

بررسی اثر ضداسپاسم اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دناپی روی انقباضات عضلات صاف ایلئوم موش صحرایی و ترانزیت روده در موش سوری

حسن صدرائی^۱، ریحانه فاتحی میبیدی^۲، افسانه یگدانه^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آویشن دناپی به صورت سنتی برای درمان اسهال و کرامپ‌های شکمی استفاده داشته است ولی تاکنون اثرات آن روی انقباضات روده گزارش نشده است. این مطالعه اثرات ضداسپاسم اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دناپی بر انقباضات عضلات صاف را مورد بررسی قرار داده است تا پتانسیل درمانی آن برای بیماری گوارشی معلوم گردد.

روش‌ها: رات‌های نر ویستار با با دی اکسیدکربن کشته شدند. قطعه‌ای از ایلئوم به دقت جدا شده و در حمام بافت حاوی محلول فیزیولوژیک تیروید اشباع شده با اکسیژن قرارداده شد و انقباضات توسط فیزیوگراف ثبت گردید. اثرات اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دناپی و آتروپین (کنترل مثبت) بر انقباضات القا شده توسط اسپاسموژن‌های KCl، استیل کولین و تحریک الکتریکی در ایلئوم رات بررسی شد. همچنین، اثرات این ترکیبات بر ترانزیت روده‌ای موش‌های سوری در دوزهای مختلف ارزیابی گردید.

یافته‌ها: اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دناپی هر دو به صورت وابسته به غلظت، انقباضات ناشی از اسپاسموژن‌ها را مهار کردند. اسانس در مقایسه با عصاره‌ی هیدروالکلی اثرات ضداسپاسم قوی‌تری نشان داد. مقدار IC₅₀ اسانس (غلظتی از دارو که ۵۰ درصد حداکثر اثر مهار را ایجاد کرده است) برای KCl، استیل کولین و تحریک الکتریکی به ترتیب $4.5 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ ، $6.2 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$ و $3.8 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد. درحالیکه مقادیر IC₅₀ برای عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دناپی به ترتیب $4.0 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ ، $3.7 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ و $3.9 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ تعیین شد. همانطور که انتظار میرفت آتروپین پاسخ انقباضی ناشی از استیل کولین و تحریک الکتریکی را مهار کرد ولی تأثیری روی انقباضات ناشی از KCl نداشت. در آزمایش ترانزیت خوراک چارکول (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ mg/kg) در موش سوری، هر دو ترکیب توانستند حرکت روده‌ای موش‌های سوری را به طور معنی‌دار کاهش دهند.

نتیجه‌گیری: اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دناپی اثرات ضداسپاسم قوی و برگشت‌پذیری بر عضلات صاف نشان دادند. بنابراین بالقوه می‌تواند برای بیماری‌های گوارشی همراه با اسپاسم مناسب باشد.

واژگان کلیدی: تحرکات روده؛ شل کننده‌ی عضلانی؛ تست چارکول؛ IC₅₀؛ گیاه آویشن

ارجاع: صدرائی حسن، فاتحی میبیدی ریحانه، یگدانه افسانه. بررسی اثر ضداسپاسم اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دناپی روی انقباضات عضلات صاف ایلئوم موش صحرایی و ترانزیت روده در موش سوری. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۵؛ ۴۴ (۸۶۵): ۹۳۲-۹۴۰.

مقدمه

اسپاسم عضلات روده، یکی از عوامل اصلی درد در سندرم روده تحریک‌پذیر (Irritable bowel syndrome) IBS است. در این سندرم، انقباضات غیرطبیعی و شدید عضلات روده می‌تواند منجر به درد شکمی، نفخ و سایر علائم IBS شود. اسپاسم روده بزرگ باعث انقباضات دردناک عضلات روده می‌شود که به صورت گرفتگی، درد

و ناراحتی در ناحیه‌ی شکم احساس می‌شود. گیاهان دارویی به دلیل داشتن مقادیر زیادی ترکیبات فعال با خواص بیولوژیکی یکی از منابع شناسایی داروهای جدید می‌باشند (۱). برخی از این گیاهان دارویی به طور مؤثر بر دستگاه گوارش از جمله اسپاسم ایلئوم اثر می‌گذارند (۲). آویشن دناپی (*Thymus daenensis*, Celak) یکی از گیاهان دارویی ایران است که بیشتر در زاگرس و برخی مناطق البرز می‌روید

۱- دانشیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی داروسازی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: حسن صدرائی؛ دانشیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
Email: sadraei@pharm.mui.ac.ir

درجه‌ی سانی‌گراد تغلیظ گردید. برای استخراج اسانس، از روش Hydrodistillation استفاده شد (۱۳). اسانس‌گیری با دستگاه clevenger انجام شد. اسانس استخراج شده از فاز آبی جدا و در یخچال نگهداری شد. بازده اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دنايي به ترتیب ۱ و ۱۸ درصد بود.

مواد و محلول‌ها

محلول تیروید (Tyrode's Solution)، محلول فیزیولوژیک مورد استفاده در این مطالعه بود که از حل کردن NaCl ($2/6\text{mM}$)، KCl ($1/4\text{mM}$)، NaH_2PO_4 ($0/42\text{mM}$)، CaCl_2 ($1/4\text{mM}$) و گلوکز ($5/55\text{mM}$) در آب مقطر تهیه شد. از اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دنايي به ترتیب استوک‌های 80mg/ml و 100mg/ml در حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) تهیه گردید. استوک آتروپین باغلظت 1mg/ml در آب مقطر تهیه گردید با نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شد. کلیه مواد شیمیایی متعلق به شرکت مرک (Merck) است.

مطالعه‌ی فارماکولوژی بر روی ايلئوم ایزوله (in vitro)

بررسی فعالیت ضداسپاسم اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دنايي روی بافت ايلئوم رات انجام شد. برای این منظور دستگاه اسیلوگراف (Harvard Oscillograph Apparatus, England) کالیبره و تحت یک گرم وزن برای ثبت انقباضات آماده گردید. صبح روز آزمایش یک رات نر با نژاد ویستار ($200-230\text{ gr}$) که در دمای اتاق و شرایط استاندارد لانه‌ی حیوانات دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان نگهداری شده با دی اکسیدکربن بیهوش و به روش مرگ بدون درد (Euthanized) کشته شد. پس از باز کردن شکم، بخشی از ايلئوم به طول ۱۰ سانتی‌متر جدا شده و در محلول تیروید اکسیژن‌دهی شده قرار گرفت. قطعه‌ای از ايلئوم (۳-۱ سانتی‌متر)، در حمام بافت (Palmer organ bath, England) حاوی محلول تیروید قرار داده شد و به ترانس‌دیوسر ایزوتونیک متصل و انقباضات آن توسط دستگاه فیزیوگراف ثبت شد. پس از پایداری بافت، با استفاده از اسپاسموژن‌های استیل کولین (ACh)، KCl و یا تحریک الکتریکی (EFS (Electrical field stimulation)، ايلئوم رات منقبض شد. اثر اسانس و عصاره هیدروالکلی آویشن دنايي بعد از ۱۰ دقیقه تماس با بافت روی این انقباضات بررسی و با حامل و داروی استاندارد آتروپین مقایسه شد. داروها مستقیماً به حمام بافت اضافه شدند. جهت القای تحریک الکتریکی توسط دستگاه Stimulator، جریان الکتریکی با ولتاژ ۶ V و فرکانس ۵۰ Hz به مدت اثنایه بین دو الکترود پلاتینی عبور داده شد. غلظت‌های مورد استفاده برای اسانس و عصاره هیدروالکلی آویشن دنايي بر اساس مطالعات قبلی بر روی رحم به ترتیب از غلظت‌های 2mg/ml و 20mg/ml شروع شد ولی طبق

(۳). در ایران به طور سنتی، دم کرده و جوشانده برگ‌ها و سرشاخه‌های گلدار این گیاه به عنوان ضدنفخ، هضم‌کننده غذا، ضداسپاسم، ضدسرفه، خلط آور و در درمان سرماخوردگی مصرف می‌شود و همچنین به عنوان نوشیدنی (چای) و طعم دهنده‌ی غذایی (ادویه و چاشنی) به کار می‌رود (۴).

ترکیبات شیمیایی آویشن دنايي مشابه *Thymus vulgaris* و *Zataria multiflora* است (۵). ترکیبات این گونه شامل مونوترپن‌های اکسیژن‌دار مانند تیمول ($4/2$ تا $85/2$ درصد)، کارواکرول و به میزان کمتر ژرانیول، بورنئول و سینئول است (۶). همچنین تانن‌ها، ساپونین‌ها و فلاونوئیدها در عصاره‌ی آن گزارش شده‌اند (۷). حضور رزمارینیک اسید، ترکیب مسئول خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره، نیز گزارش شده است (۸، ۹). بر اساس مطالعات اسانس این گیاه فعالیت ضد میکروبی قلیل‌توجهی علیه *Staphylococcus aureus* و قارچ‌های *Aspergillus niger* و *Candida albicans* دارد (۱۰، ۱۱).

در مطالعه‌ی دیگری بر روی بافت رحم رات نشان داده شد که عصاره‌ی هیدروالکلی و اسانس آویشن دنايي بصورت وابسته به غلظت انقباضات رحمی ناشی از اسپاسموژن‌ها را مهار می‌کند (۱۲). از آنجا که آویشن دنايي به عنوان یکی از گیاهان بومی ایران با پراکنش گسترده، در طب عامیانه مورد استفاده قرار می‌گیرد، ضرورت انجام پژوهش‌های جامع برای ارزیابی اثرات فارماکولوژیک آن، به‌ویژه در درمان اختلالات اسپاسمی روده، بیش از پیش احساس می‌شود. اثرات ضداسپاسمودیک گیاه آویشن دنايي روی روده تاکنون گزارش نشده است. اسانس گیاهان معمولاً حاوی ترکیبات فعال ضداسپاسم هستند و جداسازی آنها نسبتاً ساده است و لذا در این مطالعه، اثرات اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دنايي بر انقباضات ايلئوم مورد بررسی قرار می‌گیرد. هدف اصلی این مطالعه، ارزیابی پتانسیل ضداسپاسم این گیاه و مقایسه‌ی آن با یک داروی ضداسپاسم شناخته شده از جمله یک آنتاگونیست موسکارینی مثل آتروپین است.

روش‌ها

اندام‌های هوایی گیاه آویشن دنايي در فصل گلدهی (شهریورماه ۱۴۰۱) از مزرعه شرکت کشت پرتیکان واقع در فریدون‌شهر جمع‌آوری و در سایه خشک شد. عصاره‌گیری به روش ماسیراسیون انجام شد (۱۳). پودر گیاه در اتانول ۷۰ درصد خیسانده شد و بعد از ۲ ساعت در داخل پرکولاتور ریخته و مخزن آن با اتانول ۷۰ درصد به نسبت ۸ به ۱ پر شد. پس از ۷۲ ساعت خیساندن، عصاره جدا شد و مخزن مجدداً با اتانول پر شد. این فرایند ۳ مرتبه تکرار شد. عصاره‌های حاصله ترکیب شده و با استفاده از دستگاه روتاری در دمای ۴۰

درصد حداکثر اثر مهاری را ایجاد کرده است) برای هر بافت تعیین گردید. هر آزمایش بر روی ۶ بافت مجزا انجام شد. در مطالعات *in vivo* مسافت طی شده توسط چارکول به صورت درصد حرکت چارکول از پیلور در طول روده کوچک به کل روده محاسبه گردید. هر آزمایش بر روی ۱۰ موش سواری انجام شد. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شد. برای مقایسه از تست آماری ANOVA و Student's t-test و به منظور رسم منحنی‌ها از نرم‌افزار SigmaPlot استفاده شد. مقدار $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتیجه‌ی مطالعه‌ی فارماکولوژی بروی ایلئوم ایزوله (*in vitro*)

با اضافه کردن KCl ($80 \mu\text{M}$) به حمام بافت، انقباضات تونیک در ایلئوم رات مشاهده شد. اسانس و عصاره به صورت وابسته به غلظت، این انقباضات را مهار کردند (شکل ۱). اثر مهاری اسانس با غلظت $0.4 \mu\text{g/ml}$ و بالاتر نسبت به گروه شاهد دریافت‌کننده‌ی حامل معنی‌دار بود و در غلظت $12.8 \mu\text{g/ml}$ به‌طور کامل انقباضات را مهار کرد. مقدار IC_{50} برای اسانس برابر $5.4 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد. اثر مهاری عصاره هیدروالکلی از غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ و بالاتر نسبت به گروه شاهد دریافت‌کننده حامل معنی‌دار بود و در غلظت $800 \mu\text{g/ml}$ انقباضات به‌طور کامل مهار شدند. مقدار IC_{50} برای عصاره $408 \pm 41 \mu\text{g/ml}$ محاسبه شد. اثر مهاری اسانس و عصاره بعد از شستشوی بافت با محلول تیروید برگشت‌پذیر بود.

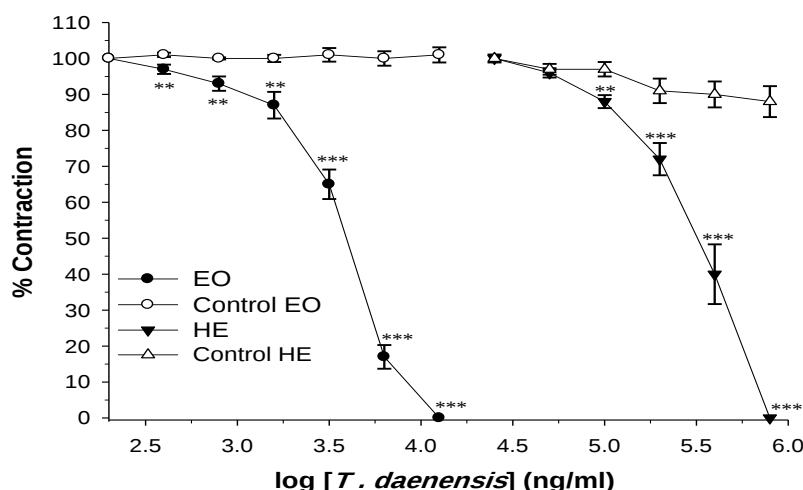
آزمایشات پیلوت اصلاح گردید. آزمایشات برای KCl به صورت تجمعی (Cumulative) و برای ACh و EFS به صورت غیرتجمعی (Non-Cumulative) انجام گرفت.

مطالعه فارماکولوژی بروی ترانزیت روده (*in vivo*)

این بخش از آزمایش بر روی گروه‌های ده‌تایی موش سواری (۲۵-۳۰ gr) انجام گرفت. یک شب قبل غذای موش‌ها حذف گردید، ولی دسترسی به آب آشامیدنی داشتند. صبح روز آزمایش، موش‌های مورد مطالعه از لانه حیوانات دانشکده به آزمایشگاه منتقل و به مدت یک ساعت برای سازگاری با محیط در قفس نگهداری شدند. کلیه‌ی داروها به‌صورت خوراکی (گاواژ) تجویز گردید و با گروهی که حامل را دریافت کردند مقایسه شدند. به این‌صورت که اسانس یا عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دنايي، یا آتروپین به صورت خوراکی به موش‌ها داده شد و نیم ساعت بعد 0.5 ml از سوسپانسیون شامل ۳ درصد چارکول و ۵ درصد سوسپانسیون کتیرا به‌صورت خوراکی دریافت کردند. ۴۵ دقیقه بعد موش‌ها با دی اکسیدکربن کشته و پس از جدا کردن ایلئوم مسافت حرکت چارکول در روده با خط کش اندازه‌گیری شد. براساس آزمایشات پیلوت، اثر اسانس و عصاره با ۳ دوز خوراکی (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ mg/kg) بررسی شد.

اندازه‌گیری اسپاسم و تحلیل آماری

در مطالعات *in vitro* ارتفاع انقباضات ثبت شده برای هر بافت بدقت اندازه‌گیری و درصد آن نسبت به انقباض اولیه محاسبه گردید. منحنی غلظت- پاسخ ترسیم و مقدار IC_{50} (غلظتی از دارو که ۵۰



شکل ۱. اثر رفع انقباضی عصاره‌ی هیدرو الکلی (HE) و اسانس آویشن دنايي (EO) و حامل آنها بر اسپاسم ناشی از KCl (۸۰ mM) در ایلئوم رات.

محور عمودی درصد پاسخ انقباضی و محور افقی Log_{10} غلظت‌های آویشن دنايي بر حسب ng/ml است. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است ($n = 6$). نوسانات مشاهده شده در گروه‌های کنترل که معادل حجمی حامل (DMSO) را دریافت کرده بودند، از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (ANOVA). ستاره‌ها بیانگر تفاوت معنی‌دار بین اسانس یا عصاره با گروه کنترل است (Student's t-test; $***P < 0.001$ و $**P < 0.01$). حداکثر غلظت DMSO در حمام بافت، ۰/۴ درصد است.

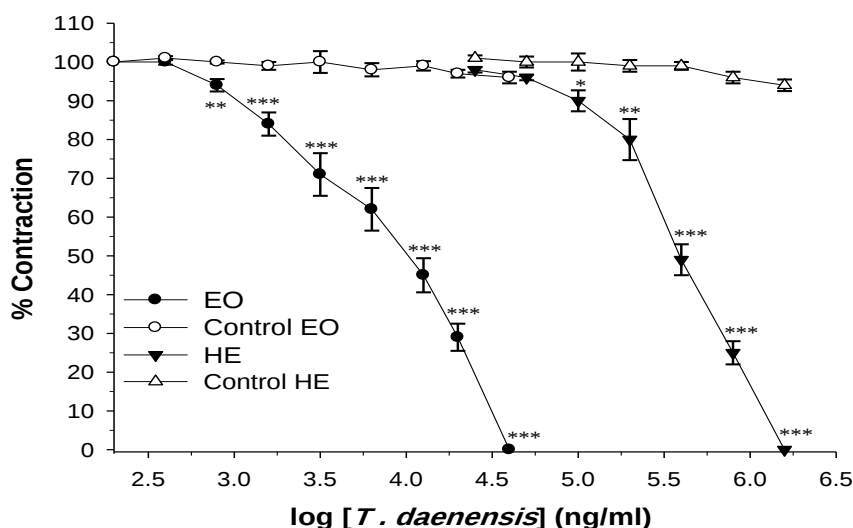
عصاره بعد از شستشوی بافت با محلول تیروید برگشت پذیر بود. آتروپین، به صورت وابسته به غلظت و برگشت پذیر، موجب مهار انقباضات ناشی از ACh ($1\mu\text{M}$) و EFS شد. مقدار IC_{50} برای آتروپین در انقباضات ناشی از ACh و EFS به ترتیب $28/9 \pm 19/0 \mu\text{g/ml}$ و $30/2 \pm 19/2 \mu\text{g/ml}$ تعیین شد. آتروپین در غلظتهایی که انقباضات ناشی از ACh و EFS را به صورت ۱۰۰ درصد مهار کرد، اثری بر انقباضات ناشی از KCl نداشت (شکل ۴).

نتیجه‌ی مطالعه‌ی فارماکولوژی پروری ترانزیت روده (*in vivo*)

در موش‌هایی که حامل دارو را دریافت کرده بودند (گروه کنترل)، در مدت ۴۵ دقیقه خوراک چارکل بیشتر طول روده را طی کرده بود ($1/5 \pm 97$ درصد). به دنبال تجویز خوراکی اسانس و عصاره هیدروالکلی آویشن دنايي و آتروپین، میزان حرکت چارکل در روده کاهش یافت. در موش‌هایی که آتروپین (1mg/kg) دریافت کردند، حرکت چارکل نسبت به گروه شاهد، ۵۰ درصد کاهش نشان می‌دهد (شکل ۵). اثر مهاری اسانس آویشن دنايي با دوز 50 mg/kg و بالاتر نسبت به گروه شاهد دریافت‌کننده‌ی حامل معنی‌دار بود (شکل ۵). با دوز 200 mg/kg اسانس، حرکت چارکل نسبت به گروه شاهد، ۶۷ درصد کاهش یافت. تجویز دوز 50 mg/kg خوراکی عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دنايي، تفاوت معنی‌داری در میزان حرکت چارکل با گروه کنترل مشاهده نشد ولی با دوز 100mg/kg عصاره کاهش معنی‌دار حاصل شد. با افزایش دوز به 200 mg/kg ، حرکت چارکل نسبت به گروه شاهد، ۴۸ درصد کاهش یافت (شکل ۵).

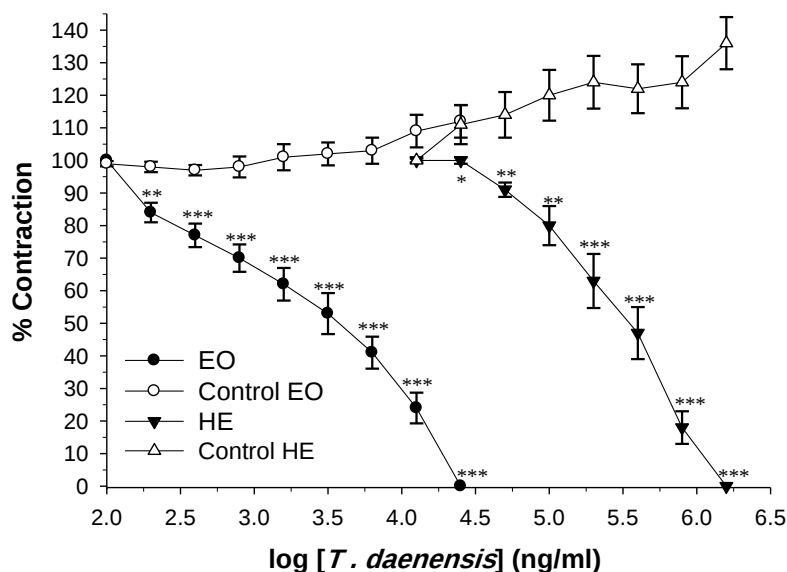
با اضافه کردن استیل کولین ($1\mu\text{M}$) به حمام بافت انقباضات فازیک مشاهده شد. عصاره و اسانس آویشن دنايي اثر مهاری روی انقباضات ناشی از استیل کولین داشتند (شکل ۲). اثر مهاری اسانس از غلظت $0/8\mu\text{g/ml}$ و بالاتر نسبت به گروه شاهد دریافت‌کننده‌ی حامل معنی‌دار بود و در غلظت $50\mu\text{g/ml}$ به‌طور کامل انقباضات را مهار کرد. مقدار IC_{50} برای اسانس $6/2 \pm 0/7\mu\text{g/ml}$ تعیین شد. اثر مهاری عصاره از غلظت $100\mu\text{g/ml}$ و بالاتر نسبت به گروه شاهد دریافت‌کننده‌ی حامل معنی‌دار بود و در غلظت $1600\mu\text{g/ml}$ انقباضات به‌طور کامل مهار شدند. مقدار IC_{50} برای عصاره $370 \pm 47\mu\text{g/ml}$ محاسبه شد. اثر مهاری اسانس و عصاره بعد از شستشوی بافت با محلول تیروید برگشت پذیر بود.

تحریک الکتریکی بافت (EFS)، انقباضات دو مرحله‌ای در ایلئوم ایزوله رات ایجاد کرد. انقباضات مرحله‌ی اول بلندتر و واضح‌تر بود، بنابراین مورد آنالیز این پژوهش قرار گرفت. اسانس و عصاره‌ی آویشن دنايي انقباضات ناشی از تحریک الکتریکی را مهار کردند (شکل ۳). اثر مهاری اسانس از غلظت $0/2\mu\text{g/ml}$ و بالاتر نسبت به گروه شاهد دریافت‌کننده‌ی حامل معنی‌دار بود و در غلظت $250\mu\text{g/ml}$ به‌طور کامل انقباضات را مهار کرد. مقدار IC_{50} برای اسانس $3/8 \pm 0/6\mu\text{g/ml}$ تعیین شد. اثر مهاری عصاره از غلظت $50\mu\text{g/ml}$ و بالاتر نسبت به گروه شاهد دریافت‌کننده‌ی حامل معنی‌دار بود و در غلظت $1600\mu\text{g/ml}$ انقباضات به‌طور کامل مهار شدند. مقدار IC_{50} برای عصاره $319 \pm 73\mu\text{g/ml}$ محاسبه شد. اثر مهاری اسانس و



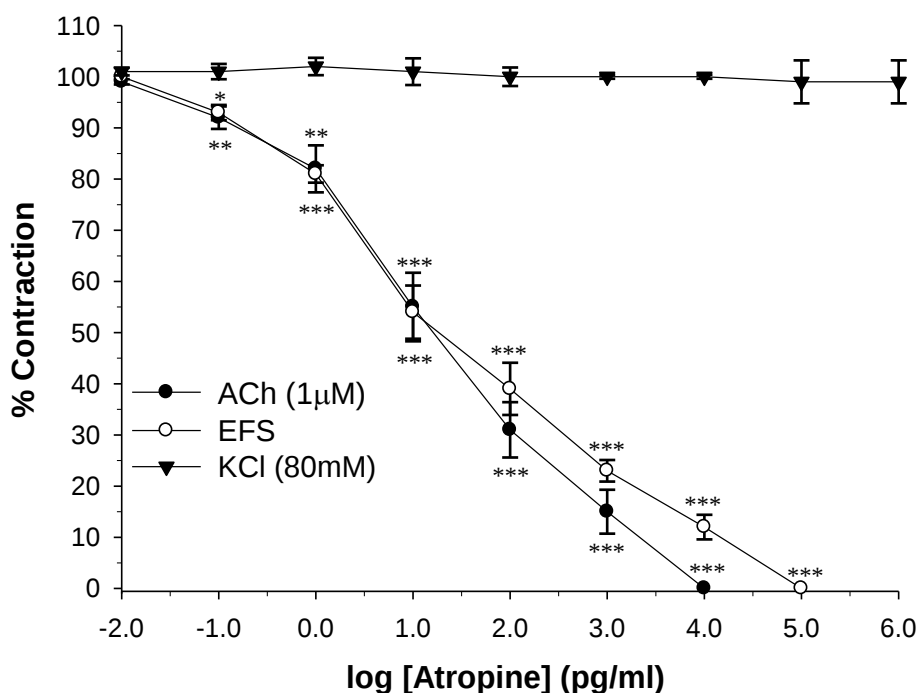
شکل ۲. اثر رفع انقباضی عصاره‌ی هیدروالکلی (HE) و اسانس آویشن دنايي (EO) و حامل آنها بر اسپاسم ناشی از استیل کولین ($1\mu\text{M}$ ACh) در ایلئوم رات.

محور عمودی درصد پاسخ انقباضی و محور افقی Log_{10} غلظت‌های گیاه آویشن دنايي بر حسب ng/ml است. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است ($n = 6$). نوسانات مشاهده شده در گروه‌های کنترل که معادل حجمی حامل (DMSO) را دریافت کرده بودند از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (ANOVA). ستاره‌ها بیانگر تفاوت معنی‌دار بین اسانس یا عصاره با گروه کنترل است (Student's t-test; $*** P < 0/001$ و $** P < 0/01$ و $* P < 0/05$). حداکثر غلظت DMSO در حمام بافت، ۲ درصد است.



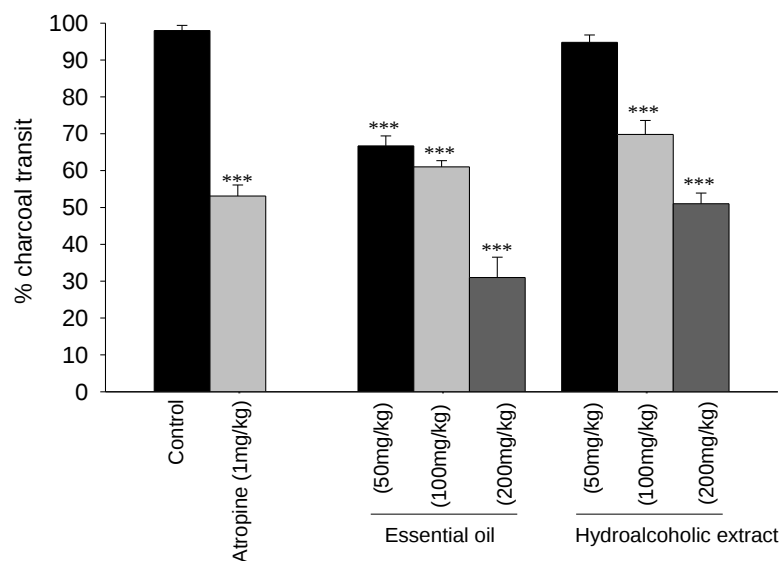
شکل ۳. اثر رفع انقباضی عصاره‌ی هیدروالکلی (HE) و اسانس آویشن دنايي (EO) و حامل آنها بر اسپاسم ناشی از تحریک الکتریکی (EFS). زمان تماس ۱ ثانیه، ولتاژ ۶V در ایلئوم رات.

محور عمودی درصد پاسخ انقباضی و محور افقی Log10 غلظت‌های گیاه آویشن دنايي بر حسب ng/ml است. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است (n = 6). نوسانات مشاهده شده در گروه‌های کنترل که معادل حجمی حامل (DMSO) را دریافت کرده بودند از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (ANOVA). ستاره‌ها بیانگر تفاوت معنی‌دار بین اسانس یا عصاره با گروه کنترل است (Student's t-test; $P < 0.001$ و $P < 0.01$ و $P < 0.05$). حداکثر غلظت DMSO در حمام بافت، ۱ درصد است.



شکل ۴. اثر آتروپین روی انقباضات ناشی از استیل کولین (ACh, ۱μM) و KCl (۸۰ mM)، و تحریک الکتریکی (EFS). زمان تماس ۱ ثانیه و ولتاژ ۶V در ایلئوم رات.

محور عمودی درصد پاسخ انقباضی و محور افقی Log10 غلظت‌های آتروپین بر حسب pg/ml است. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است (n = 6). نوسانات مشاهده شده در گروه‌هایی که تحت تأثیر KCl قرار گرفته بودند از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (ANOVA). ستاره‌ها بیانگر تفاوت معنی‌دار بین اثر آتروپین روی انقباضات ناشی از ACh و EFS با اثر آتروپین روی انقباضات ناشی از KCl است (Student's t-test; $P < 0.001$ و $P < 0.01$ و $P < 0.05$).



شکل ۵. نتایج حاصل از تأثیر اسانس، عصاره‌ی هیدروالکلی و آتروپین به صورت خوراکی بر روی ترانزیت روده (۰/۵ ml خوراک چارکول) در موش سوری. محور عمودی درصد ترانزیت چارکل در طول روده کوچک است. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است ($n = 10$). ستاره‌ها بیانگر تفاوت معنی‌دار بین اسانس، عصاره و آتروپین با گروه کنترل است ($*** P < 0.001$; Student's t-test).

مطالعه، آتروپین به عنوان داروی شناخته شده آنتی‌موسکارینی حتی در بالاترین غلظت مورد استفاده (100 nM) هم بر روی انقباضات ناشی از KCl تأثیری نداشت، زیرا آتروپین یک آنتاگونیست گیرنده موسکارینی است و این گیرنده‌ها نقشی در فرایند انقباضات ناشی از KCl ندارند (۱۷).

اسپاسموژن مورد استفاده دیگر، استیل‌کولین، با اتصال به گیرنده‌های موسکارینی نوع M_3 در عضلات صاف، مسیر فسفوانیزیتول را فعال کرده و از طریق افزایش DAG و IP_3 ، کلسیم را از ذخایر داخل سلولی آزاد می‌کند (۱۷، ۱۸). آتروپین یک آنتاگونیست گیرنده موسکارینی است و انقباضات ناشی از ACh را به صورت کامل مهار کرد. مهار انقباضات ناشی از استیل‌کولین توسط اسانس و عصاره‌ی آویشن دنايي نشان‌دهنده فعالیت مشابه آنتاگونیست‌های موسکارینی است. در مورد اسانس آویشن دنايي این اثر ممکن است به دلیل حضور ترکیباتی مانند تیمول و کارواکرول باشد که در مطالعات قبلی به عنوان مهارکننده‌های مؤثر گیرنده‌های موسکارینی گزارش شده‌اند (۱۹-۲۱).

در این مطالعه، علاوه بر دو اسپاسموژن یاد شده از تحریک الکتریکی (EFS) نیز برای ایجاد انقباض در بافت ایلئوم استفاده شد. EFS با تحریک نورن‌های موجود در دیواره‌ی روده موجب انقباضی دو مرحله‌ای شد. شبکه‌ی عصبی دیواره‌ی روده حاوی نورون‌های غیرآدرنرژیک- غیرکولینرژیک (NANC) نیز می‌باشد (۱۴).

بحث

حرکات دودی، عامل اصلی جلو راندن محتویات دستگاه گوارش است. افزایش این حرکات موجب اسهال و کرامپ شکمی می‌شود (۱۴). برای کاهش اسپاسم‌های شکمی و کنترل اسهال معمولاً از اپیوئیدها مثل دی فنوکسیلات، لوپرامید و آنتاگونیست‌های موسکارینی مانند دی سیکلومین استفاده می‌شود. داروهایی گیاهی با خواص مشابه همیشه مورد استقبال مردم بوده است. بنابراین گیاهان دارویی می‌توانند یک جایگزین برای این داروها باشند (۱، ۱۴). یکی از این گیاهان می‌تواند آویشن دنايي باشد که به طور سنتی در ایران مصرف داشته است. این پژوهش نشان داد که اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دنايي دارای اثرات ضداسپاسم وابسته به غلظت و برگشت‌پذیر بر انقباضات عضلات صاف ایلئوم رات هستند.

یکی از اسپاسموژن‌هایی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت KCl بود. KCl از طریق دیپولاریزاسیون غشاء سیتوپلاسمی و فعال‌سازی کانال‌های کلسیمی نوع L ، با افزایش ورود کلسیم داخل سلولی موجب انقباض عضلات صاف ایلئوم می‌شود (۱۵). اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دنايي با مهار انقباضات ناشی از KCl، نشان دادند که احتمالاً قادر به مسدود کردن کانال‌های کلسیمی یا کاهش پاسخ به کلسیم داخل سلولی هستند. این یافته با مطالعاتی که اثر ترکیبات فنولی و مونوترپن‌های موجود در گیاهان را بر مهار کانال‌های کلسیمی نشان داده‌اند، همخوانی داشت (۱۶). در این

و ۵۰ درصد کاهش دادند (شکل ۵). این یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی پتانسیل اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دنايي به‌عنوان عوامل ضداسپاسم در شرایط *in vitro* و *in vivo* است. علاوه بر این، اثرات برگشت‌پذیر آنها بر روی عضلات صاف در مطالعات *in vitro* نشان‌دهنده‌ی این است که مهار انقباضات موجب آسیب بافتی نشده است. با این حال، استفاده بالینی از اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دنايي مستلزم کامل شدن مطالعات فارماکولوژی و توكسیکولوژی است. اسانس‌ها ترکیبات فراری هستند که به راحتی از طریق تقطیر استخراج می‌شوند و لذا ناخالصی کمتری دارند. اسانس‌ها به دلیل غلظت بالاتر ترکیبات فعال، معمولاً اثر قوی‌تری نسبت به عصاره‌ی هیدروالکلی دارند. در مقابل، در عصاره هیدروالکلی که با استفاده از حلال آب و الکل، ترکیبات گیاهی استخراج شده است، مواد غیرفعال بیشتری را وجود دارد. علاوه بر این در فرایند تغلیظ کردن عصاره توسط دستگاه روتاری، بیشتر اسانس‌های موجود در عصاره هیدروالکلی نیز تبخیر می‌شوند و لذا نسبتاً غلظت کمتری از ترکیبات فعال در عصاره‌ی هیدروالکلی باقی می‌ماند.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این پژوهش، اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دنايي دارای اثرات ضداسپاسم وابسته به غلظت روی روده هستند. در این مطالعه، اسانس پوتنسی بیشتری نسبت به عصاره داشت برای مهار انقباضات ایلئوم داشت، به طوری که تفاوت غلظت بین این دو حدود ده برابر بود. هر دو ترکیب توانستند انقباضات ناشی از اسپاسموژن‌های مختلف را مهار کنند، اما اسانس به دلیل محتویات بالای ترکیبات مؤثرتر مانند تیمول و کارواکرول، اثرات قوی‌تری نشان داد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه‌ی مقطع دکتری عمومی رشته‌ی داروسازی با کد ۳۴۰۲۱۱۷ می‌باشد که در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به تصویب رسیده و با حمایت مالی معاونت پژوهشی به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از زحمات آن معاونت تقدیر و تشکر می‌شود.

نورون‌های غیرآدرنژیک- غیرکولینرژیک به صورت ایاف حسی و حرکتی وجود داشته و نقش مهمی در حرکات دستگاه گوارش دارند. این سیستم اطلاعات حسی را به اعصاب مرکزی فرستاده و فعالیت دستگاه گوارش را تعدیل می‌کند. تحریک الکتریکی موجب آزادسازی نوروترانسمیترهای متعدد از شبکه‌ی عصبی دیواره‌ی روده می‌شود. علاوه بر استیل‌کولین، نوروترانسمیترهای غیرکولینرژیک مانند NO (Nitric oxide)، ATP (Adenosine 5'-triphosphate) و VIP (Vasoactive intestinal polypeptide) نیز در این مسیر نقش دارند (۱۴، ۲۲). مهار کامل انقباضات ناشی از EFS توسط اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دنايي حاکی از اثر چندجانبه این ترکیبات بر مسیرهای مختلف تنظیم‌کننده‌ی انقباض عضلات صاف است. آتروپین، در غلظت‌هایی که اثرات استیل‌کولین را کاملاً بلوکه کرد، انقباضات ناشی از EFS را به میزان ۸۸ درصد مهار کرد. این تفاوت، بیانگر نقش سایر نوروترانسمیترها در انقباضات ایجاد شده توسط EFS است.

مطالعات قبلی روی ایلئوم رات نشان داده است که نیفدپین به صورت وابسته به غلظت انقباضات تونیک ناشی از KCl (80mM) را مهار می‌کند ($IC_{50} = 2/5 \pm 0/8 \text{ nM}$). نیفدپین با غلظت ۵۰ nM انقباضات ناشی از KCl کاملاً مهار کرد ولی ۳۹ درصد انقباضات ناشی از استیل‌کولین و ۱۳ درصد انقباضات ناشی از تحریک الکتریکی کماکان باقی مانده بود (۲۳). این یافته‌ها بیانگر این است که در مورد KCl، فعال شدن کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ عمدتاً مسئول ورود کلسیم به درون سلول‌های عضلات صاف ایلئوم است (۱۵). مهار نسبی انقباضات ناشی از استیل‌کولین توسط نیفدپین بدین علت است که آزادسازی کلسیم از ذخائر درون سلولی در انقباضات ناشی از استیل‌کولین نیز نقش دارند (۱۷).

در بررسی اثر آویشن دنايي بر روی ترانزیت روده، اسانس و عصاره‌ی هیدروالکلی آویشن دنايي موجب کاهش معنی‌دار حرکت چارکول در روده موش سوری شدند ($P < 0/001$). با دوز خوراکی ۲۰۰ mg/kg اسانس و عصاره هیدروالکلی، حرکت روده را به ترتیب ۳۱

References

1. Zhang L, Song J, Kong L, Yuan T, Li W, Zhang W, et al. The strategies and techniques of drug discovery from natural products. J Clin Pharm Therap. 2020; 216: 107686.
2. Sadraei H, Ghannadi A, Malekshahi K. Relaxant effect of essential oil of Melissa officinalis and citral on rat ileum contractions. Fitoterapia 2003; 74(5): 445-52.
3. Bahreininejad B, Razmjou J, Mirza M. Influence of water stress on morpho-physiological and phytochemical traits in Thymus daenensis. Int J Plant Prod. 2013; 7(1): 151-66.
4. Zarshenas MM, Krenn L. A critical overview on Thymus daenensis Celak: Phytochemical and pharmacological investigations. J Integr Med 2015; 13(2): 91-8.
5. Rowshan V, Bahmanzadegan A, Saharkhiz M. Influence of storage conditions on the essential oil composition of Thymus daenensis Celak. Ind Crop Prod 2013; 49: 97-101.
6. Moazeni N, Khajeali J, Izadi H, Mahdian K. Chemical composition and bioactivity of Thymus daenensis Celak (Lamiaceae) essential oil against two

- lepidopteran stored-product insects. *J Essent Oil Res* 2014; 26(2): 118–24.
7. Nickavar B, Esbati N. Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three *Thymus* species. *J Acupunct Meridian Stud* 2012; 5(3): 119–25.
 8. Shekarchi M, Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Gohari AR, Hamedani MP. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacogn Mag* 2012; 8(29): 37–41.
 9. Sajjadi E, Naderi G, Ziyaei R. Antioxidant effects of some medicinal plants (Labiatae family) [in Persian]. *J Kermanshah Univ Med Sci* 2004; 8(2): 1–12.
 10. Pirbalouti AG, Jahanbazi P, Enteshari S, Malekpoor F, Hamed B. Antimicrobial activity of some Iranian medicinal plants. *J Arch Biol Sci* 2010; 62(3): 633–42.
 11. Teimouri M. Antimicrobial activity and essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak from Iran. *J Med Plant Res* 2012; 6(4): 631–5.
 12. Dehghan-Dehkordi G. Evaluation of antispasmodic effect of *Thymus daenensis* Celak on rat uterus contractions. [theses]. Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences; 2024. [in Persian].
 13. Tabarașu A-M, Biriș SȘ, Gageanu I, Anghelache D, Bălțatu C, Persu C. Methods of extracting the active principles from medicinal and aromatic plants—a review. *Acta Tech Corvin Bull Eng.* 2022; 15(2): 23–8.
 14. Rao M, Gershon MD. The bowel and beyond: the enteric nervous system in neurological disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13(9): 517–28.
 15. Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am. J Physiol Cell Physiol* 2005; 288(4): C769–C83.
 16. Sadraei H, Hajhashemi V, Ghannadi A, Mohseni M. Antispasmodic effect of aerial part of *Teucrium polium* L. essential oil on rat isolated ileum in vitro. *Med J Islam Repub Iran* 2001; 14(4): 355–8.
 17. Elorriaga M, Anselmi E, Hernandez JM, D'ocon P, Ivorra D. The sources of Ca²⁺ for muscarinic receptor-induced contraction in the rat ileum. *J Pharm Pharmacol* 1996; 48(8): 817–9.
 18. Glen RM, Reddy H, Watson N, Challiss RA. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15(4): 114–9.
 19. Premrov-Bajuk B, Prem L, Vake T, Žnidaršič N, Snoj T. The effect of thymol on acetylcholine-induced contractions of the rat ileum and uterus under *ex vivo* conditions. *Front Pharmacol.* 2022; 13: 990654.
 20. Husnu-Can-Baser K. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Curr Pharm Act Des* 2008; 14: 3106–20.
 21. van den Broucke CO, Lemli JA. Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. Part 2: Antagonistic effect of thymol and carvacrol. *Planta Med* 1982; 45(3): 188–90.
 22. Mashhadi FF, Naylor RJ, Javid FA. The effects of serotonin receptor antagonists on contraction and relaxation responses induced by electrical stimulation in the rat small intestine. *Gene Cell Tissue* 2014; 1(1): e18311.
 23. Sadraei H, Asghari G, Sajjadi SE, Mozafari M. Antispasmodic effects of *Prangos ferulacea* acetone extract and its main component osthole on ileum contraction. *Res Pharm Sci* 2013; 8(2): 137–4.

Evaluation of the Antispasmodic Effect of Essential Oil and Hydroalcoholic Extract of *Thymus Daenensis* on Rat Ileum Contractions and Intestinal Transit in Mice

Hasan Sadraei¹, Reyhaneh FatehiMeybodi², Afsaneh Yegdaneh³

Original Article

Abstract

Background: *Thymus daenensis* traditionally have been used for treatment of diarrhea and abdominal cramps. However, so far, antispasmodic effects of *Thymus daenensis* has not been reported. This study for the first time investigates effect of *Thymus daenensis* essential oil and its hydroalcoholic extract on ileum smooth muscle contractions, aiming to identify potential therapeutic applications for gastrointestinal disorders.

Methods: Male Wistar rats were euthanized, and their ileum was isolated and placed in oxygenated Tyrode's physiological solution. Contractions were recorded using a physiograph. The effects of the essential oil and extract of *Thymus daenensis* and atropine (positive control) on contractions induced by spasmogens including KCl, acetylcholine (ACh), and electrical field stimulation (EFS)) were evaluated. Additionally, the impact of these compounds on intestinal transit in mice was assessed with three doses to determine their effectiveness in modulating gastrointestinal motility.

Findings: Both the essential oil and hydroalcoholic extract concentration-dependently inhibited ileum induced contractions. The essential oil showed stronger antispasmodic effects compared to the hydroalcoholic extract. The IC₅₀ value of the essential oil (the concentration of the drug that produced 50% of the maximum inhibitory effect) for KCl, ACh, and EFS was calculated to be 4.5±0.5 µg/ml, 6.2±0.7 µg/ml, and 3.8±0.64 µg/ml respectively. While the IC₅₀ values for hydroalcoholic extract of *Thymus daenensis* were calculated as 408±41µg/ml, 370±47µg/ml and 319±73µg/ml respectively. As expected, atropine attenuated the tissue responses to ACh and EFS without affecting KCl response. In mice, oral administration of both compounds (50, 100, 200mg/kg) significantly reduced intestinal charcoal transit, further supporting their antispasmodic activity.

Conclusion: *Thymus daenensis* essential oil and hydroalcoholic extract exhibited potent and reversible relaxant effect on ileum smooth muscles, highlighting their potential for managing gastrointestinal disorders associated with spasms.

Keywords: Intestinal motility, Muscle relaxation, Charcoal test, IC₅₀, Thymus plant

Citation: Sadraei H, FatehiMeybodi R, Yegdaneh A. Evaluation of the Antispasmodic Effect of Essential Oil and Hydroalcoholic Extract of *Thymus Daenensis* on Rat Ileum Contractions and Intestinal Transit in Mice. J Isfahan Med Sch 2026; 44(865): 932- 40.

1- Associate Professor of Pharmacology, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan, Iran

2- Pharmacy Student, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor of Pharmacognosy, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Afsaneh yegdaneh, Associate Professor of Pharmacology, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan, Iran; Email: sadraei@pharm.mui.ac.ir