع فیبر عضلانی آهسته و سریع منقبض شونده می‌باشد. انقباضات این بافت در پاسخ به تحریک الکتریکی اعصاب حرکتی، مشابه با انقباضات عضله‌ی دیافراگم موش به تحریک عصب فرنیک می‌باشد. در عین حال، عضله‌ی دو بطنی گردنی جوجه به علت دارا بودن فیبرهای آهسته منقبض شونده، در پاسخ به ACh و KCl، انقباضات آهسته‌ای دارد. تحریک الکتریکی عضله از طریق تاندون، موجب انقباض عضله‌ی

Archive of SID
www.SID.ir

اسکلتی خواهد شد. بنابراین عضله‌ی دو بطنی جدا شدهٔ گردن جوجه را می‌توان هم برای آزمایش‌های فعالیت مهاری عصب- عضله (که با کاهش انقباض ناشی از تحریک عصبی مشخص می‌شود) به کار برد و هم می‌توان به جهت مطالعه‌ی فعالیت دپلاریزسیون (که با کوتاه شدن مشخص عضله آشکار می‌گردد) مورد استفاده قرار داد. همچنین بافت مذکور این امکان را فراهم می‌سازد که عوامل مهارکننده‌ی عصب- عضله از نوع دپلاریزان را از مهارکننده‌های غیر دپلاریزان متمایز ساخت [۳۹ - ۳۷].

برای جدا کردن بافت عصب- عضله، ابتدا حیوان با استفاده از کلروفرم بیهوش و پس از پاک کردن پرهای ناحیه‌ی پشت سر، یک شکاف طولی در ناحیه‌ی خلفی گردن ایجاد و پوست باز شد. پس از کنار زدن لایه‌های زیر پوست، یک برش طولی در غشای نازک احاطه‌کننده‌ی عضله ایجاد و به این ترتیب بافت عصب- عضله، نمایان شد. سپس بافت عصب- عضله، از دو انتهای آن جدا و بلافاصله در داخل محلول کربس گرم (۳۳ درجه‌ی سانتی‌گراد) و اکسیژنه (۹۵ درصد اکسیژن و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن) به مدت ۱ ساعت تحت فشار ۰/۵ گرم در داخل محفظه‌ی بافتی به حجم ۵۰ میلی‌لیتر قرار داده شد [۳۷].

پاسخ انقباضی عضله‌ی اسکلتی CBC به تحریک الکتریکی

تحریک الکتریکی غیرمستقیم عضله اسکلتی، با استفاده از دستگاه تحریک‌کننده (Stimulator, Grass S88) و از طریق یک الکترود حلقوی که بر روی عصب حرکتی منتهی به بافت قرار داده شده بود، اعمال شد. این تحریک به صورت تکرار شونده (train) و با فرکانس ۰/۱ Hz، به مدت ۰/۲ میلی‌ثانیه و با شدت ۷ ولت اعمال شد. هر تحریک الکتریکی بر روی عصب، موجب یک انقباض سریع در عضله اسکلتی می‌شود که پس از تقویت توسط دستگاه amplifier، به صورت یک پاسخ نیزه‌ای (Spike) در دستگاه فیزیوگراف ثبت می‌شود. 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 بودهٔ آغاز شد. علاوه بر ثبت انقباضات عضله ناشی از تحریک الکتریکی عصب، پاسخ‌های انقباضی عضله ناشی از تحریک الکتریکی خود عضله اسکلتی نیز ثبت شد. برای این منظور، یک تحریک تکرار شونده با فرکانس ۱ Hz، به مدت ۲ میلی‌ثانیه و شدت ۳۰ ولت با استفاده از الکترود حلقوی که این بار بر روی خود عضله‌ی اسکلتی قرار گرفته بود، اعمال شد. هر تحریک الکتریکی بر روی عضله، یک انقباض آهسته‌تر در مقایسه با انقباض ناشی از تحریک عصب، در عضله‌ی اسکلتی ایجاد می‌کند [۳۸، ۳۷]. پس از ثبت پاسخ‌های کنترل، تیموکینون با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ٤٠، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۳۰ دقیقه بر روی بافت عصب - عضله پرفیوز شد و پس از آن، کار ثبت پاسخ‌های انقباضی به تحریکات الکتریکی، آغاز شد.

پاسخ انقباضی عضله‌ی اسکلتی CBC به ACh

در این بخش، اثر تیموکینون بر پاسخ‌های انقباضی عضله‌ی گردن جوجه به ACh به عنوان نوروترانسمیتر اختصاصی گیرنده‌های نیکوتینی عضلات اسکلتی، مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که فعالیت انقباضی عضله در پاسخ به ACh (۱۰۰ میکرومولار) به تنهایی یا در حضور تیموکینون ثبت شد. ACh با تحریک گیرنده‌های نیکوتینی در جایگاه پس‌سیناپسی عضله‌ی اسکلتی، موجب انقباض عضله می‌شود. تیموکینون با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ٤٠، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار، نیم ساعت قبل از ACh به محفظه‌ی بافتی اضافه شد.

پاسخ انقباضی عضله‌ی اسکلتی CBC به KCl

در این آزمایش، KCl (۸۰ میلی‌مولار) به منظور دپلاریزه کردن غشای عصب و برانگیختن انقباض در سلول‌های عضله‌ی اسکلتی، مورد استفاده قرار گرفت. KCl باعث ایجاد یک انقباض قوی با ارتفاع و دامنه‌ی بزرگ، در عضله اسکلتی می‌شود. تیموکینون با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ٤٠، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار، نیم ساعت قبل از KCl، به محفظه‌ی بافتی اضافه شد.

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی شلی عضلانی در موش به روش Traction test

در این بخش از مطالعه، به منظور بررسی اثر شلی عضلانی تیموکینون به صورت درون‌تنی، از آزمون گرفتن میله بارفیکس (Traction Test یا Grip Strength) استفاده شد. در این آزمایش، یک میله‌ی فلزی محکم به قطر ۰/۵ و طول ۴۰ سانتی‌متر که به صورت افقی از دو طرف بر روی دو پایه به ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار داشت، مورد استفاده قرار گرفت. در این آزمایش، موش‌ها از طریق پاها به میله آویزان شده و رفتار حرکتی حیوان به شکل بالا رفتن و تلاش برای گرفتن میله با دست‌ها، مورد ارزیابی قرار گرفت. در صورتی که حیوان ظرف مدت ۵ ثانیه، خود را بالا کشیده و میله را با دست‌ها بگیرد، فعالیت عضلانی حیوان، طبیعی محسوب می‌شود. ولی در صورت عدم توانایی در گرفتن میله با دست و یا سقوط از میله، رأی به شلی عضلانی حیوان داده می‌شود. به منظور همگون‌سازی نمونه‌ها و پیش از شروع آزمایش، ابتدا موش‌ها بر روی میله قرار گرفته و فقط حیواناتی که ظرف مدت ۵ ثانیه قادر به گرفتن میله با دست بودند، وارد آزمایش شدند [۴۰]. در گروه درمان، حیوانات ابتدا تحت تجویز دوزهای مختلف تیموکینون (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) قرار گرفته و پس از ۶۰ دقیقه، آزمون گرفتن میله انجام گرفت. همچنین در گروه کنترل، ابتدا نرمال سالین + توین ۸۰ به عنوان کنترل منفی و دیازپام (۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به عنوان کنترل مثبت به حیوانات تجویز و پس از ۳۰ دقیقه، آزمون میله بارفیکس بر روی حیوانات انجام گرفت.

بررسی فعالیت حرکتی و تعادلی موش در آزمایش Rotarod

در این روش، حیوانات به مدت ۵ دقیقه بر روی یک میله‌ی گردان (Rotarod 3375, TSE system) با سرعت اولیه ۱۰ و سرعت نهایی ۲۰ دور در دقیقه (افزایش سرعت طی ۲۰ ثانیه) قرار گرفته و فقط حیواناتی که قادر بودند در تمام مدت ۵ دقیقه روی میله گردان باقی بمانند، برای آزمون اصلی انتخاب شدند. در روز بعد (آزمون اصلی)، دوزهای مختلف تیموکینون (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۶۰ دقیقه قبل از شروع آزمون)، دیازپام (۰/۱۲۵، ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمون) و نرمال سالین + توین ۸۰ به عنوان کنترل منفی (۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمون)، به صورت داخل صفاقی، به حیوانات تزریق شد. سپس مدت زمان باقی ماندن حیوانات بر روی میله‌ی گردان طی دو مرحله (آزمون اول و دوم با فاصله زمانی ۳۰ دقیقه) پس از تزریق داروها، اندازه‌گیری شد [۴۰].

تجزیه و تحلیل آماری

در آزمایش‌های ثبت کششی، پاسخ‌های انقباضی ثبت شده بر حسب گرم، پس از تبدیل به واحد نیرو (نیوتن)، به صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین (S.E.M.) برای حداقل چهار حیوان در هر گروه آزمایش، گزارش شد. سپس به منظور بررسی وجود اختلاف بین پاسخ‌های کنترل و درمان، از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد. فقط در آزمایش traction test، از تست دقیق فیشر به منظور مقایسه نتایج بین گروه‌ها، استفاده شد. نتایجی که دارای ارزش P کوچک‌تر از ۰/۰۵ بود، به عنوان نتایج معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

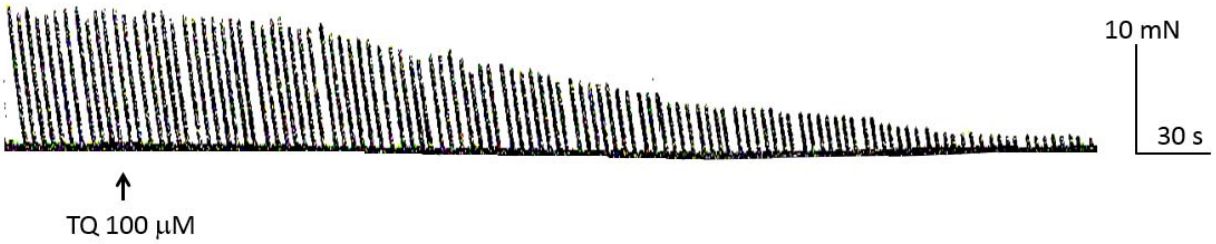
اثر تیموکینون بر پاسخ‌های انقباضی عضله‌ی اسکلتی CBC به تحریک الکتریکی

تحریک الکتریکی عضله‌ی اسکلتی CBC، موجب برانگیختن پاسخ‌های انقباضی به ارتفاع ۱/۷ ± ۱۱/۳ میلی‌نیوتن در عضله شد که به عنوان پاسخ پایه (کنترل) ثبت شد (شکل شماره ۱). افزودن تیموکینون با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکرومولار به محفظه‌ی بافتی، تغییر معنی‌داری در ارتفاع پاسخ‌ها ایجاد نکرد (جدول شماره ۱). اما غلظت‌های بیشتر تیموکینون (۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار)، ارتفاع پاسخ‌های انقباضی را به طور معنی‌داری کاهش داد به طوری که با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، پس از ۶ دقیقه، انقباضات ناشی از تحریک الکتریکی عضله‌ی اسکلتی به طور کامل مهار شد و ارتفاع پاسخ‌ها را به صفر رسید (شکل شماره ۱، جدول شماره ۱). این اثر مهاری تیموکینون بر انقباضات ناشی از تحریکی الکتریکی عضله، به طور نسبی

www.SID.ir

برگشت‌پذیر بوده به طوری‌که پس از ۱۲۰ دقیقه شست و شو با محلول کربس، تنها ۱۰ درصد پاسخ انقباضی به تحریک الکتریکی برگشت پیدا کرد.

تحریک الکتریکی عصب حرکتی منتهی به عضله در بافت عصب- عضله‌ی جدا شده، موجب برانگیختن پاسخ‌های انقباضی به ارتفاع ۱/۵±۱۰/۲ میلی‌نیوتن در عضله اسکلتی شد که به عنوان پاسخ پایه (کنترل) ثبت شد (شکل شماره ۲). افزودن تیموکینون با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکرومولار، نتوانست ارتفاع پاسخ‌های انقباضی را به طور معنی‌دار کاهش دهد (جدول شماره ۱). اما غلظت‌های بیشتر تیموکینون (۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار) ارتفاع پاسخ‌های انقباضی عضله

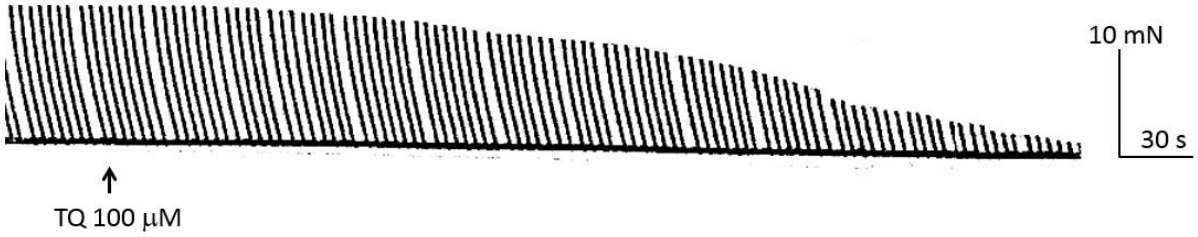


شکل شماره ۱- اثر تیموکینون (TQ) بر پاسخ‌های انقباضی عضله اسکلتی گردن جوجه به تحریک الکتریکی عضله. تیموکینون توانست پاسخ‌های انقباضی عضله اسکلتی به تحریک الکتریکی خود عضله را پس از ۳۰ دقیقه به طور کامل مهار کند.

جدول شماره ۱- اثر تیموکینون بر انقباضات ایجاد شده توسط ACh، KCl و تحریک الکتریکی در عضله اسکلتی گردن جوجه.

دارو	شدت انقباض عضله در پاسخ به تحریک الکتریکی عضله اسکلتی	شدت انقباض عضله در پاسخ به تحریک الکتریکی عصب حرکتی	شدت انقباض عضله در پاسخ به ACh (۱۰۰ µM)	شدت انقباض عضله در پاسخ به KCl (۸۰ mM)
کنترل	۱۱/۳ ± ۱/۷	۱۰/۲ ± ۱/۵	۱۵/٤ ± ۱/۳	۱۸/۲ ± ۱/٦
تیموکینون (۱۰ µM)	۱۰/۵ ± ۱/۳	۹/۷ ± ۱/۲	۱۳/۹ ± ۰/۸	۱۸/۵ ± ۱/۸
تیموکینون (۲۰ µM)	۹/۵ ± ۲/۱	۹/۱ ± ۱/٤	۱۲/۵ ± ۱/۷	۱۸/۷ ± ۱/۳
تیموکینون (٤۰ µM)	۷/۸ ± ۱/۷*	٦/۹ ± ۱/۵**	۸/۹ ± ۱/۳*	۱۸/٦ ± ۱/۹
تیموکینون (۸۰ µM)	۲/۹ ± ۱/۵***	۳/۲ ± ۱/۱***	۵/۱ ± ۱/۵***	۱۸/۸ ± ۲/۱
تیموکینون (۱۰۰ µM)	۰ ± ۰***	۰ ± ۰***	۳/۵ ± ۰/۲***	۱۹/۰ ± ۱/۷

تیموکینون ۳۰ دقیقه قبل از به‌کارگیری ACh، KCl و یا تحریک الکتریکی، به محفظه بافتی اضافه می‌شد. نتایج به صورت میانگین ± S.E.M. برای حداقل چهار بافت گزارش شده‌اند. شدت انقباض عضله اسکلتی بر حسب میلی نیوتن بیان شده است. p<۰/۰۵*، p<۰/۰۱**، p<۰/۰۰۱***.



شکل شماره ۲- اثر تیموکینون (TQ) بر پاسخ‌های انقباضی عضله اسکلتی گردن جوجه به تحریک الکتریکی عصب حرکتی. انکوباسیون عضله با تیموکینون، موجب مهار کامل پاسخ‌های انقباضی عضله اسکلتی پس از ٦ دقیقه شد.

Archive of SID
www.SID.ir

اسکلتی را به طور معنی‌داری کاهش داد به نحوی که با غلظت ۱۰۰ میکرومولار پس از ٦ دقیقه، انقباضات ناشی از تحریک الکتریکی عضله‌ی اسکلتی به طور کامل مهار شد و به صفر رسید (شکل شماره ۲، جدول شماره ۱). در اینجا نیز اثر مهاری تیموکینون بر انقباضات عضله ناشی از تحریکی الکتریکی عصب، پس از ۱۲۰ دقیقه شست و شو با محلول کربس، فقط به اندازه ۱۰ درصد برگشت پیدا کرد.

اثر تیموکینون بر پاسخ انقباضی عضله CBC به ACh

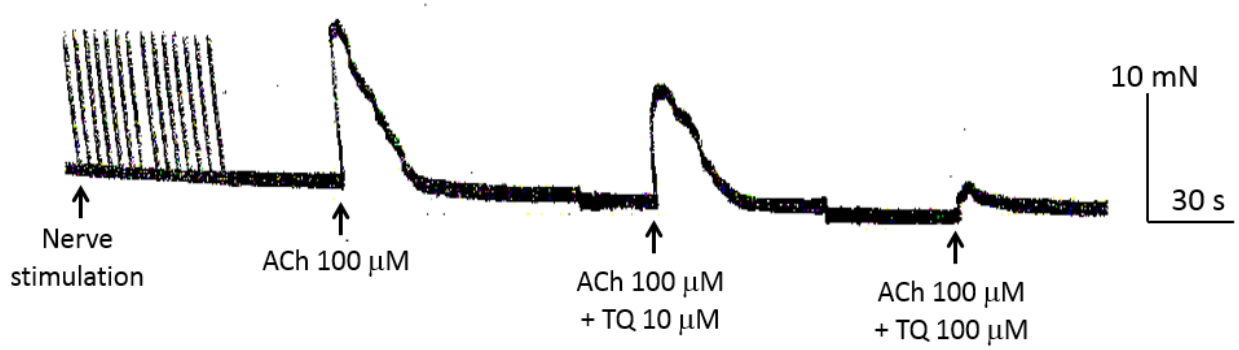
در این آزمایش، ACh با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، باعث ایجاد انقباض در عضله اسکلتی به میزان ۱/۳ ± ۱۵/٤ میلی‌نیوتن شد که به عنوان پاسخ پایه (کنترل) ثبت شد. تیموکینون با غلظت‌های ٤۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار توانست ارتفاع پاسخ‌های انقباضی ایجاد شده توسط ACh را به طور معنی‌داری کاهش دهد. این در حالی است که غلظت‌های کمتر تیموکینون (۱۰ و ۲۰ میکرومولار) نتوانست موجب کاهش معنی‌داری در پاسخ‌های انقباضی شود (شکل شماره ۳، جدول شماره ۱). اثر مهاری تیموکینون بر پاسخ‌های انقباضی ACh پس از ۱۲۰ دقیقه شست و شو با محلول کربس به میزان ۳۰ درصد برگشت پیدا کرد.

اثر تیموکینون بر پاسخ انقباضی عضله CBC به KCl

در این آزمایش، KCl (۸۰ میلی‌مولار) به عنوان یک عامل دپلاریزه کننده‌ی غشای عصب و عضله، موجب برانگیختن یک پاسخ انقباضی به ارتفاع ۱/٦ ± ۱۸/۲ میلی‌نیوتن در عضله‌ی اسکلتی شد که به عنوان پاسخ کنترل ثبت شد. اما افزودن غلظت‌های مختلف تیموکینون (۱۰۰ – ۱۰ میکرومولار) به محفظه بافتی، نتوانست ارتفاع انقباض‌های عضله‌ی اسکلتی در پاسخ به KCl را به طور معنی‌داری کاهش دهد (شکل شماره ٤، جدول شماره ۱).

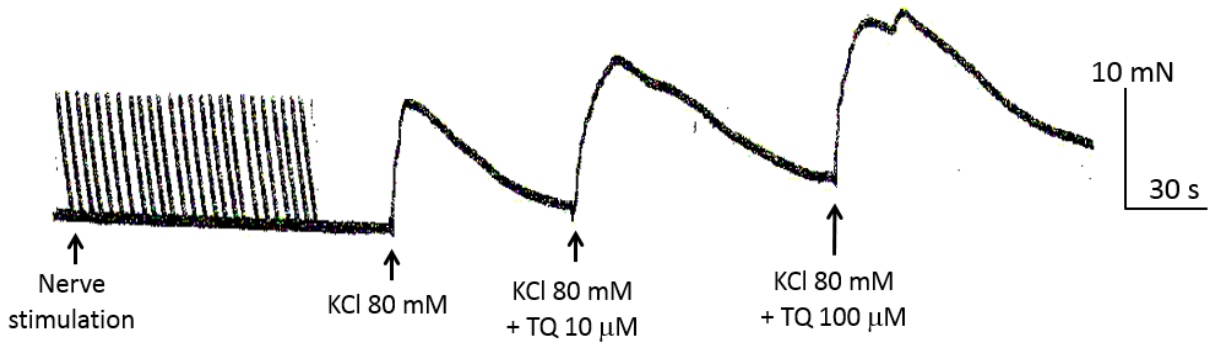
آزمون شلی عضلانی در موش (Traction test)

در این آزمایش، تجویز تیموکینون با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، اثر شلی عضلانی نداشته به نحوی که هیچ‌یک از موش‌ها در مدت ۵ ثانیه، میله را رها نکرده و توانستند با بالا کشیدن خود، میله را با دست خود بگیرند. این در حالی است که تجویز تیموکینون با دوزهای ٤۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به ترتیب در ۱۰ و ٦۰ درصد حیوانات، باعث ایجاد شلی عضلانی شد به نحوی که حیوانات قادر به گرفتن میله نبوده و در کمتر از ۵ ثانیه، از میله سقوط می‌کردند. اثر شلی عضلانی تیموکینون با دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل، از نظر آماری معنی‌دار بوده ($p<۰/۰۵$) و معادل اثر شلی عضلانی دیازپام با دوز ۰/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود (جدول شماره ۲). در این آزمایش، دیازپام به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت و توانست به صورت وابسته به دوز باعث ایجاد شلی عضلانی و سقوط حیوانات از میله بارفیکس شود. به این ترتیب که دوزهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیازپام به ترتیب باعث ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد سقوط حیوانات از میله شد (جدول شماره ۲).



شکل شماره ۳- اثر تیموکینون (TQ) بر پاسخ‌های انقباضی عضله اسکلتی گردن جوجه به ACh (۱۰۰ µM). تیموکینون نیم ساعت قبل از ACh به محفظه بافتی اضافه شد. تیموکینون با دوز ۱۰۰ µM توانست پاسخ‌های انقباضی عضله اسکلتی به ACh را مهار کند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل شماره ٤- اثر تیموکنیون (TQ) بر پاسخ‌های انقباضی عضله اسکلتی گردن جوجه به KCl (۸۰ mM). تیموکینون نیم ساعت قبل از KCl به محفظه بافتی اضافه شد. تیموکینون با دوزهای µM ۱۰۰-۱۰ نتوانست پاسخ‌های انقباضی عضله اسکلتی به KCl را مهار کند.

جدول شماره ۲- اثر شل‌کنندگی عضلانی تیموکینون در موش در آزمون Traction test

دارو	دوز (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	درصد عدم گرفتن میله
کنترل	۰/۱ میلی‌لیتر	۰
دیازپام	۰/۱۲۵	۰
	۰/۲۵	۵۰ *
	۰/۵	۱۰۰ ***
تیموکینون	۲۰	۰
	٤۰	۱۰
	۸۰	٦۰*

تیموکینون و دیازپام به ترتیب ٦۰ و ۳۰ دقیقه قبل از انجام آزمایش به موش‌ها تزریق شدند. کنترل: نرمال سالین + تویین ۸۰. نتایج به صورت درصد عدم گرفتن میله بیان شده‌اند. *p<۰/۰۵، ***p<۰/۰۰۱.

اثر تیموکینون بر تعادل حرکتی موش در آزمون Rotarod

در این آزمایش، ٦۰ دقیقه پس از تجویز تیموکینون با دوز ٤۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، زمان باقی ماندن موش‌ها روی میله گردان به طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۱). البته این اثر تیموکینون، پس از ۹۰ دقیقه (آزمون دوم) از بین رفت به طوری که هیچ اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل منفی نداشت (جدول شماره ۳). همچنین، تجویز تیموکینون با دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در هر دو آزمون اول و دوم، در مقایسه با گروه کنترل منفی، به طور معنی‌داری موجب کاهش زمان باقی ماندن موش‌ها بر روی میله گردان شد (p<۰/۰۰۱). لازم به ذکر است که تیموکینون با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تغییر معنی‌داری در مدت باقی ماندن حیوانات بر روی میله گردان ایجاد نکرد (جدول شماره ۳). در این آزمون، دیازپام به عنوان کنترل مثبت، با دوزهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، موجب کاهش معنی‌داری در مدت زمان باقی ماندن موش‌ها بر روی میله‌ی گردان شد (جدول شماره ۳).

بحث

نتایج به دست آمده در این مطالعه برای نخستین بار نشان داد که تیموکینون به عنوان یک شل‌کننده‌ی عضلات اسکلتی عمل کرده و قادر است انقباضات ایجاد شده در این عضلات را به طور کامل مهار کند.

در آزمایش‌های ثبت کششی بر روی عضله اسکلتی CBC، تأثیر تیموکینون بر پاسخ های انقباضی این عضلات به ACh، KCl و تحریک الکتریکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این آزمایش ها که به منظور ارزیابی اثرات تیموکینون بر انتقال پیام های عصبی در سیناپس عصب- عضله انجام گرفت، به

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۳- اثر تیموکینون بر تعادل حرکتی موش در آزمون Rotarod.

درمان	دوز (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	زمان باقیماندن موش‌ها بر روی میله گردان (ثانیه)	
		آزمون اول	آزمون دوم
کنترل	۰/۱ میلی‌لیتر	۳۰۰	۳۰۰
دیازپام	۰/۱۲۵	۲۵۲/۵ ± ۲۴/۱	۲۶۵/۸ ± ۲۸/۴
	۰/۲۵	۱۷۸ ± ۱۲/۸ **	۱۶۷ ± ۳۱/۲ **
	۰/۵	۳/۷ ± ۰/۴ ***	۵/۲ ± ۰/۸ ***
تیموکینون	۲۰	۲۷۶ ± ۲۳/۳	۲۷۱/۶ ± ۲۱/۵
	۴۰	۲۱۱/۲ ± ۲۷/۱ **	۲۴۰/۳ ± ۳۱/۷
	۸۰	۳۶/۳ ± ۸/۳ ***	۲۶/۷ ± ۴/۵ ***

تیموکینون و دیازپام به ترتیب ۶۰ و ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش به حیوانات تزریق شدند. آزمایش دوم، ۳۰ دقیقه پس از آزمایش اول انجام گرفته است. کنترل: نرمال سالین + توین ۸۰. نتایج به صورت میانگین ± S.E.M. برای ۱۰ موش گزارش شده‌اند. **p<۰/۰۱، ***p<۰/۰۰۱.

وضوح نشان داد که تیموکینون در پیوستگاه عصب- عضله، فعالیت مهاری داشته و قادر است پاسخ‌های انقباضی عضله CBC به ACh و تحریکات الکتریکی را مهار کند.

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آن است که اثر تیموکینون بر انقباضات ایجاد شده توسط ACh در عضله اسکلتی CBC، یک اثر مهاری است به نحوی که تیموکینون با غلظت ۱۰۰ میکرومولار قادر است پاسخ‌های انقباضی ایجاد شده توسط ACh را به میزان ۷۷ درصد کاهش دهد (جدول شماره ۱). از آنجا که انقباضات عضله‌ی اسکلتی در پاسخ به ACh، ناشی از تحریک گیرنده‌های نیکوتینی موجود در غشای عضله‌ی اسکلتی می‌باشد [۴۲، ۴۱]، بنابراین تیموکینون احتمالاً دارای اثرات مهاری بر گیرنده‌های نیکوتینی عضلات اسکلتی می‌باشد.

از سوی دیگر، در اسپاسم‌های عضلانی ایجاد شده در اثر تحریک الکتریکی عضله CBC، تیموکینون با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، توانست پاسخ‌های انقباضی عضله‌ی اسکلتی را به طور کامل مهار کند. این اثر مهاری تیموکینون بر انقباضات ناشی از تحریک الکتریکی عضله اسکلتی، در راستای اثر مهاری تیموکینون بر پاسخ‌های انقباضی عضله ناشی از به کارگیری ACh می‌باشد. زیرا تحریک الکتریکی عضله، با ایجاد دپلاریزاسیون در غشای عضله‌ی اسکلتی، در نهایت موجب فعال کردن گیرنده‌های نیکوتینی و باز شدن کانال‌های سدیمی این گیرنده و در نتیجه، آغاز روند انقباضی در عضلات اسکلتی می‌شود [۴۲، ۴۱].

همچنین، تیموکینون توانست انقباضات ایجاد شده در اثر تحریک الکتریکی عصب حرکتی در بافت عصب - عضله را به طور کامل مهار کند (شکل شماره ۲). لازم به توضیح است که تحریک الکتریکی عصب متصل به عضله، ابتدا موجب دپلاریزاسیون غشای پیش سیناپسی عصب و رهایش ACh از پایانه عصب سوماتیک شده و در ادامه، با تحریک گیرنده‌های نیکوتینی موجود در عضله توسط ACh، عضله‌ی اسکلتی منقبض می‌گردد [۴۲، ۴۱]. بر همین اساس و با توجه به اثرات مهاری تیموکینون بر انقباضات ایجاد شده در عضله ناشی از تحریک الکتریکی عصب، این فرضیه مطرح می‌شود که تیموکینون علاوه بر اثر مهاری بر گیرنده‌های نیکوتینی در عضله اسکلتی (مکانیسم پس‌سیناپسی)، احتمالاً بر روند دپلاریزاسیون عصب حرکتی و رهایش ACh از پایانه‌ی عصب (مکانیسم‌های پیش‌سیناپسی) نیز اثر مهاری دارد. در این صورت، تیموکینون باید بتواند انقباضات عضله اسکلتی ناشی از به کارگیری KCl را نیز مهار کند، زیرا غلظت‌های بالای KCl (۸۰ میلی‌مولار) با ایجاد دپلاریزاسیون در غشای عصب پیش‌سیناپسی، موجب افزایش آزادسازی ACh و در نهایت انقباض عضله‌ی اسکلتی می‌شود [۴۲، ۴۱]. ولی همان‌طور که در شکل شماره ۴ به وضوح دیده می‌شود، تیموکینون بر پاسخ‌های انقباضی ایجاد

Archive of SID
www.SID.ir

شده توسط KCl تأثیری نداشته و لذا فرض اثر مهاری تیموکینون بر دپلاریزاسیون عصب پیش سیناپسی، منتفی می‌شود.

در مجموع، نتایج مربوط به آزمایش‌های ثبت کششی بر روی عضله اسکلتی CBC نشان می‌دهد که تیموکینون دارای اثر شل‌کنندگی بر عضلات اسکلتی بوده و این اثر به احتمال زیاد، از طریق فعالیت مهاری بر گیرنده‌های نیکوتینی عضلات اسکلتی حاصل می‌شود. این نتایج، با یافته‌های حاصل از آزمایش‌های رفتاری مطابقت می‌کند. زیرا همان‌طور که در بخش نتایج عنوان شد، در آزمون میله‌ی بارفیکس، تیموکینون با دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست در ٦٠ درصد از حیوانات، موجب عدم توانایی در گرفتن میله‌ی بارفیکس شود (جدول شماره ۲). همچنین در آزمون rotarod، تیموکینون با همین دوز، توانست مدت زمان باقی ماندن موش‌ها بر روی میله گردان را به طور چشمگیری کاهش دهد (جدول شماره ۳) که احتمالاً بخشی از این اثرات، مربوط به کاهش تونیسیته‌ی طبیعی عضلات اسکلتی در حیوان، و یا به عبارت دیگر شلی عضلانی ایجاد شده توسط تیموکینون می‌باشد که با مکانیسم احتمالی مهار گیرنده‌های نیکوتینی در عضلات اسکلتی اعمال شده است.

البته نباید اثر شلی‌کنندگی عضلات اسکلتی با مکانیسم مرکزی را از نظر دور داشت. زیرا شواهدی در دست است که نشان می‌دهد تیموکینون با دوزهای ٤٠ و ٨٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم، دارای اثرات تحریکی بر گیرنده‌های بنزودیازپینی در مغز می‌باشد [٢٦، ٢٥]. از آنجا که آگونیست‌های گیرنده‌های بنزودیازپینی نظیر دیازپام، دارای اثرات شل‌کنندگی عضلات اسکلتی بوده و در درمان اسپاسم‌های مربوط به این عضلات استفاده می‌شوند [٤٣]، ممکن است دخالت این گیرنده‌ها در ایجاد اثر شلی عضلانی توسط تیموکینون، مطرح باشد. هر چند برای تأیید این موضوع لازم است آزمایش‌های تکمیلی انجام گیرد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که تیموکینون، مهم‌ترین ماده‌ی مؤثره‌ی موجود در سیاه‌دانه، دارای اثرات شل‌کنندگی بر عضلات اسکلتی بوده و این اثرات را احتمالاً از طریق مهار گیرنده‌های نیکوتینی استیل‌کولین در عضلات اسکلتی اعمال می‌کند. بر همین اساس، می‌توان تیموکینون را به عنوان یک داروی جدید جهت درمان اسپاسم عضلات اسکلتی، پیشنهاد و مطالعات بالینی و تکمیلی بر روی آن را طراحی نمود.

منابع

1. Katzung BG, Masters SB and Trevor AJ. Basic and Clinical Pharmacology. 12th ed. McGraw-Hill; 2012, p: 465 - 82.

2. Datté JY, Yapo PA, Kouamé-Koffi GG, Kati-Coulibaly S, Amoikon KE, Offoumou AM. Leaf extract of *Caesalpinia bonduc* Roxb. (Caesalpiniaceae) induces an increase of contractile force in rat skeletal muscle in situ. *Phytomedicine* 2004; 11 (2 – 3): 235 - 41.

3. Ma X, Iwanaka N, Masuda S, Karaike K, Egawa T, Hamada T and et al. Morus alba leaf extract stimulates 5′-AMP-activated protein kinase in isolated rat skeletal muscle. *J. Ethnopharmacol.* 2009; 122 (1): 54 - 9.

4. Lee KK, Omiya Y, Yuzurihara M, Kase Y and Kobayashi H. Antispasmodic effect of shakuyakukanzoto extract on experimental muscle cramps in vivo: Role of the active constituents of *Glycyrrhizae radix*. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 145 (1): 286 - 93.

5. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Alam Khan S, Najmi AK, Siddique NA, Damanhouri ZA and Anwar F. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2013; 3 (5): 337 - 52.

6. Butt MS and Sultan MT. *Nigella sativa*: reduces the risk of various maladies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2010; 50 (7): 654 - 65.

Archive of SID
www.SID.ir

7. Mutabagani A, El-Mahdy SAM. A study of the anti-inflammatory activity of *Nigella sativa* L. and thymoquinone in rats. Saudi. *Pharm. J.* 1997; 5 (2-3): 110 - 3.

8. Al-Ghamdi MS. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *J. Ethnopharmacol.* 2001; 76 (1): 45 - 8.

9. Hajhashemi V, Ghannadi A and Jafarabadi H. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and anti-inflammatory drug. *Phytother. Res.* 2004; 18 (3): 195 - 9.

10. Hanafy MSM and Hatem ME. Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J. Ethnopharmacol.* 1991; 34 (2 - 3): 275 - 8.

11. Ferdous AJ, Islam SN, Ahsan M, Hasan CM and Ahmed ZU. In vitro antibacterial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds against multiple drug-resistant isolates of *Shigella* spp. and isolates of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Phytother. Res.* 1992; 6 (3): 137 - 40.

12. El-Kamali HH, Ahmed A, Mohammed AS, Yahia AAM, El-Tayeb IH and Ali AA. Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds, *Cymbopogon citratus* leaves and *Pulicaria undulata* aerial parts. *Fitoterapia* 1998; 69 (1): 77 - 8.

13. Azad-Chowdhury AK, Islam MA, Rashid MA and Ferdous AJ. Therapeutic potential of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds in monkey model with experimental shigellosis. *Phytother. Res.* 1998; 12 (5): 361 - 3.

14. Morsi NM. Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta Microbiol. Pol.* 2000; 49 (1): 63 - 74.

15. Randhawa MA and Alghamdi MS. Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed) - A review. *Am. J. Chin. Med.* 2011; 39 (6): 1075 - 91.

16. Al-Hader A, Aqel M and Hasan Z. Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *Int. J. Pharmacogn.* 1993; 31 (2): 96 - 100.

17. Bamosa AO, Ali BA and Sowayan SA. Effect of oral ingestion of *Nigella sativa* seeds on some blood parameters. *Saudi. Pharm. J.* 1997; 5 (2-3): 126 - 9.

18. Burits M and Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essantial oil. *Phytother. Res.* 2000; 14 (5): 323 - 8.

19. 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 (5): 1123 - 31.

20. 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 (3): 379 - 82.

21. Kokoska L, Havlik J, Valterova I, Sovova H, Sajfrtova M and Jankovska I. Comparison of chemical composition and antibacterial activity of *Nigella sativa* seed essential oils obtained by different extraction methods. *J. Food Prot.* 2008; 71 (12): 2475 - 80.

22. D'Antuono LF, 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.

23. Hosseinzadeh H, Parvardeh S, Asl MN, Sadeghnia HR and Ziaee T. Effect of thymoquinone and *Nigella sativa* seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus. *Phytomedicine* 2007; 14: 621 - 7.

24. Akhondian J, Kianifar H, Raoofziaee M, Moayedpour A, Toosi MB, Khajedaluee M. The effect of thymoquinone on intractable pediatric seizures (pilot study). *Epilepsy Res.* 2011; 93 (1): 39 - 43.

25. Hosseinzadeh H, Parvardeh S, Nassiri-Asl M and Mansouri MT. Intra-cerebroventricular administration of thymoquinone, the major

Archive of SID
www.SID.ir

constituent of *Nigella sativa* seeds, suppresses epileptic seizures in rats. *Med. Sci. Monitor* 2005; 11: 106 - 10.

26. Hosseinzadeh H and Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine* 2004; 11: 56 - 64.

27. 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.

28. El-Dakhakhny M, Madi NJ, Lembert N and Ammon HP. *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *J. Ethnopharmacol.* 2002; 81: 161 - 4.

29. Marsik P, Kokoska L, Landa P, Nepovim A, Soudek P and Vanek T. In vitro inhibitory effects of thymol and quinones of *Nigella sativa* seeds on cyclooxygenase-1- and -2-catalyzed prostaglandin E2 biosyntheses. *Planta Med.* 2005; 71: 739 - 42.

30. Schneider-Stock R, Fakhoury IH, Zaki AM, El-Baba CO and Gali-Muhtasib HU. Thymoquinone: fifty years of success in the battle against cancer models. *Drug Discov. Today* 2014; 19 (1): 18 - 30.

31. Rajput S, Kumar BN, Dey KK, Pal I, Parekh A and Mandal M. Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G (1) arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells. *Life Sci.* 2013; 93 (21): 783 - 90.

32. Raghunandhakumar S, Paramasivam A, Senthilraja S, Naveenkumar C, Asokkumar S, Binuclara J, Jagan S, Anandakumar P and Devaki T. Thymoquinone inhibits cell proliferation through regulation of G1/S phase cell cycle transition in N-nitrosodiethylamine-induced experimental rat hepatocellular carcinoma. *Toxicol. Lett.* 2013; 223 (1): 60 - 72.

33. Ahmad I, Muneer KM, Tamimi IA, Chang ME, Ata MO and Yusuf N. Thymoquinone suppresses metastasis of melanoma cells by inhibition of NLRP3 inflammasome. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013; 270 (1): 70 - 6.

34. Parvardeh S and Fatehi M. Effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, on the contractile response of rat vas deferens. *Pharm. Biol.* 2003; 41: 616 - 21.

35. Parvardeh S, Fatehi M. Inhibitory effects of thymoquinone, the major component of *Nigella sativa* seeds, on spontaneous and evoked contractions of guinea pig isolated ileum. *J. Med. Plants* 2007; 6 (23): 25 - 35.

36. Khanna T, Zaidi FA, Dandiya PC. CNS and analgesic studies on *Nigella sativa*. *Fitoterapia* 1993; 64 (5): 407 - 10.

37. Ginsborg BL and Warriner J. The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. *Br. J. Pharmacol.* 1960; 15: 410 - 11.

38. Entrikin RK, Bryant SH. Electrophysiological properties of biventer cervicis muscle fibers of normal and roller pigeons. *J. Neurobiol.* 1975; 6 (2): 201 - 12.

39. Vatanpour H. Effects of black scorpion *Androctonus crasicuda* venom on striated muscle preparation in vitro. *Iran. J. Pharm. Res.* 2010; 17 - 22.

40. Vogel HG. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. 3rd ed. Berlin: Springer. 2008, p: 579 - 81.

41. Kandel ER and Schwartz JH. Principles of Neural Science. 5th ed. McGraw-Hill. 2013, p: 768 - 89.

42. Allen DG, Lamb GD and Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol. Rev.* 2008; 88: 287 - 332.

43. Alldredge BK, Corelli RL, Ernst ME, Guglielmo BJ, Jacobson PA, Kradjan WA and Williams BR. Koda-Kimble and Young's applied therapeutics: the clinical use of drugs. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2013, p: 126.

Archive of SID
www.SID.ir