

## اثر هم‌افزایی داروی مسدودکننده کلسیم (وراپامیل) و اسانس مرزه (*Satureja hortensis* L.) بر جلوگیری از انقباض کولینرژیک در ایلئوم موش سفید بزرگ آزمایشگاهی

سید حسن حجازیان<sup>۱\*</sup>، فاطمه صفری<sup>۲</sup> و محمد بامری<sup>۳</sup>

۱- نویسنده مسئول، استادیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران،

پست الکترونیکی: hejaziansh@yahoo.com

۲- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

۳- کارشناس ارشد، دانشکده پرديس بین‌الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۴

تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۳

### چکیده

وراپامیل با مهار کانال‌های کلسیمی نوع T فعال و غیرفعال از ورود کلسیم به داخل سلول‌ها جلوگیری می‌کند. با توجه به اینکه اثرات ضداسپاسمی مواد از طریق مهار کانال‌های کلسیمی اعمال می‌شود و اثر ضدانقباضی و کاهش فعالیت مکانیکی عضلات صاف ایلئوم توسط اسانس مرزه نشان داده شده است، مطالعه حاضر اثر هم‌افزایی کلسیم بلوکر وراپامیل و اسانس مرزه (*Satureja hortensis* L.) را بر جلوگیری از تحریک کولینرژیک ایلئوم موش سفید بزرگ آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده است. در این مطالعه با استفاده از دستگاه فیزیوگراف، اثر غلظت‌های مختلف اسانس مرزه و وراپامیل بر انقباضات ایزوتونیک ایجاد شده به وسیله استیل کولین<sup>۴</sup>-۱۰ مولار در ایلئوم مورد بررسی قرار گرفت و یافته‌ها نشان داد که هر دو ماده وراپامیل و اسانس مرزه بر انقباض ناشی از استیل کولین اثر مهارکنندگی داشته و همچنین غلظت‌های غیرمؤثره آنها نیز اثر هم‌افزایی در مهار انقباض داشته که از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

واژه‌های کلیدی: وراپامیل، اسانس مرزه (*Satureja hortensis* L.)، ضداسپاسمی، استیل کولین، ایلئوم، عضله صاف.

### مقدمه

از بار کاری قلب نیز کاسته می‌شود. بیش از ۹۰٪ دارو از راه خوراکی جذب می‌شود. به دلیل متابولیسم عبور اول از کبد، فراهمی زیستی آن ۳۵-۲۰ درصد است (Katzung et al., 2009). گیاه مرزه با نام علمی *Satureja hortensis* از تیره نعناع می‌باشد که در نواحی شمال غربی ایران، تبریز و نواحی مختلف خراسان می‌روید و دارای اثر نیرودهنده، تسهیل‌کننده عمل هضم و رفع اسهال و ضدکرم می‌باشد (Zargari, 2011). همچنین در رفع اسهال‌های عفونی و التهاب کولون

وراپامیل یک داروی مسدودکننده کانال کلسیمی می‌باشد که در بدن موجب جلوگیری از ورود کلسیم به داخل سلول‌ها می‌شود؛ به علت اثر مسدودکنندگی این دارو بر کانال‌های کلسیمی مقدار کلسیم در فیبرهای عضله قلب و عروق خونی کاهش می‌یابد که می‌تواند منجر به کاهش تعداد ضربان قلب و گشاد شدن عروق خونی گردد که در نتیجه آن فشار خون کاهش و جریان خون افزایش می‌یابد و

منابع طبیعی استان یزد به شماره (TARI-۵۸۴۱۶) قرار گرفته بود، در بالن تقطیر ریخته شد و بعد به آن، تا دو سوم حجم بالن آب مقطر اضافه گردید، سپس بالن به دستگاه کلونجر متصل شد و با حرارت دادن آن ۵ میلی لیتر اسانس بدست آمده جدا شد و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شد.

### روش انجام آزمایش ۳

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۷۰-۲۵۰ گرم استفاده گردید. حیوانات در شرایط استاندارد دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای  $22^{\circ}\text{C}$  با دسترسی مناسب به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه مداخلات مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی انجام شد.

پس از بیهوش کردن حیوانات توسط مخلوط کتامین و زیلازین قطعاتی از بخش انتهایی روده (ایلئوم) جدا گردید و پس از تمیز کردن تا انجام آزمایش در محلول تیروید نگهداری شدند. برای بررسی انقباضات ایلئوم قطعات یک سانتی متری از روده را جدا کرده و یک طرف آن را توسط نخ به قسمت پایین محفظه داخلی حمام بافت حاوی محلول تیروید ( $\text{CaCl}_2$  0.2g/L,  $\text{KCl}$  0.2g/L,  $\text{NaCl}$  8g/L,  $\text{NaHCO}_3$  1g/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.05g/L,  $\text{MgCl}_2$  0.1g/L و  $\text{D.glucose}$  1g/L) متصل و سر دیگر آن را به یک ترانسدیوسر ایزوتونیک که با دستگاه فیزیوگراف مرتبط بود، وصل کردیم. در تمام طول آزمایش، محلول تیروید توسط مخلوطی از ۹۵٪ اکسیژن و ۵٪ گاز کربونیک هوادهی شد و پس از حدود ۲۰ دقیقه که برای رسیدن دستگاه به وضعیت تعادل لازم بود انقباضات ایزوتونیک ایلئوم توسط دستگاه فیزیوگراف یک کاناله (Bioscience) ثبت شد. در هر دوره آزمایش یکی از محلول‌های مورد آزمایش با غلظت مورد نظر به حمام بافت اضافه شد و اثر آن بر انقباض ایلئوم ثبت گردید. پس از هر دوره آزمایش، بافت مورد نظر با محلول تیروید تازه شستشو و در صورت فعال بودن بافت، آزمایش

مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه دارای محتوای مناسبی از تانن و مواد چرب می‌باشد. اسانس آن دارای کارواکرول (۳۰٪) و سیمین (۲۵-۲۰٪) می‌باشد (Zargari, 2011). گونه‌های مختلف گیاه از نظر میزان اسانس و نوع ترکیب‌های تشکیل‌دهنده آن تنوع زیادی دارند و بر حسب نوع و درصد اجزاء تشکیل‌دهنده و نیز کاربرد اسانس متفاوت می‌باشد. اسانس بدست آمده از این گیاه در مرحله گلدهی آن می‌باشد که براساس یافته‌های Ahmadi و همکاران (۲۰۰۹) ترکیب‌های شناسایی شده در مرحله گلدهی کامل پاراسیمین (۲۱/۲٪) و کارواکرول (۶۲/۳٪) می‌باشند. براساس بررسی‌های انجام شده، غلظت‌های مختلف اسانس مرزه دارای اثر اسپاسمولیتیک و آنتی‌اسپاسمودیک بر ایلئوم می‌باشد (Hejazian *et al.*, 2014b). انقباض عضلات صاف، وابسته به کلسیم و ATP می‌باشد. افزایش کلسیم سارکوپلاسمی در عضلات صاف موجب فعال شدن میوزین کیناز و فسفریلاسیون سر میوزین می‌شود و حاصل آن انقباض می‌باشد. بنابراین، نیروی انقباض عضله صاف معمولاً بستگی زیادی به غلظت یون کلسیم مایع خارج سلولی دارد و هر عاملی که بتواند موجب کاهش ورود کلسیم به داخل سلول‌های عضلانی شود پاسخ انقباضی آن را کاهش می‌دهد (Parnas *et al.*, 2009). به طوری که بیشتر سازوکارهای تعدیل‌کننده انقباضات عضلات صاف لوله گوارش اثرات خود را به واسطه مهار کانال‌های کلسیمی اعمال می‌کنند (Cavalcante Fde *et al.*, 2010؛ Nagao *et al.*, 2011). با توجه به اثر ضدانقباضی این اسانس بر دستگاه گوارش (Hejazian *et al.*, 2014b) هدف مطالعه حاضر بررسی اثر هم‌افزایی داروی وراپامیل و اسانس مرزه بر انقباضات ایزوتونیک در ایلئوم موش سفید آزمایشگاهی می‌باشد.

### مواد و روشها

روش تهیه نمونه

برای استخراج اسانس، ۱۰۰ گرم نمونه گیاهی خشک شده گیاه مرزه که مورد تأیید مرکز تحقیقات کشاورزی و

برای هر محلول تعیین گردید و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس آزمون توکی مقایسه شد. ارزش  $(p < 0.05)$  به‌عنوان معیاری برای معنی‌دار بودن اختلاف در نظر گرفته شده‌است.

### نتایج

اثر اسپاسمولیتیک وراپامیل بر شدت انقباضات ایلئوم با اثر استیل کولین

بررسی اثرات اسپاسمولیتیک وراپامیل بر شدت انقباضات ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار نشان می‌دهد که غلظت یک و دو میکرومول وراپامیل شدت انقباض ناشی از استیل کولین را به‌ترتیب به میزان ۹٪ و ۱۵٪ کاهش می‌دهد که این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد (شکل ۱). در حالی‌که غلظت ۴ میکرومول آن انقباضات ناشی از استیل کولین را به میزان ۷۸٪ کاهش داده که از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

اثر اسپاسمولیتیک اسانس مرزه بر شدت انقباضات ایجاد شده به‌وسیله استیل کولین

در مرحله بعد، اثر اسپاسمولیتیک دوزهای مختلف اسانس مرزه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که اسانس مرزه با غلظت ۲۵ و ۵۰ نانوگرم/میلی‌لیتر دارای اثرات اسپاسمولیتیک نسبتاً ضعیفی است که از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد، اما زمانی که دوزهای بالاتر مرزه مورد استفاده قرار گرفت پاسخ متفاوتی مشاهده شد (شکل ۲). استفاده از غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر این اسانس شدت انقباضات را به‌ترتیب به میزان ۳۳٪ و ۸۲٪ کاهش می‌دهد که از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

بعدی انجام شد. آنگاه هر محلول بر روی ۵ نمونه بافتی بررسی شده و تجزیه و تحلیل آماری بر روی میانگین درصد انقباض ناشی از استیل کولین انجام گردید.

برای بررسی اثر داروهای مذکور، نمونه‌ها به گروه‌های زیر تقسیم شدند:

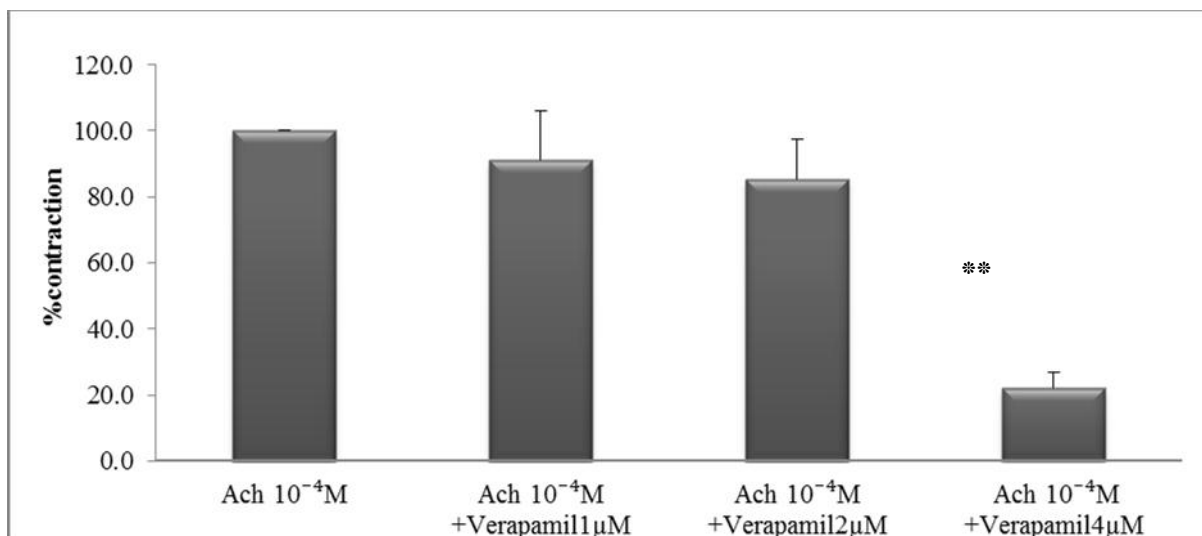
- ۱- گروه استیل کولین
- ۲- گروه وراپامیل با دوز ۱ میکرومول
- ۳- گروه وراپامیل با دوز ۲ میکرومول
- ۴- گروه وراپامیل با دوز ۴ میکرومول
- ۵- گروه مرزه با دوز ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر
- ۶- گروه مرزه با دوز ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر
- ۷- گروه مرزه با دوز ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر
- ۸- گروه مرزه با دوز ۲۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر
- ۹- گروه دریافت‌کننده وراپامیل با دوز ۱ میکرومول + مرزه با دوز ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر

### آزمایش آثار ضداسپاسمی

آثار اسپاسمولیتیک، در این روش ابتدا حداکثر انقباضات ایزوتونیک ایلئوم را با استفاده از استیل کولین (مرک-آلمان)  $10^{-4}$  مولار ایجاد کردیم. مطالعات قبل و از جمله مطالعه گروه ما نشان داد که استفاده از استیل کولین با دوز مذکور توانایی ایجاد حداکثر انقباض را در عضله ایلئوم دارد (Hejazian et al., 2014a). سپس در هر دوره آزمایش اثر محلول‌های مختلف وراپامیل (مرک-آلمان) و اسانس مرزه را بر انقباضات ایجاد شده در ایلئوم ثبت کردیم.

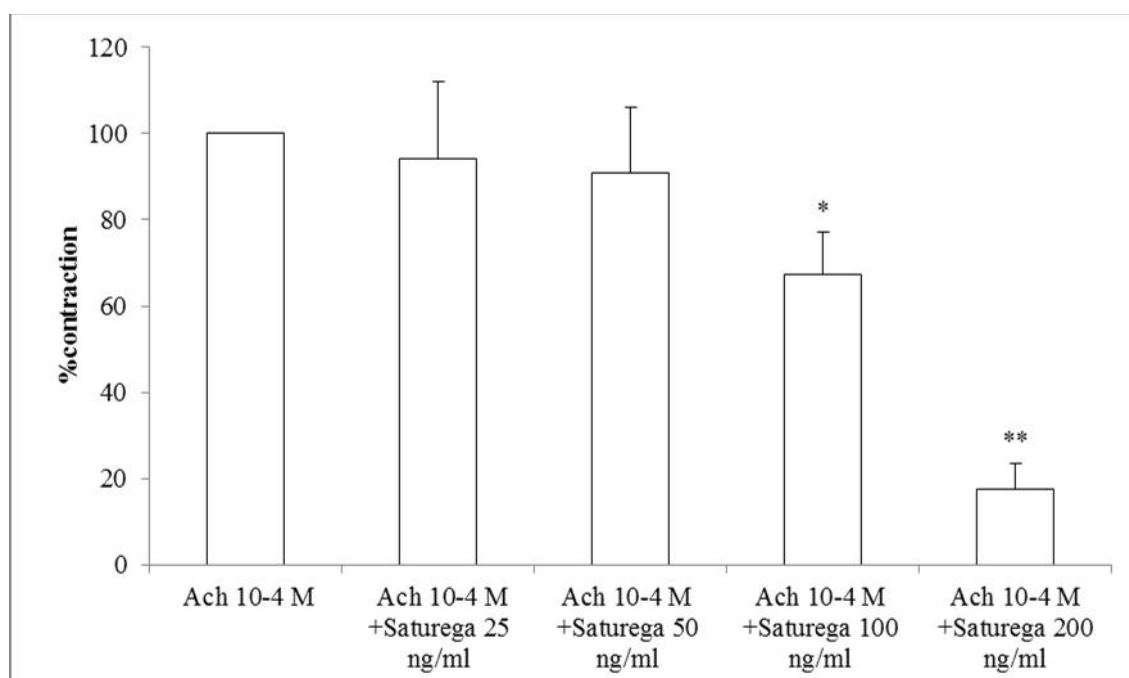
### روش جمع‌آوری نتایج و تجزیه و تحلیل آماری

به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد و نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد تغییر وضعیت انقباضی به‌صورت میلی‌متر انحراف قلم



شکل ۱- مقایسه اثر اسپاسمولیتیک وراپامیل با دوزهای ۱، ۲ و ۴ میکرومول بر انقباضات ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار (n=5)

\*\* نشان دهنده  $p < 0.01$  می باشد.

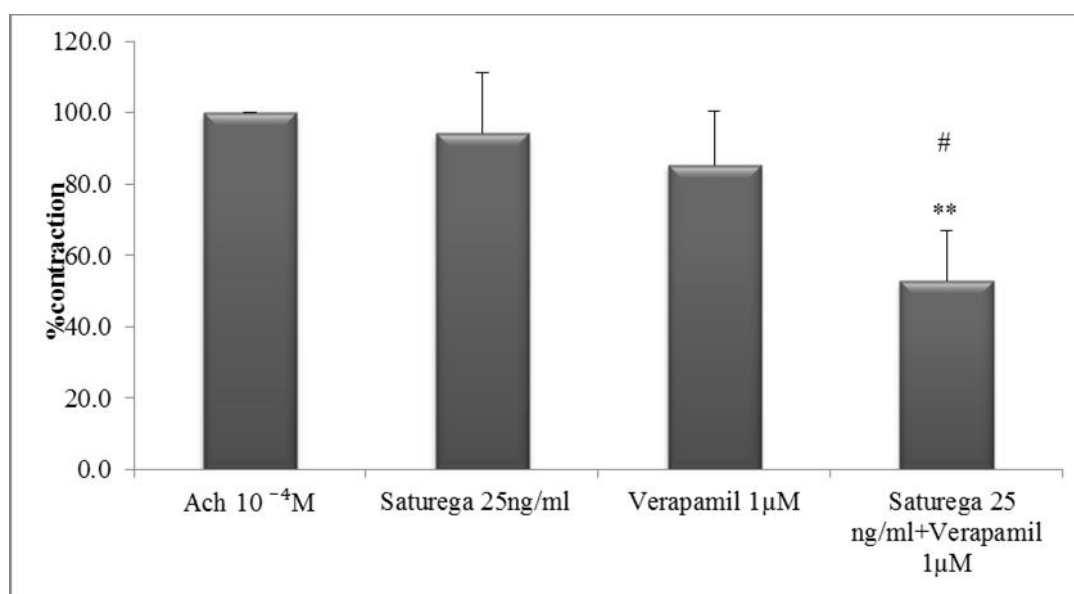


شکل ۲- مقایسه اثر اسپاسمولیتیک اسانس مرزه با غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم/میلی لیتر بر انقباضات ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار (n=5)

\* نشان دهنده  $p < 0.05$  و \*\* نشان دهنده  $p < 0.01$  می باشند.

نشان داده شده است تجویز دوز غیر مؤثره اسانس مرزه به همراه دوز غیر مؤثره وراپامیل شدت انقباض ناشی از استیل کولین را به میزان % کاهش داده که این کاهش در مقایسه با گروه استیل کولین معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.01$ ). همچنین کاهش شدت انقباضات در گروه دریافت‌کننده توأم داروها در مقایسه با گروه‌هایی که اسانس مرزه و یا وراپامیل را به تنهایی دریافت کردند نیز معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ).

اثر هم‌افزایی دوز غیر مؤثره اسانس مرزه و وراپامیل بر شدت انقباضات ایجاد شده به وسیله استیل کولین همان‌طور که در قسمت قبل نشان داده شد استفاده از وراپامیل با دوز ۱ میکرومول و همچنین مرزه با دوز ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر کاهش معنی‌داری در شدت انقباضات ناشی از استیل کولین ایجاد نکرد، بنابراین به منظور بررسی اثر سینرژیسم احتمالی این دو ترکیب از دوزهای مذکور به صورت توأم استفاده شد. همان‌گونه که در شکل ۳



شکل ۳- مقایسه اثر اسپاسمولیتیک دوزهای غیر مؤثره وراپامیل با دوز یک میکرومول به اضافه غلظت ۲۵ نانوگرم/میلی‌لیتر اسانس مرزه بر ضدانقباض ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار ( $n=5$ )

\*\*، نشان‌دهنده  $p < 0.01$  می‌باشد.

## بحث

انقباض عضلات صاف وابسته به کلسیم می‌باشد. غشای عضله صاف دارای کانال‌های کلسیمی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ است و کلسیم در جهت شیب الکتروشیمیایی خود از طریق کانال‌های کلسیمی به سمت داخل حرکت می‌کند تا با افزایش غلظت کلسیم آزاد به افزایش قدرت انقباضی عضلات صاف کمک کند. هر عاملی که بتواند موجب کاهش ورود کلسیم به داخل سلول‌های عضلانی شود پاسخ انقباضی آن را کاهش می‌دهد (Parnas et al., 2009). وراپامیل به‌عنوان یک مهارکننده کانال‌های کلسیمی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم اسانس مرزه شدت انقباضات ناشی از استیل کولین را کاهش می‌دهد اما در دوزهای پایین اثری بر این انقباضات نشان نمی‌دهد. در مورد وراپامیل نیز تنها دوز ۴ میکرومولار دارو توانست اثرات اسپاسمولیتیک نشان دهد. همچنین استفاده توأم دوز غیر مؤثره این اسانس به همراه وراپامیل به‌عنوان یک بلوکر کانال کلسیمی می‌تواند اثرات اسپاسمولیتیک معنی‌داری نشان دهد.

می‌تواند موجب مهار انقباض وابسته به دوز شود، به طوری که در این مطالعه این دارو در غلظت  $4 \mu\text{M}$  میکرومولار انقباضات ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار را به میزان ۷۸٪ کاهش داده است که این نتایج همسو با نتایج مطالعه Leonhardt و همکاران (۲۰۱۰) می‌باشد. این محققان اثر روغن‌های فرار گیاه *Pterodon polygalaeiflorus* بر انقباض ناشی از استیل کولین و میزان کلسیم را مورد آزمایش قرار داده و نتایج را با اثر وراپامیل مقایسه کردند. نتایج آنان نشان داد که اثر مهاری این ترکیب بر انقباض روده ناشی از تأثیر بر عضلات بوده و به طور کامل با واسطه سازوکار درون سلولی انجام شده و روغن‌های فرار در این رابطه موجب کاهش ورود کلسیم به داخل سیتوپلاسم شده‌اند. در بررسی دیگری که توسط Brankovic و همکاران (۲۰۰۹) بر روی روغن‌های فرار گیاه *Calamintha glandulosa* انجام شده نقش آن را در مهار کانال‌های کلسیمی مورد تأیید قرار داده و نشان می‌دهند که روغن‌های فرار دارای یک اثر مهاری بر انقباض ایلئوم بوده که پس از شستشو قابل برگشت می‌باشد و این مؤید این است که این روغن بافت روده را تخریب نکرده و بر انقباض ناشی از پتاسیم مؤثر است؛ و همان‌گونه که مشخص شده است افزایش پتاسیم موجب فعال شدن کانال‌های کلسیمی متکی به ولتاژ غشاء شده و ورود کلسیم را زیاد می‌کند؛ بنابراین با توجه به اثر فوق، روغن‌های فرار از طریق مهار ورود کلسیم به داخل سارکوپلاسم اثر گذاشته و منحنی غلظت پاسخ کلسیم را کاهش داده که این عمل مشابه اثر وراپامیل بوده و باعث عمل آنتاگونیستی بر کانال‌های کلسیمی می‌باشد که بر روی فعالیت خودبخودی ایلئوم نیز اثر داشته و اثر اسپاسمولیتیک آن از این راه اعمال می‌شود (Brankovic et al., 2009). بررسی Mahieu و همکاران (۲۰۰۷) نشان می‌دهد که تأثیر بعضی از گیاهان دارویی که دارای روغن فرار می‌باشند از طریق کانال‌های زودگذر (transient receptor potential channels: TRP) بوده و این داروها در کنترل رهایش کلسیم و فراهمی آن نقش خود را ایفا

می‌کنند. کانال‌های TRP دسته بزرگی از کانال‌های یونی هستند که بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک همانند انقباض، لمس، فشار، شنوایی و بویایی را کنترل می‌کنند. کانال‌های کاتیونی TRP واسطه هدایت سدیم و کلسیم از طریق غشاء پلاسمایی به سیتوپلاسم می‌باشند و هدایت این یون‌ها برای دیپلاریزه شدن سلول‌های تحریک‌پذیر ضروریست (Song & Yuan, 2010). این کانال‌ها به وسیله تحریک گیرنده‌های موسکارینی در عضلات صاف روده فعال می‌شوند که حاصل آن انقباض این عضلات است و به موجب آن هدایت کلسیم افزایش یافته و حرکات روده تشدید می‌شود. کانال‌های مذکور بیشتر در بخش‌های انتهایی روده یعنی ایلئوم وجود دارند و در بخش‌های ابتدای آن و در معده کمتر دیده می‌شود (Tsvilovskyy et al., 2009). بررسی‌های فوق در خصوص نقش روغن‌های فرار مبین این واقعیت است که مهمترین سازوکار آنتی‌اسپاسمودیک بر عضله صاف لوله گوارش مهار کانال‌های کلسیمی متکی به ولتاژ و جلوگیری از ورود کلسیم به داخل فیبر عضلانی از طریق این کانال‌ها می‌باشد. مطالعات نشان داده است که غلظت بالای از کارواکول در اسانس مرزه وجود دارد (Ahmadi et al., 2009). از طرفی در مورد اثر اسپاسمولیتیک کارواکول تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که کارواکول از طریق مهار کانال‌های گذرا (Parnas et al., 2009) و همچنین مهار کانال‌های کلسیمی (Earley et al., 2010) و نیز کاهش حساسیت اجزا انقباضی عضله به کلسیم می‌تواند اثرات اسپاسمولیتیک نشان دهد (Peixoto et al., 2010). البته مهار ورود کلسیم توسط بعضی از روغن‌های فرار دیگر نیز نشان داده شده است (Leonhardt et al., 2010)؛ نکته که کارواکول با درصد نسبتاً بالایی در اسانس مرزه وجود دارد بخش عمده‌ای از آثار اسپاسمولیتیک اسانس مرزه بر انقباضات روده ممکن است به وسیله کارواکول انجام شده باشد. همچنین با توجه به اینکه دوز غیرمؤثره این اسانس به همراه دوز غیرمؤثره وراپامیل توانست اثرات

- Leonhardt, V., Leal-Cardoso, J.H., Lahlou, S., Albuquerque, A.A., Porto, R.S., Celedônio, N.R., Oliveira, A.C., Pereira, R.F., Silva, L.P., Garcia-Teófilo, T.M., Silva, A.P., Magalhães, P.J., Duarte, G.P. and Coelho-de-Souza, A.N., 2010. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent betacaryophyllene on rat isolated ileum. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 24(6): 749-758.
- Mahieu, F, Owsianik, G., Verbert, L., Janssens, A., De Smedt, H., Nilius, B. and Voets, T., 2007. TRPM8-independent menthol-induced  $Ca^{2+}$  release from endoplasmic reticulum and Golgi. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(5): 3325-3336.
- Nagao, M., Linden, L.D., Duenes, J.A. and Sarr, M.G., 2011. Mechanisms of action of the gastro transmitter hydrogen sulfide in modulating contractile activity of longitudinal muscle of rat ileum. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 15(1): 12-22.
- Parnas, M., Peters, M., Dadon, D., Lev, S., Vertkin, I., Slutsky, I. and Minke, B., 2009. Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium*, 45(3): 300-309.
- Peixoto-Neves, D., Silva-Alves, K.S., Gomes, M.D., Lima, F.C., Lahlou, S., Magalhães, P.J., Ceccatto, V.M., Coelho-de-Souza, A.N. and Leal-Cardoso, J.H., 2010. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 24(3): 341-350.
- Song, M.Y. and Yuan, J.X., 2010. Introduction to TRP channels: structure, function, and regulation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 661: 99-108.
- Tsvilovskyy, V.V., Zholos, A.V., Aberle, T., Philipp, S.E., Dietrich, A., Zhu, M.X., Birnbaumer, L., Freichel, M. and Flockerzi, V., 2009. Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. *Gastroenterology*, 137(4): 1415-1424.
- Zargari, A., 2011. *Medicinal Plants* (Vol. 4). University of Tehran Press, 948p, (In Persian).
- هم‌افزایی در جهت کاهش شدت انقباضات ایلیوم نشان دهد، می‌توان مهار کانال‌های کلسیمی را به‌عنوان یکی از سازوکارهای اثر اسانس مرزه بر انقباضات عضله صاف ایلیوم معرفی کرد.

#### منابع مورد استفاده

- Ahmadi, Sh., Sefidkon, F., Babakhanlo, P., Asgari, F., Khademi, K., Valizadeh, N. and Karimifar, M.A., 2009. Comparing essential oil composition of *Satureja bachtiarica* Bunge before and full flowering stages in field and provenance. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 25(2): 159-169.
- Brankovic, S.V., Kitic, D., Radenkovic, M.M., Veljkovic, S.M. and Golubovic, T.D., 2009. Calcium blocking activity as a mechanism of the spasmolytic effect of the essential oil of *Calamintha glandulosa* Silic on the isolated rat ileum. *General Physiology and Biophysics*, 28:174-178.
- Cavalcante Fde, A., Monteiro Fde, S., Martins, I.R., Barbosa, T.P., Camara Cde, A. and Pinto, A.C., 2010. Synthetic lapachol derivatives relax guinea-pig ileum by blockade of the voltage-gated calcium channels. *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 65(9-10): 627-636.
- Earley, S., Gonzales, A.L. and Garcia, Z.I., 2010. Dietary agonist of transient receptor potential cation channel V3 elicits endothelium-dependent vasodilation. *Molecular Pharmacology*, 77(4): 612-620.
- Hejazian, S.H., Bagheri, S.M. and Safari, F., 2014a. Spasmolytic and antispasmodic action of *Trachyspermum ammi* essence on rat's ileum contraction. *North American Journal of Medical Sciences*, 6(12): 643-647.
- Hejazian, S.H., Bameri, M. and Abassi Sarcheshma, A., 2014b. The effect of *Satureja* essential oil on acetylcholine induced contraction in male rats ileum. *Journal of Rafsangan Medical Science*, 13(4): 395-404.
- Katzung, B.G., Masters, S.B. and Trevor, A.J., 2009. *Basic and Clinical Pharmacology*. McGraw Hill Professional, 1232p.

## The inhibitory synergistic effects of verapamil and *Satureja hortensis* essential oil on cholinergic contraction of rat ileum

S.H. Hejazian<sup>1\*</sup>, F. Safari<sup>2</sup> and M.Bameri<sup>3</sup>

1\*- Corresponding author, Department of Physiology/Herbal Medicine Research Center, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran, E-mail: hejaziansh@yahoo.com

2- Department of Physiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran.

3- Paradise University, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran

Received: December 2014

Revised: May 2015

Accepted: May 2015

### Abstract

Verapamil inhibits the cytosolic calcium content by blocking both activated and inactivated T-type calcium. Regarding the spasmolytic effect of materials caused by blockage of calcium channels and due to the inhibitory effect of *Satureja hortensis* L. on ileum smooth muscle contraction. The present study was designed to find out the synergistic effects of calcium blocker verapamil and *Satureja* essential oil on inhibition of cholinergic contraction in male rat's ileum. In this study, by using an oscillographic device, the effects of different concentration of *Satureja* essential oil and verapamil were examined on isotonic contraction of ileum induced by acetylcholine  $10^{-4}$ M. Our results showed that both verapamil and *Satureja* essential oils inhibited acetylcholine-induced contraction of ileum. In addition, their ineffective doses had synergistic spasmolytic effects, which were statistically significant ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** Verapamil, *Satureja hortensis* L., essential oil, spasmolytic, acetylcholine, ileum, smooth muscle.



## اثر هم‌افزایی داروی مسدودکننده کلسیم (وراپامیل) و اسانس مرزه (*Satureja hortensis* L.) بر جلوگیری از انقباض کولینرژیک در ایلئوم موش سفید بزرگ آزمایشگاهی

سید حسن حجازیان<sup>۱\*</sup>، فاطمه صفری<sup>۲</sup> و محمد بامری<sup>۳</sup>

۱- نویسنده مسئول، استادیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران،

پست الکترونیکی: hejaziansh@yahoo.com

۲- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

۳- کارشناس ارشد، دانشکده پرديس بین‌الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۴

تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۳

### چکیده

وراپامیل با مهار کانال‌های کلسیمی نوع T فعال و غیرفعال از ورود کلسیم به داخل سلول‌ها جلوگیری می‌کند. با توجه به اینکه اثرات ضداسپاسمی مواد از طریق مهار کانال‌های کلسیمی اعمال می‌شود و اثر ضدانقباضی و کاهش فعالیت مکانیکی عضلات صاف ایلئوم توسط اسانس مرزه نشان داده شده است، مطالعه حاضر اثر هم‌افزایی کلسیم بلوکر وراپامیل و اسانس مرزه (*Satureja hortensis* L.) را بر جلوگیری از تحریک کولینرژیک ایلئوم موش سفید بزرگ آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده است. در این مطالعه با استفاده از دستگاه فیزیوگراف، اثر غلظت‌های مختلف اسانس مرزه و وراپامیل بر انقباضات ایزوتونیک ایجاد شده به وسیله استیل کولین<sup>۴</sup>-۱۰ مولار در ایلئوم مورد بررسی قرار گرفت و یافته‌ها نشان داد که هر دو ماده وراپامیل و اسانس مرزه بر انقباض ناشی از استیل کولین اثر مهارکنندگی داشته و همچنین غلظت‌های غیرمؤثره آنها نیز اثر هم‌افزایی در مهار انقباض داشته که از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

واژه‌های کلیدی: وراپامیل، اسانس مرزه (*Satureja hortensis* L.)، ضداسپاسمی، استیل کولین، ایلئوم، عضله صاف.

### مقدمه

وراپامیل یک داروی مسدودکننده کانال کلسیمی می‌باشد که در بدن موجب جلوگیری از ورود کلسیم به داخل سلول‌ها می‌شود؛ به علت اثر مسدودکنندگی این دارو بر کانال‌های کلسیمی مقدار کلسیم در فیبرهای عضله قلب و عروق خونی کاهش می‌یابد که می‌تواند منجر به کاهش تعداد ضربان قلب و گشاد شدن عروق خونی گردد که در نتیجه آن فشار خون کاهش و جریان خون افزایش می‌یابد و

از بار کاری قلب نیز کاسته می‌شود. بیش از ۹۰٪ دارو از راه خوراکی جذب می‌شود. به دلیل متابولیسم عبور اول از کبد، فراهمی زیستی آن ۳۵-۲۰ درصد است (Katzung et al., 2009). گیاه مرزه با نام علمی *Satureja hortensis* از تیره نعناع می‌باشد که در نواحی شمال غربی ایران، تبریز و نواحی مختلف خراسان می‌روید و دارای اثر نیرودهنده، تسهیل‌کننده عمل هضم و رفع اسهال و ضدکرم می‌باشد (Zargari, 2011). همچنین در رفع اسهال‌های عفونی و التهاب کولون

منابع طبیعی استان یزد به شماره (TARI-۵۸۴۱۶) قرار گرفته بود، در بالن تقطیر ریخته شد و بعد به آن، تا دو سوم حجم بالن آب مقطر اضافه گردید، سپس بالن به دستگاه کلونجر متصل شد و با حرارت دادن آن ۵ میلی لیتر اسانس بدست آمده جدا شد و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شد.

### روش انجام آزمایش ۳

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۷۰-۲۵۰ گرم استفاده گردید. حیوانات در شرایط استاندارد دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای  $22^{\circ}\text{C}$  با دسترسی مناسب به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه مداخلات مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی انجام شد.

پس از بیهوش کردن حیوانات توسط مخلوط کتامین و زیلازین قطعاتی از بخش انتهایی روده (ایلئوم) جدا گردید و پس از تمیز کردن تا انجام آزمایش در محلول تیروید نگهداری شدند. برای بررسی انقباضات ایلئوم قطعات یک سانتی متری از روده را جدا کرده و یک طرف آن را توسط نخ به قسمت پایین محفظه داخلی حمام بافت حاوی محلول تیروید ( $\text{CaCl}_2$  0.2g/L,  $\text{KCl}$  0.2g/L,  $\text{NaCl}$  8g/L,  $\text{NaHCO}_3$  1g/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.05g/L,  $\text{MgCl}_2$  0.1g/L و  $\text{D.glucose}$  1g/L) متصل و سر دیگر آن را به یک ترانسدیوسر ایزوتونیک که با دستگاه فیزیوگراف مرتبط بود، وصل کردیم. در تمام طول آزمایش، محلول تیروید توسط مخلوطی از ۹۵٪ اکسیژن و ۵٪ گاز کربونیک هوادهی شد و پس از حدود ۲۰ دقیقه که برای رسیدن دستگاه به وضعیت تعادل لازم بود انقباضات ایزوتونیک ایلئوم توسط دستگاه فیزیوگراف یک کاناله (Bioscience) ثبت شد. در هر دوره آزمایش یکی از محلول‌های مورد آزمایش با غلظت مورد نظر به حمام بافت اضافه شد و اثر آن بر انقباض ایلئوم ثبت گردید. پس از هر دوره آزمایش، بافت مورد نظر با محلول تیروید تازه شستشو و در صورت فعال بودن بافت، آزمایش

مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه دارای محتوای مناسبی از تانن و مواد چرب می‌باشد. اسانس آن دارای کارواکرول (۳۰٪) و سیمین (۲۵-۲۰٪) می‌باشد (Zargari, 2011). گونه‌های مختلف گیاه از نظر میزان اسانس و نوع ترکیب‌های تشکیل‌دهنده آن تنوع زیادی دارند و بر حسب نوع و درصد اجزاء تشکیل‌دهنده و نیز کاربرد اسانس متفاوت می‌باشد. اسانس بدست آمده از این گیاه در مرحله گلدهی آن می‌باشد که براساس یافته‌های Ahmadi و همکاران (۲۰۰۹) ترکیب‌های شناسایی شده در مرحله گلدهی کامل پاراسیمین (۲۱/۲٪) و کارواکرول (۶۲/۳٪) می‌باشند. براساس بررسی‌های انجام شده، غلظت‌های مختلف اسانس مرزه دارای اثر اسپاسمولیتیک و آنتی‌اسپاسمودیک بر ایلئوم می‌باشد (Hejazian *et al.*, 2014b). انقباض عضلات صاف، وابسته به کلسیم و ATP می‌باشد. افزایش کلسیم سارکوپلاسمی در عضلات صاف موجب فعال شدن میوزین کیناز و فسفریلاسیون سر میوزین می‌شود و حاصل آن انقباض می‌باشد. بنابراین، نیروی انقباض عضله صاف معمولاً بستگی زیادی به غلظت یون کلسیم مایع خارج سلولی دارد و هر عاملی که بتواند موجب کاهش ورود کلسیم به داخل سلول‌های عضلانی شود پاسخ انقباضی آن را کاهش می‌دهد (Parnas *et al.*, 2009). به طوری که بیشتر سازوکارهای تعدیل‌کننده انقباضات عضلات صاف لوله گوارش اثرات خود را به واسطه مهار کانال‌های کلسیمی اعمال می‌کنند (Cavalcante Fde *et al.*, 2010؛ Nagao *et al.*, 2011). با توجه به اثر ضدانقباضی این اسانس بر دستگاه گوارش (Hejazian *et al.*, 2014b) هدف مطالعه حاضر بررسی اثر هم‌افزایی داروی وراپامیل و اسانس مرزه بر انقباضات ایزوتونیک در ایلئوم موش سفید آزمایشگاهی می‌باشد.

### مواد و روشها

روش تهیه نمونه

برای استخراج اسانس، ۱۰۰ گرم نمونه گیاهی خشک شده گیاه مرزه که مورد تأیید مرکز تحقیقات کشاورزی و

درصد تغییر وضعیت انقباضی به صورت میلی‌متر انحراف قلم برای هر محلول تعیین گردید و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس آزمون توکی مقایسه شد. ارزش  $(p < 0.05)$  به عنوان معیاری برای معنی‌دار بودن اختلاف در نظر گرفته شده است.

### نتایج

اثر اسپاسمولیتیک وراپامیل بر شدت انقباضات ایلئوم با اثر استیل کولین

بررسی اثرات اسپاسمولیتیک وراپامیل بر شدت انقباضات ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار نشان می‌دهد که غلظت یک و دو میکرومول وراپامیل شدت انقباض ناشی از استیل کولین را به ترتیب به میزان ۹٪ و ۱۵٪ کاهش می‌دهد که این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد (شکل ۱). در حالی که غلظت ۴ میکرومول آن انقباضات ناشی از استیل کولین را به میزان ۷۸٪ کاهش داده که از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد  $(p < 0.05)$ .

اثر اسپاسمولیتیک اسانس مرزه بر شدت انقباضات ایجاد شده به وسیله استیل کولین

در مرحله بعد، اثر اسپاسمولیتیک دوزهای مختلف اسانس مرزه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که اسانس مرزه با غلظت ۲۵ و ۵۰ نانوگرم/میلی‌لیتر دارای اثرات اسپاسمولیتیک نسبتاً ضعیفی است که از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد، اما زمانی که دوزهای بالاتر مرزه مورد استفاده قرار گرفت پاسخ متفاوتی مشاهده شد (شکل ۲). استفاده از غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر این اسانس شدت انقباضات را به ترتیب به میزان ۳۳٪ و ۸۲٪ کاهش می‌دهد که از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد  $(p < 0.05)$ .

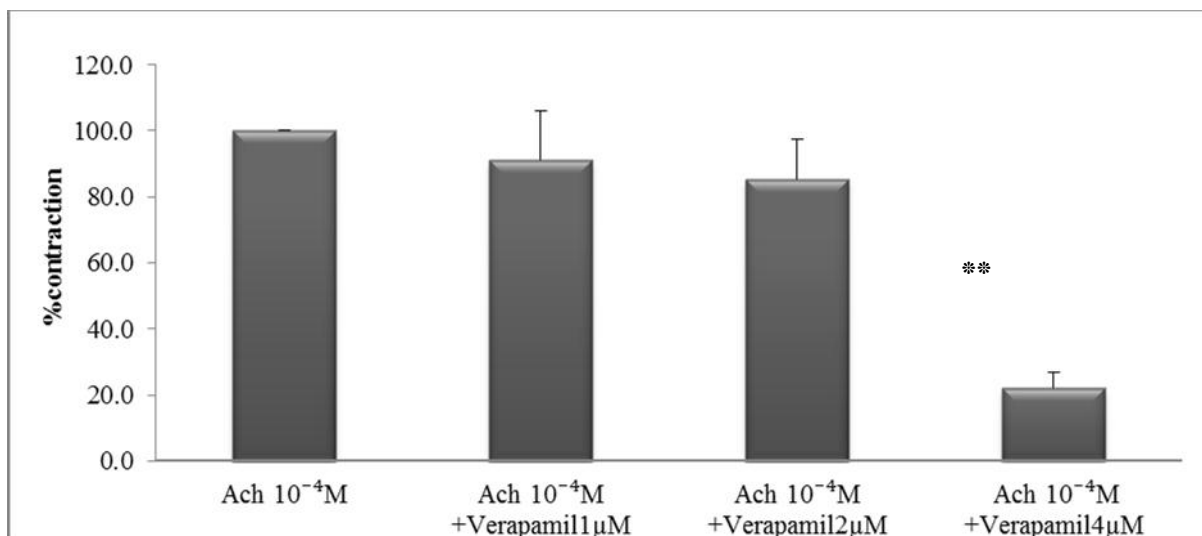
بعدی انجام شد. آنگاه هر محلول بر روی ۵ نمونه بافتی بررسی شده و تجزیه و تحلیل آماری بر روی میانگین درصد انقباض ناشی از استیل کولین انجام گردید. برای بررسی اثر داروهای مذکور، نمونه‌ها به گروه‌های زیر تقسیم شدند:

- ۱- گروه استیل کولین
- ۲- گروه وراپامیل با دوز ۱ میکرومول
- ۳- گروه وراپامیل با دوز ۲ میکرومول
- ۴- گروه وراپامیل با دوز ۴ میکرومول
- ۵- گروه مرزه با دوز ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر
- ۶- گروه مرزه با دوز ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر
- ۷- گروه مرزه با دوز ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر
- ۸- گروه مرزه با دوز ۲۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر
- ۹- گروه دریافت کننده وراپامیل با دوز ۱ میکرومول + مرزه با دوز ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر

### آزمایش آثار ضداسپاسمی

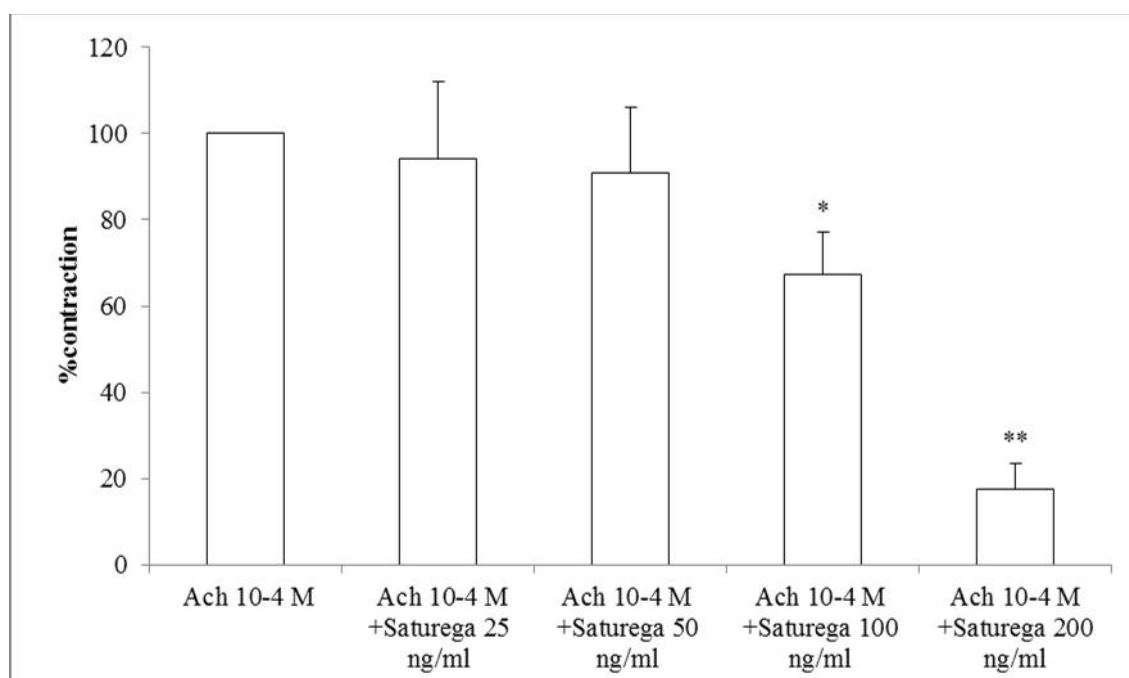
آثار اسپاسمولیتیک، در این روش ابتدا حداکثر انقباضات ایزوتونیک ایلئوم را با استفاده از استیل کولین (مرک-آلمان)  $10^{-4}$  مولار ایجاد کردیم. مطالعات قبل و از جمله مطالعه گروه ما نشان داد که استفاده از استیل کولین با دوز مذکور توانایی ایجاد حداکثر انقباض را در عضله ایلئوم دارد (Hejazian et al., 2014a). سپس در هر دوره آزمایش اثر محلول‌های مختلف وراپامیل (مرک-آلمان) و اسانس مرزه را بر انقباضات ایجاد شده در ایلئوم ثبت کردیم.

روش جمع‌آوری نتایج و تجزیه و تحلیل آماری به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار



شکل ۱- مقایسه اثر اسپاسمولیتیک وراپامیل با دوزهای ۱، ۲ و ۴ میکرومول بر انقباضات ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار (n=5)

\*\* نشان دهنده  $p < 0.01$  می باشد.

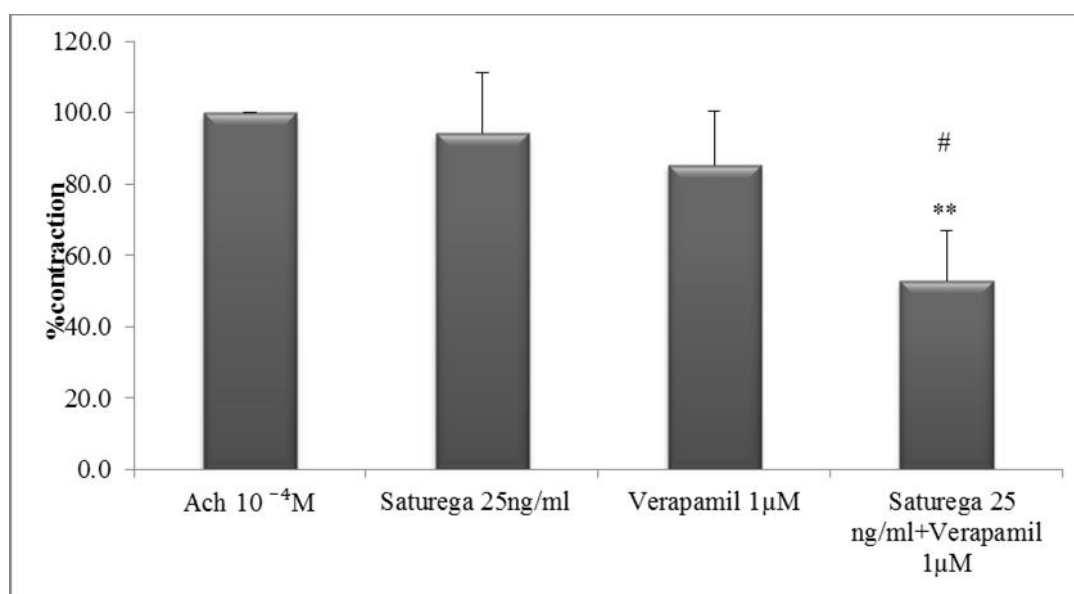


شکل ۲- مقایسه اثر اسپاسمولیتیک اسانس مرزه با غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم/میلی لیتر بر انقباضات ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار (n=5)

\* نشان دهنده  $p < 0.05$  و \*\* نشان دهنده  $p < 0.01$  می باشند.

نشان داده شده‌است تجویز دوز غیرمؤثره اسانس مرزه به همراه دوز غیرمؤثره وراپامیل شدت انقباض ناشی از استیل کولین را به میزان % کاهش داده که این کاهش در مقایسه با گروه استیل کولین معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.01$ ). همچنین کاهش شدت انقباضات در گروه دریافت‌کننده توأم داروها در مقایسه با گروه‌هایی که اسانس مرزه و یا وراپامیل را به تنهایی دریافت کردند نیز معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ).

اثر هم‌افزایی دوز غیر مؤثره اسانس مرزه و وراپامیل بر شدت انقباضات ایجاد شده به وسیله استیل کولین همان‌طور که در قسمت قبل نشان داده شد استفاده از وراپامیل با دوز ۱ میکرومول و همچنین مرزه با دوز ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر کاهش معنی‌داری در شدت انقباضات ناشی از استیل کولین ایجاد نکرد، بنابراین به‌منظور بررسی اثر سینرژیسم احتمالی این دو ترکیب از دوزهای مذکور به‌صورت توأم استفاده شد. همان‌گونه که در شکل ۳



شکل ۳- مقایسه اثر اسپاسمولیتیک دوزهای غیرمؤثره وراپامیل با دوز یک میکرومول به اضافه غلظت ۲۵ نانوگرم/میلی‌لیتر اسانس مرزه بر ضدانقباض ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار ( $n=5$ )

\*\*، نشان‌دهنده  $p < 0.01$  می‌باشد.

## بحث

انقباض عضلات صاف وابسته به کلسیم می‌باشد. غشای عضله صاف دارای کانال‌های کلسیمی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ است و کلسیم در جهت شیب الکتروشیمیایی خود از طریق کانال‌های کلسیمی به سمت داخل حرکت می‌کند تا با افزایش غلظت کلسیم آزاد به افزایش قدرت انقباضی عضلات صاف کمک کند. هر عاملی که بتواند موجب کاهش ورود کلسیم به‌داخل سلول‌های عضلانی شود پاسخ انقباضی آن را کاهش می‌دهد (Parnas *et al.*, 2009). وراپامیل به‌عنوان یک مهارکننده کانال‌های کلسیمی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم اسانس مرزه شدت انقباضات ناشی از استیل کولین را کاهش می‌دهد اما در دوزهای پایین اثری بر این انقباضات نشان نمی‌دهد. در مورد وراپامیل نیز تنها دوز ۴ میکرومولار دارو توانست اثرات اسپاسمولیتیک نشان دهد. همچنین استفاده توأم دوز غیرمؤثره این اسانس به همراه وراپامیل به‌عنوان یک بلوکر کانال کلسیمی می‌تواند اثرات اسپاسمولیتیک معنی‌داری نشان دهد.

می‌تواند موجب مهار انقباض وابسته به دوز شود، به طوری که در این مطالعه این دارو در غلظت  $4 \mu\text{M}$  میکرومولار انقباضات ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار را به میزان ۷۸٪ کاهش داده است که این نتایج همسو با نتایج مطالعه Leonhardt و همکاران (۲۰۱۰) می‌باشد. این محققان اثر روغن‌های فرّار گیاه *Pterodon polygalaeiflorus* بر انقباض ناشی از استیل کولین و میزان کلسیم را مورد آزمایش قرار داده و نتایج را با اثر وراپامیل مقایسه کردند. نتایج آنان نشان داد که اثر مهاری این ترکیب بر انقباض روده ناشی از تأثیر بر عضلات بوده و به طور کامل با واسطه سازوکار درون سلولی انجام شده و روغن‌های فرّار در این رابطه موجب کاهش ورود کلسیم به داخل سیتوپلاسم شده‌اند. در بررسی دیگری که توسط Brankovic و همکاران (۲۰۰۹) بر روی روغن‌های فرّار گیاه *Calamintha glandulosa* انجام شده نقش آن را در مهار کانال‌های کلسیمی مورد تأیید قرار داده و نشان می‌دهند که روغن‌های فرّار دارای یک اثر مهاری بر انقباض ایلئوم بوده که پس از شستشو قابل برگشت می‌باشد و این مؤید این است که این روغن بافت روده را تخریب نکرده و بر انقباض ناشی از پتاسیم مؤثر است؛ و همان‌گونه که مشخص شده است افزایش پتاسیم موجب فعال شدن کانال‌های کلسیمی متکی به ولتاژ غشاء شده و ورود کلسیم را زیاد می‌کند؛ بنابراین با توجه به اثر فوق، روغن‌های فرّار از طریق مهار ورود کلسیم به داخل سارکوپلاسم اثر گذاشته و منحنی غلظت پاسخ کلسیم را کاهش داده که این عمل مشابه اثر وراپامیل بوده و باعث عمل آنتاگونیستی بر کانال‌های کلسیمی می‌باشد که بر روی فعالیت خودبخودی ایلئوم نیز اثر داشته و اثر اسپاسمولیتیک آن از این راه اعمال می‌شود (Brankovic et al., 2009). بررسی Mahieu و همکاران (۲۰۰۷) نشان می‌دهد که تأثیر بعضی از گیاهان دارویی که دارای روغن فرّار می‌باشند از طریق کانال‌های زودگذر (transient receptor potential channels: TRP) بوده و این داروها در کنترل رهایش کلسیم و فراهمی آن نقش خود را ایفا

می‌کنند. کانال‌های TRP دسته بزرگی از کانال‌های یونی هستند که بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک همانند انقباض، لمس، فشار، شنوایی و بویایی را کنترل می‌کنند. کانال‌های کاتیونی TRP واسطه هدایت سدیم و کلسیم از طریق غشاء پلاسمایی به سیتوپلاسم می‌باشند و هدایت این یون‌ها برای دیپلاریزه شدن سلول‌های تحریک‌پذیر ضروریست (Song & Yuan, 2010). این کانال‌ها به وسیله تحریک گیرنده‌های موسکارینی در عضلات صاف روده فعال می‌شوند که حاصل آن انقباض این عضلات است و به موجب آن هدایت کلسیم افزایش یافته و حرکات روده تشدید می‌شود. کانال‌های مذکور بیشتر در بخش‌های انتهایی روده یعنی ایلئوم وجود دارند و در بخش‌های ابتدای آن و در معده کمتر دیده می‌شود (Tsvilovskyy et al., 2009). بررسی‌های فوق در خصوص نقش روغن‌های فرّار مبین این واقعیت است که مهمترین سازوکار آنتی‌اسپاسمودیک بر عضله صاف لوله گوارش مهار کانال‌های کلسیمی متکی به ولتاژ و جلوگیری از ورود کلسیم به داخل فیبر عضلانی از طریق این کانال‌ها می‌باشد. مطالعات نشان داده است که غلظت بالای از کارواکول در اسانس مرزه وجود دارد (Ahmadi et al., 2009). از طرفی در مورد اثر اسپاسمولیتیک کارواکول تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که کارواکول از طریق مهار کانال‌های گذرا (Parnas et al., 2009) و همچنین مهار کانال‌های کلسیمی (Earley et al., 2010) و نیز کاهش حساسیت اجزا انقباضی عضله به کلسیم می‌تواند اثرات اسپاسمولیتیک نشان دهد (Peixoto et al., 2010). البته مهار ورود کلسیم توسط بعضی از روغن‌های فرّار دیگر نیز نشان داده شده است (Leonhardt et al., 2010)؛ نکته که کارواکول با درصد نسبتاً بالایی در اسانس مرزه وجود دارد بخش عمده‌ای از آثار اسپاسمولیتیک اسانس مرزه بر انقباضات روده ممکن است به وسیله کارواکول انجام شده باشد. همچنین با توجه به اینکه دوز غیرمؤثره این اسانس به همراه دوز غیرمؤثره وراپامیل توانست اثرات

Basic and Clinical Pharmacology. McGraw Hill Professional, 1232p.

- Leonhardt, V., Leal-Cardoso, J.H., Lahlou, S., Albuquerque, A.A., Porto, R.S., Celedônio, N.R., Oliveira, A.C., Pereira, R.F., Silva, L.P., Garcia-Teófilo, T.M., Silva, A.P., Magalhães, P.J., Duarte, G.P. and Coelho-de-Souza, A.N., 2010. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent betacaryophyllene on rat isolated ileum. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 24(6): 749-758.
  - Mahieu, F, Owsianik, G., Verbert, L., Janssens, A., De Smedt, H., Nilius, B. and Voets, T., 2007. TRPM8-independent menthol-induced  $Ca^{2+}$  release from endoplasmic reticulum and Golgi. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(5): 3325-3336.
  - Nagao, M., Linden, L.D., Duenes, J.A. and Sarr, M.G., 2011. Mechanisms of action of the gastro transmitter hydrogen sulfide in modulating contractile activity of longitudinal muscle of rat ileum. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 15(1): 12-22.
  - Parnas, M., Peters, M., Dadon, D., Lev, S., Vertkin, I., Slutsky, I. and Minke, B., 2009. Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium*, 45(3): 300-309.
  - Peixoto-Neves, D., Silva-Alves, K.S., Gomes, M.D., Lima, F.C., Lahlou, S., Magalhães, P.J., Ceccatto, V.M., Coelho-de-Souza, A.N. and Leal-Cardoso, J.H., 2010. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 24(3): 341-350.
  - Song, M.Y. and Yuan, J.X., 2010. Introduction to TRP channels: structure, function, and regulation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 661: 99-108.
  - Tsvilovskyy, V.V., Zholos, A.V., Aberle, T., Philipp, S.E., Dietrich, A., Zhu, M.X., Birnbaumer, L., Freichel, M. and Flockerzi, V., 2009. Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. *Gastroenterology*, 137(4): 1415-1424.
  - Zargari, A., 2011. Medicinal Plants (Vol. 4). University of Tehran Press, 948p, (In Persian).
- هم‌افزایی در جهت کاهش قابل توجه شدت انقباضات ایلیوم نشان دهد، می‌توان مهار کانال‌های کلسیمی را به‌عنوان یکی از سازوکارهای اثر اسانس مرزه بر انقباضات عضله صاف ایلیوم معرفی کرد.

#### منابع مورد استفاده

- Ahmadi, Sh., Sefidkon, F., Babakhanlo, P., Asgari, F., Khademi, K., Valizadeh, N. and Karimifar, M.A., 2009. Comparing essential oil composition of *Satureja bachtiarica* Bunge before and full flowering stages in field and provenance. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 25(2): 159-169.
- Brankovic, S.V., Kitic, D., Radenkovic, M.M., Veljkovic, S.M. and Golubovic, T.D., 2009. Calcium blocking activity as a mechanism of the spasmolytic effect of the essential oil of *Calamintha glandulosa* Silic on the isolated rat ileum. *General Physiology and Biophysics*, 28:174-178.
- Cavalcante Fde, A., Monteiro Fde, S., Martins, I.R., Barbosa, T.P., Camara Cde, A. and Pinto, A.C., 2010. Synthetic lapachol derivatives relax guinea-pig ileum by blockade of the voltage-gated calcium channels. *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 65(9-10): 627-636.
- Earley, S., Gonzales, A.L. and Garcia, Z.I., 2010. Dietary agonist of transient receptor potential cation channel V3 elicits endothelium-dependent vasodilation. *Molecular Pharmacology*, 77(4): 612-620.
- Hejazian, S.H., Bagheri, S.M. and Safari, F., 2014a. Spasmolytic and antispasmodic action of *Trachyspermum ammi* essence on rat's ileum contraction. *North American Journal of Medical Sciences*, 6(12): 643-647.
- Hejazian, S.H., Bameri, M. and Abassi Sarcheshma, A., 2014b. The effect of *Satureja* essential oil on acetylcholine induced contraction in male rats ileum. *Journal of Rafsangan Medical Science*, 13(4): 395-404.
- Katzung, B.G., Masters, S.B. and Trevor, A.J., 2009.

## The inhibitory synergistic effects of verapamil and *Satureja hortensis* essential oil on cholinergic contraction of rat ileum

S.H. Hejazian<sup>1\*</sup>, F. Safari<sup>2</sup> and M. Bameri<sup>3</sup>

1\*- Corresponding author, Department of Physiology/Herbal Medicine Research Center, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran, E-mail: hejaziansh@yahoo.com

2- Department of Physiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran.

3- Paradise University, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran

Received: December 2014

Revised: May 2015

Accepted: May 2015

### Abstract

Verapamil inhibits the cytosolic calcium content by blocking both activated and inactivated T-type calcium. Regarding the spasmolytic effect of materials caused by blockage of calcium channels and due to the inhibitory effect of *Satureja hortensis* L. on ileum smooth muscle contraction. The present study was designed to find out the synergistic effects of calcium blocker verapamil and *Satureja* essential oil on inhibition of cholinergic contraction in male rat's ileum. In this study, by using an oscillographic device, the effects of different concentration of *Satureja* essential oil and verapamil were examined on isotonic contraction of ileum induced by acetylcholine  $10^{-4}$ M. Our results showed that both verapamil and *Satureja* essential oils inhibited acetylcholine-induced contraction of ileum. In addition, their ineffective doses had synergistic spasmolytic effects, which were statistically significant ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** Verapamil, *Satureja hortensis* L., essential oil, spasmolytic, acetylcholine, ileum, smooth muscle.



## اثر هم‌افزایی داروی مسدودکننده کلسیم (وراپامیل) و اسانس مرزه (*Satureja hortensis* L.) بر جلوگیری از انقباض کولینرژیک در ایلئوم موش سفید بزرگ آزمایشگاهی

سید حسن حجازیان<sup>۱\*</sup>، فاطمه صفری<sup>۲</sup> و محمد بامری<sup>۳</sup>

۱- نویسنده مسئول، استادیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران،

پست الکترونیکی: hejaziansh@yahoo.com

۲- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

۳- کارشناس ارشد، دانشکده پرديس بین‌الملل، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۴

تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۳

### چکیده

وراپامیل با مهار کانال‌های کلسیمی نوع T فعال و غیرفعال از ورود کلسیم به داخل سلول‌ها جلوگیری می‌کند. با توجه به اینکه اثرات ضداسپاسمی مواد از طریق مهار کانال‌های کلسیمی اعمال می‌شود و اثر ضدانقباضی و کاهش فعالیت مکانیکی عضلات صاف ایلئوم توسط اسانس مرزه نشان داده شده است، مطالعه حاضر اثر هم‌افزایی کلسیم بلوکر وراپامیل و اسانس مرزه (*Satureja hortensis* L.) را بر جلوگیری از تحریک کولینرژیک ایلئوم موش سفید بزرگ آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده است. در این مطالعه با استفاده از دستگاه فیزیوگراف، اثر غلظت‌های مختلف اسانس مرزه و وراپامیل بر انقباضات ایزوتونیک ایجاد شده به وسیله استیل کولین<sup>۴</sup>-۱۰ مولار در ایلئوم مورد بررسی قرار گرفت و یافته‌ها نشان داد که هر دو ماده وراپامیل و اسانس مرزه بر انقباض ناشی از استیل کولین اثر مهارکنندگی داشته و همچنین غلظت‌های غیرمؤثره آنها نیز اثر هم‌افزایی در مهار انقباض داشته که از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

واژه‌های کلیدی: وراپامیل، اسانس مرزه (*Satureja hortensis* L.)، ضداسپاسمی، استیل کولین، ایلئوم، عضله صاف.

### مقدمه

از بار کاری قلب نیز کاسته می‌شود. بیش از ۹۰٪ دارو از راه خوراکی جذب می‌شود. به دلیل متابولیسم عبور اول از کبد، فراهمی زیستی آن ۳۵-۲۰ درصد است (Katzung et al., 2009). گیاه مرزه با نام علمی *Satureja hortensis* از تیره نعناع می‌باشد که در نواحی شمال غربی ایران، تبریز و نواحی مختلف خراسان می‌روید و دارای اثر نیرودهنده، تسهیل‌کننده عمل هضم و رفع اسهال و ضدکرم می‌باشد (Zargari, 2011). همچنین در رفع اسهال‌های عفونی و التهاب کولون

وراپامیل یک داروی مسدودکننده کانال کلسیمی می‌باشد که در بدن موجب جلوگیری از ورود کلسیم به داخل سلول‌ها می‌شود؛ به علت اثر مسدودکنندگی این دارو بر کانال‌های کلسیمی مقدار کلسیم در فیبرهای عضله قلب و عروق خونی کاهش می‌یابد که می‌تواند منجر به کاهش تعداد ضربان قلب و گشاد شدن عروق خونی گردد که در نتیجه آن فشار خون کاهش و جریان خون افزایش می‌یابد و

منابع طبیعی استان یزد به شماره (TARI-۵۸۴۱۶) قرار گرفته بود، در بالن تقطیر ریخته شد و بعد به آن، تا دو سوم حجم بالن آب مقطر اضافه گردید، سپس بالن به دستگاه کلونجر متصل شد و با حرارت دادن آن ۵ میلی لیتر اسانس بدست آمده جدا شد و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شد.

### روش انجام آزمایش ۳

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۷۰-۲۵۰ گرم استفاده گردید. حیوانات در شرایط استاندارد دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای  $22^{\circ}\text{C}$  با دسترسی مناسب به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه مداخلات مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی انجام شد.

پس از بیهوش کردن حیوانات توسط مخلوط کتامین و زیلازین قطعاتی از بخش انتهایی روده (ایلئوم) جدا گردید و پس از تمیز کردن تا انجام آزمایش در محلول تیروید نگهداری شدند. برای بررسی انقباضات ایلئوم قطعات یک سانتی متری از روده را جدا کرده و یک طرف آن را توسط نخ به قسمت پایین محفظه داخلی حمام بافت حاوی محلول تیروید ( $\text{CaCl}_2$  0.2g/L,  $\text{KCl}$  0.2g/L,  $\text{NaCl}$  8g/L,  $\text{NaHCO}_3$  1g/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.05g/L,  $\text{MgCl}_2$  0.1g/L و  $\text{D.glucose}$  1g/L) متصل و سر دیگر آن را به یک ترانسدیوسر ایزوتونیک که با دستگاه فیزیوگراف مرتبط بود، وصل کردیم. در تمام طول آزمایش، محلول تیروید توسط مخلوطی از ۹۵٪ اکسیژن و ۵٪ گاز کربونیک هوادهی شد و پس از حدود ۲۰ دقیقه که برای رسیدن دستگاه به وضعیت تعادل لازم بود انقباضات ایزوتونیک ایلئوم توسط دستگاه فیزیوگراف یک کاناله (Bioscience) ثبت شد. در هر دوره آزمایش یکی از محلول‌های مورد آزمایش با غلظت مورد نظر به حمام بافت اضافه شد و اثر آن بر انقباض ایلئوم ثبت گردید. پس از هر دوره آزمایش، بافت مورد نظر با محلول تیروید تازه شستشو و در صورت فعال بودن بافت، آزمایش

مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه دارای محتوای مناسبی از تانن و مواد چرب می‌باشد. اسانس آن دارای کارواکرول (۳۰٪) و سیمین (۲۵-۲۰٪) می‌باشد (Zargari, 2011). گونه‌های مختلف گیاه از نظر میزان اسانس و نوع ترکیب‌های تشکیل‌دهنده آن تنوع زیادی دارند و بر حسب نوع و درصد اجزاء تشکیل‌دهنده و نیز کاربرد اسانس متفاوت می‌باشد. اسانس بدست آمده از این گیاه در مرحله گلدهی آن می‌باشد که براساس یافته‌های Ahmadi و همکاران (۲۰۰۹) ترکیب‌های شناسایی شده در مرحله گلدهی کامل پاراسیمین (۲۱/۲٪) و کارواکرول (۶۲/۳٪) می‌باشند. براساس بررسی‌های انجام شده، غلظت‌های مختلف اسانس مرزه دارای اثر اسپاسمولیتیک و آنتی‌اسپاسمودیک بر ایلئوم می‌باشد (Hejazian et al., 2014b). انقباض عضلات صاف، وابسته به کلسیم و ATP می‌باشد. افزایش کلسیم سارکوپلاسمی در عضلات صاف موجب فعال شدن میوزین کیناز و فسفریلاسیون سر میوزین می‌شود و حاصل آن انقباض می‌باشد. بنابراین، نیروی انقباض عضله صاف معمولاً بستگی زیادی به غلظت یون کلسیم مایع خارج سلولی دارد و هر عاملی که بتواند موجب کاهش ورود کلسیم به داخل سلول‌های عضلانی شود پاسخ انقباضی آن را کاهش می‌دهد (Parnas et al., 2009). به طوری که بیشتر سازوکارهای تعدیل‌کننده انقباضات عضلات صاف لوله گوارش اثرات خود را به واسطه مهار کانال‌های کلسیمی اعمال می‌کنند (Cavalcante Fde et al., 2010؛ Nagao et al., 2011). با توجه به اثر ضدانقباضی این اسانس بر دستگاه گوارش (Hejazian et al., 2014b) هدف مطالعه حاضر بررسی اثر هم‌افزایی داروی وراپامیل و اسانس مرزه بر انقباضات ایزوتونیک در ایلئوم موش سفید آزمایشگاهی می‌باشد.

### مواد و روشها

روش تهیه نمونه

برای استخراج اسانس، ۱۰۰ گرم نمونه گیاهی خشک شده گیاه مرزه که مورد تأیید مرکز تحقیقات کشاورزی و

درصد تغییر وضعیت انقباضی به صورت میلی‌متر انحراف قلم برای هر محلول تعیین گردید و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس آزمون توکی مقایسه شد. ارزش  $(p < 0.05)$  به عنوان معیاری برای معنی‌دار بودن اختلاف در نظر گرفته شده است.

### نتایج

اثر اسپاسمولیتیک وراپامیل بر شدت انقباضات ایلئوم با اثر استیل کولین

بررسی اثرات اسپاسمولیتیک وراپامیل بر شدت انقباضات ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار نشان می‌دهد که غلظت یک و دو میکرومول وراپامیل شدت انقباض ناشی از استیل کولین را به ترتیب به میزان ۹٪ و ۱۵٪ کاهش می‌دهد که این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد (شکل ۱). در حالی که غلظت ۴ میکرومول آن انقباضات ناشی از استیل کولین را به میزان ۷۸٪ کاهش داده که از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد  $(p < 0.05)$ .

اثر اسپاسمولیتیک اسانس مرزه بر شدت انقباضات ایجاد شده به وسیله استیل کولین

در مرحله بعد، اثر اسپاسمولیتیک دوزهای مختلف اسانس مرزه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که اسانس مرزه با غلظت ۲۵ و ۵۰ نانوگرم/میلی‌لیتر دارای اثرات اسپاسمولیتیک نسبتاً ضعیفی است که از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد، اما زمانی که دوزهای بالاتر مرزه مورد استفاده قرار گرفت پاسخ متفاوتی مشاهده شد (شکل ۲). استفاده از غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر این اسانس شدت انقباضات را به ترتیب به میزان ۳۳٪ و ۸۲٪ کاهش می‌دهد که از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد  $(p < 0.05)$ .

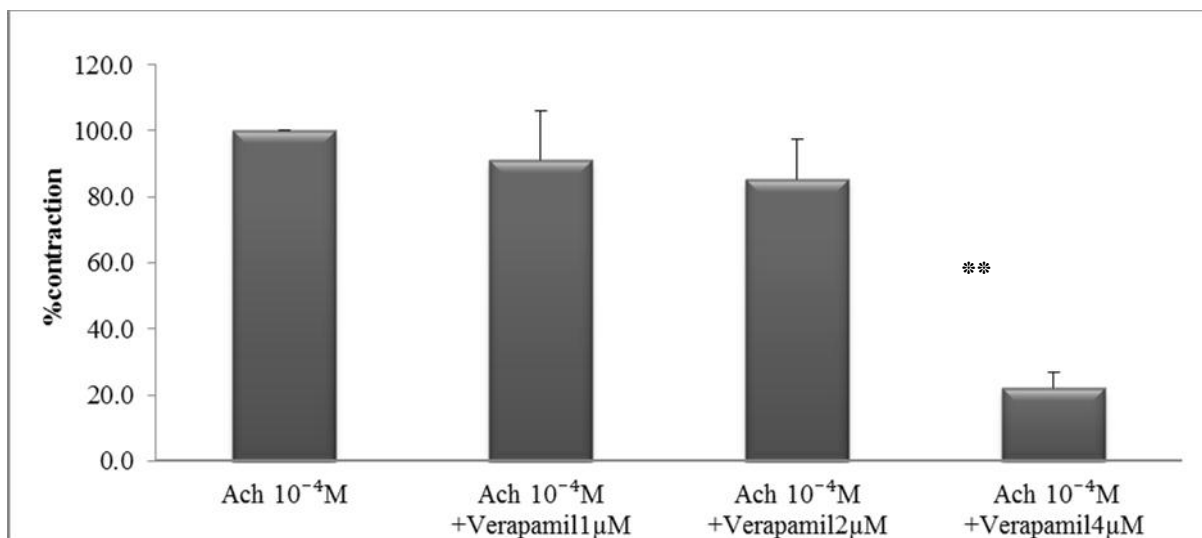
بعدی انجام شد. آنگاه هر محلول بر روی ۵ نمونه بافتی بررسی شده و تجزیه و تحلیل آماری بر روی میانگین درصد انقباض ناشی از استیل کولین انجام گردید. برای بررسی اثر داروهای مذکور، نمونه‌ها به گروه‌های زیر تقسیم شدند:

- ۱- گروه استیل کولین
- ۲- گروه وراپامیل با دوز ۱ میکرومول
- ۳- گروه وراپامیل با دوز ۲ میکرومول
- ۴- گروه وراپامیل با دوز ۴ میکرومول
- ۵- گروه مرزه با دوز ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر
- ۶- گروه مرزه با دوز ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر
- ۷- گروه مرزه با دوز ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر
- ۸- گروه مرزه با دوز ۲۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر
- ۹- گروه دریافت کننده وراپامیل با دوز ۱ میکرومول + مرزه با دوز ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر

### آزمایش آثار ضداسپاسمی

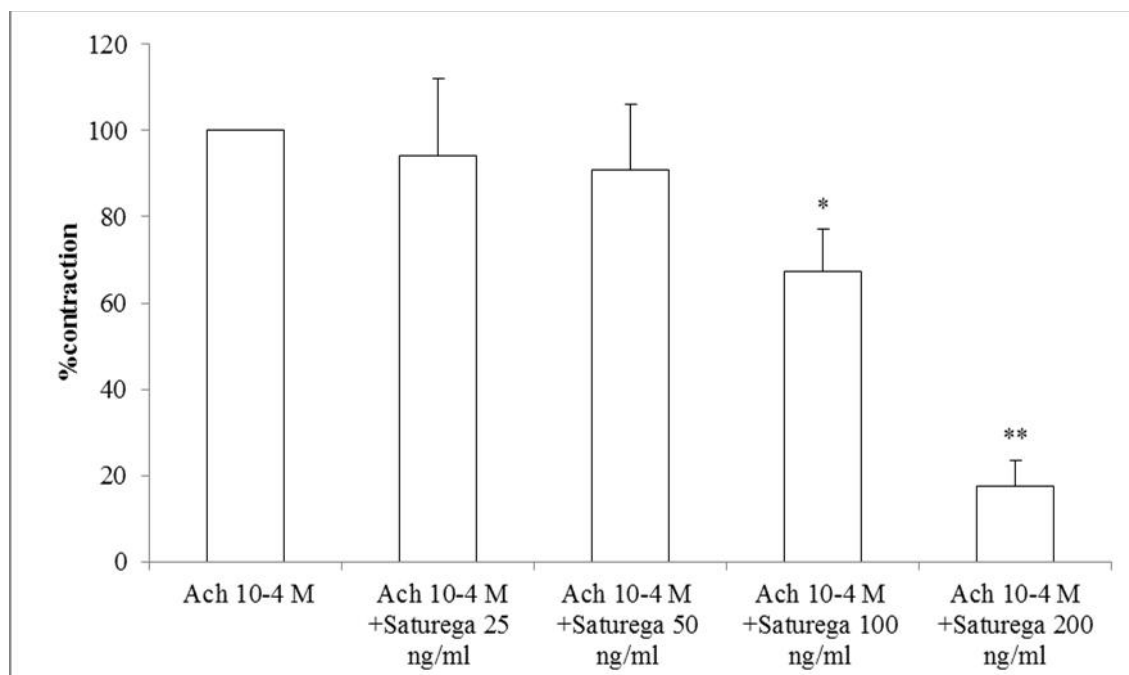
آثار اسپاسمولیتیک، در این روش ابتدا حداکثر انقباضات ایزوتونیک ایلئوم را با استفاده از استیل کولین (مرک-آلمان)  $10^{-4}$  مولار ایجاد کردیم. مطالعات قبل و از جمله مطالعه گروه ما نشان داد که استفاده از استیل کولین با دوز مذکور توانایی ایجاد حداکثر انقباض را در عضله ایلئوم دارد (Hejazian et al., 2014a). سپس در هر دوره آزمایش اثر محلول‌های مختلف وراپامیل (مرک-آلمان) و اسانس مرزه را بر انقباضات ایجاد شده در ایلئوم ثبت کردیم.

روش جمع‌آوری نتایج و تجزیه و تحلیل آماری به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS استفاده شد و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار



شکل ۱- مقایسه اثر اسپاسمولیتیک وراپامیل با دوزهای ۱، ۲ و ۴ میکرومول بر انقباضات ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار (n=5)

\*\* نشان دهنده  $p < 0.01$  می باشد.

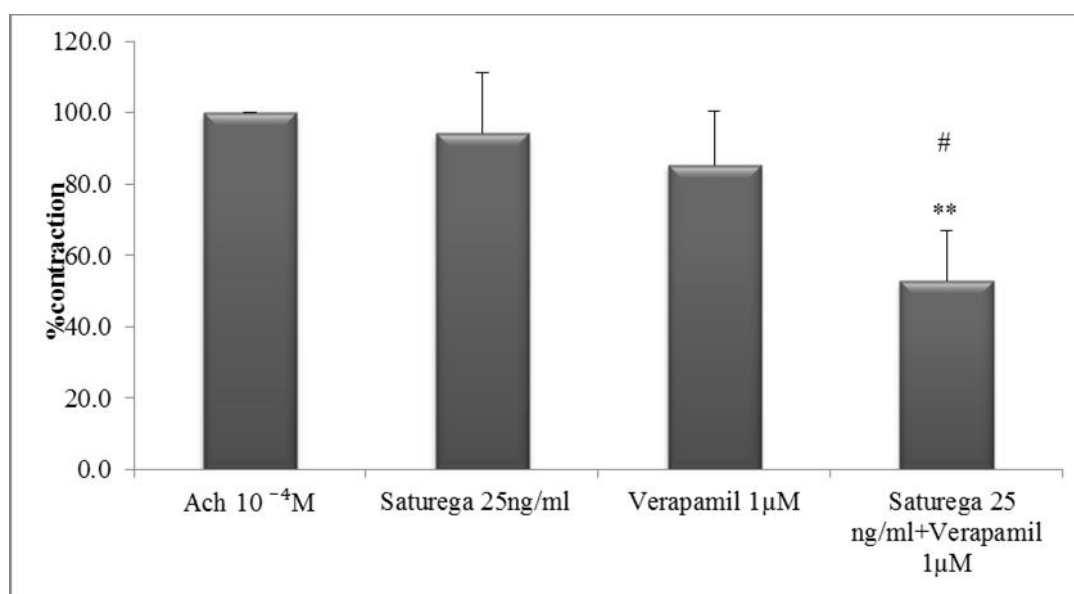


شکل ۲- مقایسه اثر اسپاسمولیتیک اسانس مرزه با غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم/میلی لیتر بر انقباضات ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار (n=5)

\* نشان دهنده  $p < 0.05$  و \*\* نشان دهنده  $p < 0.01$  می باشند.

نشان داده شده‌است تجویز دوز غیرمؤثره اسانس مرزه به همراه دوز غیرمؤثره وراپامیل شدت انقباض ناشی از استیل کولین را به میزان % کاهش داده که این کاهش در مقایسه با گروه استیل کولین معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.01$ ). همچنین کاهش شدت انقباضات در گروه دریافت‌کننده توأم داروها در مقایسه با گروه‌هایی که اسانس مرزه و یا وراپامیل را به تنهایی دریافت کردند نیز معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ).

اثر هم‌افزایی دوز غیر مؤثره اسانس مرزه و وراپامیل بر شدت انقباضات ایجاد شده به وسیله استیل کولین همان‌طور که در قسمت قبل نشان داده شد استفاده از وراپامیل با دوز ۱ میکرومول و همچنین مرزه با دوز ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر کاهش معنی‌داری در شدت انقباضات ناشی از استیل کولین ایجاد نکرد، بنابراین به‌منظور بررسی اثر سینرژیسم احتمالی این دو ترکیب از دوزهای مذکور به‌صورت توأم استفاده شد. همان‌گونه که در شکل ۳



شکل ۳- مقایسه اثر اسپاسمولیتیک دوزهای غیرمؤثره وراپامیل با دوز یک میکرومول به اضافه غلظت ۲۵ نانوگرم/میلی‌لیتر اسانس مرزه بر ضدانقباض ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار ( $n=5$ )

\*\*, نشان‌دهنده  $p < 0.01$  می‌باشد.

## بحث

انقباض عضلات صاف وابسته به کلسیم می‌باشد. غشای عضله صاف دارای کانال‌های کلسیمی دریچه‌دار وابسته به ولتاژ است و کلسیم در جهت شیب الکتروشیمیایی خود از طریق کانال‌های کلسیمی به سمت داخل حرکت می‌کند تا با افزایش غلظت کلسیم آزاد به افزایش قدرت انقباضی عضلات صاف کمک کند. هر عاملی که بتواند موجب کاهش ورود کلسیم به‌داخل سلول‌های عضلانی شود پاسخ انقباضی آن را کاهش می‌دهد (Parnas *et al.*, 2009). وراپامیل به‌عنوان یک مهارکننده کانال‌های کلسیمی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم اسانس مرزه شدت انقباضات ناشی از استیل کولین را کاهش می‌دهد اما در دوزهای پایین اثری بر این انقباضات نشان نمی‌دهد. در مورد وراپامیل نیز تنها دوز ۴ میکرومولار دارو توانست اثرات اسپاسمولیتیک نشان دهد. همچنین استفاده توأم دوز غیرمؤثره این اسانس به همراه وراپامیل به‌عنوان یک بلوکر کانال کلسیمی می‌تواند اثرات اسپاسمولیتیک معنی‌داری نشان دهد.

می‌تواند موجب مهار انقباض وابسته به دوز شود، به طوری که در این مطالعه این دارو در غلظت ۴ میکرومولار انقباضات ناشی از استیل کولین با دوز  $10^{-4}$  مولار را به میزان ۷۸٪ کاهش داده است که این نتایج همسو با نتایج مطالعه Leonhardt و همکاران (۲۰۱۰) می‌باشد. این محققان اثر روغن‌های فرّار گیاه *Pterodon polygalaeiflorus* بر انقباض ناشی از استیل کولین و میزان کلسیم را مورد آزمایش قرار داده و نتایج را با اثر وراپامیل مقایسه کردند. نتایج آنان نشان داد که اثر مهاری این ترکیب بر انقباض روده ناشی از تأثیر بر عضلات بوده و به طور کامل با واسطه سازوکار درون سلولی انجام شده و روغن‌های فرّار در این رابطه موجب کاهش ورود کلسیم به داخل سیتوپلاسم شده‌اند. در بررسی دیگری که توسط Brankovic و همکاران (۲۰۰۹) بر روی روغن‌های فرّار گیاه *Calamintha glandulosa* انجام شده نقش آن را در مهار کانال‌های کلسیمی مورد تأیید قرار داده و نشان می‌دهند که روغن‌های فرّار دارای یک اثر مهاری بر انقباض ایلئوم بوده که پس از شستشو قابل برگشت می‌باشد و این مؤید این است که این روغن بافت روده را تخریب نکرده و بر انقباض ناشی از پتاسیم مؤثر است؛ و همان‌گونه که مشخص شده است افزایش پتاسیم موجب فعال شدن کانال‌های کلسیمی متکی به ولتاژ غشاء شده و ورود کلسیم را زیاد می‌کند؛ بنابراین با توجه به اثر فوق، روغن‌های فرّار از طریق مهار ورود کلسیم به داخل سارکوپلاسم اثر گذاشته و منحنی غلظت پاسخ کلسیم را کاهش داده که این عمل مشابه اثر وراپامیل بوده و باعث عمل آنتاگونیستی بر کانال‌های کلسیمی می‌باشد که بر روی فعالیت خودبخودی ایلئوم نیز اثر داشته و اثر اسپاسمولیتیک آن از این راه اعمال می‌شود (Brankovic et al., 2009). بررسی Mahieu و همکاران (۲۰۰۷) نشان می‌دهد که تأثیر بعضی از گیاهان دارویی که دارای روغن فرّار می‌باشند از طریق کانال‌های زودگذر (transient receptor potential channels: TRP) بوده و این داروها در کنترل رهایش کلسیم و فراهمی آن نقش خود را ایفا

می‌کنند. کانال‌های TRP دسته بزرگی از کانال‌های یونی هستند که بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک همانند انقباض، لمس، فشار، شنوایی و بویایی را کنترل می‌کنند. کانال‌های کاتیونی TRP واسطه هدایت سدیم و کلسیم از طریق غشاء پلاسمایی به سیتوپلاسم می‌باشند و هدایت این یون‌ها برای دیپلاریزه شدن سلول‌های تحریک‌پذیر ضروریست (Song & Yuan, 2010). این کانال‌ها به وسیله تحریک گیرنده‌های موسکارینی در عضلات صاف روده فعال می‌شوند که حاصل آن انقباض این عضلات است و به موجب آن هدایت کلسیم افزایش یافته و حرکات روده تشدید می‌شود. کانال‌های مذکور بیشتر در بخش‌های انتهایی روده یعنی ایلئوم وجود دارند و در بخش‌های ابتدای آن و در معده کمتر دیده می‌شود (Tsvilovskyy et al., 2009). بررسی‌های فوق در خصوص نقش روغن‌های فرّار مبین این واقعیت است که مهمترین سازوکار آنتی‌اسپاسمودیک بر عضله صاف لوله گوارش مهار کانال‌های کلسیمی متکی به ولتاژ و جلوگیری از ورود کلسیم به داخل فیبر عضلانی از طریق این کانال‌ها می‌باشد. مطالعات نشان داده است که غلظت بالای از کارواکول در اسانس مرزه وجود دارد (Ahmadi et al., 2009). از طرفی در مورد اثر اسپاسمولیتیک کارواکول تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که کارواکول از طریق مهار کانال‌های گذرا (Parnas et al., 2009) و همچنین مهار کانال‌های کلسیمی (Earley et al., 2010) و نیز کاهش حساسیت اجزا انقباضی عضله به کلسیم می‌تواند اثرات اسپاسمولیتیک نشان دهد (Peixoto et al., 2010). البته مهار ورود کلسیم توسط بعضی از روغن‌های فرّار دیگر نیز نشان داده شده است (Leonhardt et al., 2010)؛ نکته که کارواکول با درصد نسبتاً بالایی در اسانس مرزه وجود دارد بخش عمده‌ای از آثار اسپاسمولیتیک اسانس مرزه بر انقباضات روده ممکن است به وسیله کارواکول انجام شده باشد. همچنین با توجه به اینکه دوز غیرمؤثره این اسانس به همراه دوز غیرمؤثره وراپامیل توانست اثرات

Basic and Clinical Pharmacology. McGraw Hill Professional, 1232p.

- Leonhardt, V., Leal-Cardoso, J.H., Lahlou, S., Albuquerque, A.A., Porto, R.S., Celedônio, N.R., Oliveira, A.C., Pereira, R.F., Silva, L.P., Garcia-Teófilo, T.M., Silva, A.P., Magalhães, P.J., Duarte, G.P. and Coelho-de-Souza, A.N., 2010. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent betacaryophyllene on rat isolated ileum. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 24(6): 749-758.
  - Mahieu, F, Owsianik, G., Verbert, L., Janssens, A., De Smedt, H., Nilius, B. and Voets, T., 2007. TRPM8-independent menthol-induced  $Ca^{2+}$  release from endoplasmic reticulum and Golgi. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(5): 3325-3336.
  - Nagao, M., Linden, L.D., Duenes, J.A. and Sarr, M.G., 2011. Mechanisms of action of the gastro transmitter hydrogen sulfide in modulating contractile activity of longitudinal muscle of rat ileum. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 15(1): 12-22.
  - Parnas, M., Peters, M., Dadon, D., Lev, S., Vertkin, I., Slutsky, I. and Minke, B., 2009. Carvacrol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium*, 45(3): 300-309.
  - Peixoto-Neves, D., Silva-Alves, K.S., Gomes, M.D., Lima, F.C., Lahlou, S., Magalhães, P.J., Ceccatto, V.M., Coelho-de-Souza, A.N. and Leal-Cardoso, J.H., 2010. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 24(3): 341-350.
  - Song, M.Y. and Yuan, J.X., 2010. Introduction to TRP channels: structure, function, and regulation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 661: 99-108.
  - Tsvilovskyy, V.V., Zholos, A.V., Aberle, T., Philipp, S.E., Dietrich, A., Zhu, M.X., Birnbaumer, L., Freichel, M. and Flockerzi, V., 2009. Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. *Gastroenterology*, 137(4): 1415-1424.
  - Zargari, A., 2011. *Medicinal Plants* (Vol. 4). University of Tehran Press, 948p, (In Persian).
- هم‌افزایی در جهت کاهش قابل توجه شدت انقباضات ایلیوم نشان دهد، می‌توان مهار کانال‌های کلسیمی را به‌عنوان یکی از سازوکارهای اثر اسانس مرزه بر انقباضات عضله صاف ایلیوم معرفی کرد.

#### منابع مورد استفاده

- Ahmadi, Sh., Sefidkon, F., Babakhanlo, P., Asgari, F., Khademi, K., Valizadeh, N. and Karimifar, M.A., 2009. Comparing essential oil composition of *Satureja bachtiarica* Bunge before and full flowering stages in field and provenance. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 25(2): 159-169.
- Brankovic, S.V., Kitic, D., Radenkovic, M.M., Veljkovic, S.M. and Golubovic, T.D., 2009. Calcium blocking activity as a mechanism of the spasmolytic effect of the essential oil of *Calamintha glandulosa* Silic on the isolated rat ileum. *General Physiology and Biophysics*, 28:174-178.
- Cavalcante Fde, A., Monteiro Fde, S., Martins, I.R., Barbosa, T.P., Camara Cde, A. and Pinto, A.C., 2010. Synthetic lapachol derivatives relax guinea-pig ileum by blockade of the voltage-gated calcium channels. *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 65(9-10): 627-636.
- Earley, S., Gonzales, A.L. and Garcia, Z.I., 2010. Dietary agonist of transient receptor potential cation channel V3 elicits endothelium-dependent vasodilation. *Molecular Pharmacology*, 77(4): 612-620.
- Hejazian, S.H., Bagheri, S.M. and Safari, F., 2014a. Spasmolytic and antispasmodic action of *Trachyspermum ammi* essence on rat's ileum contraction. *North American Journal of Medical Sciences*, 6(12): 643-647.
- Hejazian, S.H., Bameri, M. and Abassi Sarcheshma, A., 2014b. The effect of *Satureja* essential oil on acetylcholine induced contraction in male rats ileum. *Journal of Rafsangan Medical Science*, 13(4): 395-404.
- Katzung, B.G., Masters, S.B. and Trevor, A.J., 2009.

## The inhibitory synergistic effects of verapamil and *Satureja hortensis* essential oil on cholinergic contraction of rat ileum

S.H. Hejazian<sup>1\*</sup>, F. Safari<sup>2</sup> and M.Bameri<sup>3</sup>

1\*- Corresponding author, Department of Physiology/Herbal Medicine Research Center, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran, E-mail: hejaziansh@yahoo.com

2- Department of Physiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran.

3- Paradise University, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran

Received: December 2014

Revised: May 2015

Accepted: May 2015

### Abstract

Verapamil inhibits the cytosolic calcium content by blocking both activated and inactivated T-type calcium. Regarding the spasmolytic effect of materials caused by blockage of calcium channels and due to the inhibitory effect of *Satureja hortensis* L. on ileum smooth muscle contraction. The present study was designed to find out the synergistic effects of calcium blocker verapamil and *Satureja* essential oil on inhibition of cholinergic contraction in male rat's ileum. In this study, by using an oscillographic device, the effects of different concentration of *Satureja* essential oil and verapamil were examined on isotonic contraction of ileum induced by acetylcholine  $10^{-4}$ M. Our results showed that both verapamil and *Satureja* essential oils inhibited acetylcholine-induced contraction of ileum. In addition, their ineffective doses had synergistic spasmolytic effects, which were statistically significant ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** Verapamil, *Satureja hortensis* L., essential oil, spasmolytic, acetylcholine, ileum, smooth muscle.