

بررسی اثر ضد تشنجی عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه کاکوتی (Ziziphoratenuior L.) بر روی تشنج القاء شده با پنتیلین تترازول در موش سوری

حسین پیری^۱، بنیامین علی محمدی^۲، فاطمه سعیدی^۳، فیروزه نادری^۴، حسن ازدری زرمهری^{۵*}

^۱ استادیار بیوشیمی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

^۲ کارشناس پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

^۳ دانشجوی کارشناس هوشبری، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

^۴ کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

^۵ استادیار فیزیولوژی، گروه علوم پایه و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

* نشانی نویسنده مسئول: گروه علوم پایه و مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

E-mail: hassan.azhdari@gmail.com

وصول: ۹۴/۸/۱، اصلاح: ۹۴/۹/۲۲، پذیرش: ۹۴/۱۱/۴

چکیده

زمینه و هدف: حدود نیم تا یک درصد از جمعیت جهان به بیماری صرع مبتلا هستند. تشنج، از مهمترین علایم صرع است که به علت فعالیت الکتریکی غیرطبیعی نورون‌های مغز دیده می‌شود. به دلیل عوارض جانبی داروهای شیمیایی، استفاده از داروهای گیاهی می‌تواند جایگزین مناسبی برای کنترل تشنج به کار رود. در این مطالعه، اثر ضد تشنجی عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه کاکوتی (*Ziziphoratenuior L.*) در موش سوری نر بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۴۰ موش سوری نر با محدوده‌ی وزنی ۳۰-۲۵ گرم به‌طور تصادفی، انتخاب و به پنج گروه ۸ تایی تقسیم شدند که شامل یک گروه کنترل (دریافت‌کننده‌ی نرمال سالین و پنتیلین تترازول PTZ، ۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و ۴ گروه درمان (دریافت‌کننده‌ی عصاره با دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بودند. ۳۰ دقیقه بعد از تجویز داخل صفاقی نرمال سالین (در گروه کنترل) و دوزهای مختلف عصاره (در گروه‌های درمان)، پنتیلین تترازول با دوز ۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به‌صورت داخل صفاقی (IP) به موش‌ها تزریق شد و بلافاصله موش‌ها به قفس مخصوص منتقل شدند و در طی ۲۰ دقیقه رفتارهای تشنجی توسط دوربین فیلمبرداری شد و سپس فازهای مختلف تشنج مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: تزریق عصاره‌ی هیدروالکلی این گیاه به‌صورت اثر وابسته به دوز، باعث تأخیر زمان شروع تشنج کلونیک، تونیک و تشنج ژنرالیزه تونیک - کلونیک شد که در دوزهای ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم، بیشترین اثر را نشان دادند. همچنین تجویز عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه کاکوتی، باعث کاهش میانگین زمان مرحله‌ی تشنج کلونیک، تونیک و تونیک - کلونیک در حیوانات شد. نیز عصاره‌ی مذکور باعث حفاظت حیوانات در برابر مرگ و میر و تعداد پرش‌های ناگهانی گردید که در دوزهای ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم، بیشترین تاثیر را داشت.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی ما نشان داد که عصاره‌ی هیدروالکلی برگ کاکوتی (*Ziziphoratenuior L.*) دارای اثر ضد تشنجی مناسبی بوده و به نظر می‌رسد مطالعات آینده برای جداسازی و تعیین مواد موثر و شناخت مکانیسم اثر آن ضروری باشد.

واژه‌های کلیدی: کاکوتی، اثر ضد تشنجی، پنتیلین تترازول، تشنج، موش سوری

مقدمه

صرع شامل گروهی از اختلالات عصبی است که با حملات تشنج و یا به صورت اختلال حسی، شناختی و عاطفی تظاهر می‌نمایند (۱-۳). نکته‌ی اصلی در درمان صرع، لزوم درمان طولانی‌مدت، مداوم و توأم چنددارو با هم است که زمینه‌ی بروز عوارض جانبی متعدد داروها را بیشتر فراهم می‌کند (۴-۶). در سال‌های گذشته، توجهی ویژه به داروهای گیاهی در درمان بیماری‌های مختلف از جمله بیماری صرع شده و در حال حاضر نیز می‌شود (۶، ۳-۱۰). اینجاست که توجه به طب سنتی و داروهای گیاهی با هدف دستیابی به داروهای کم‌خطر و با حداقل عوارض جانبی آشکارتر می‌شود.

کاکوتی (*Ziziphora tenuifolia* L.) گیاهی از خانواده‌ی نعنائیان یا *Lamiaceae* یکی از شناخته‌شده‌ترین گیاهان در دنیا می‌باشد. کاکوتی، بومی کشورهای منطقه‌ی مدیترانه است. این گیاه در دامنه‌های خشک بین تخته-سنگ‌های نواحی مختلف مدیترانه و برخی نواحی آسیا می‌روید (۱۱). برگ کاکوتی به صورت سنتی در ایران در بهبود تشنج، بیماری‌های تنفسی، اسپاسم عضلات صاف و نفخ مفید است (۱۱، ۱۲). امروزه با عنایت به اثرات جانبی منفی داروهای سنتزی رویکرد مثبت نسبت به گیاهان دارویی شکل گرفته است. با توجه به این‌که در طب سنتی ایران، برای گیاه کاکوتی خواص آرام‌بخشی، ضد اسپاسم و ضد تشنجی ذکر شده است (۱۲، ۱۳)، لذا هدف از این تحقیق بررسی اثرات ضد تشنجی عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه کاکوتی با استفاده از مدل شیمیایی رایج تزریق پنتیلن تترازول در موش سوری نر می‌باشد. طب سنتی و گیاهان دارویی به عنوان منبع مناسبی جهت دستیابی به داروهای بهتر مورد توجه می‌باشند (۱۴، ۱۵). در این مطالعه، اثر عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه کاکوتی بر روی تشنج ناشی از تزریق داخل صفاقی PTZ مورد بررسی قرار گرفت. پنتیلن تترازول تعادل سیستم‌های مهاری و تحریکی دستگاه عصبی مرکزی را برهم می‌زند.

این ماده از طریق مهار گیرنده‌های GABA_A که در غشای نورونهای سیستم عصبی مرکزی وجود دارند، عمل می‌کند. افزون بر این پنتیلن تترازول موجب فعال‌سازی مدارهای گلوتاماترژیک می‌شود. با توجه به این‌که پنتیلن تترازول با دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب انقباض اتمیوکلونیک و تولید حملات ژنرالیزه‌تونیک - کلونیک منجر به مرگ می‌شود (۳، ۶، ۹، ۱۰، ۱۶) لذا در مطالعه‌ی حاضر از این دوز برای القای تشنج استفاده شد (۱۷). پنتیلن تترازول با سرکوب کردن جریان یون کلراید واسطه‌گری شده توسط GABA بر روی گیرنده‌ی GABA_A و متعاقباً کاهش ورود یون کلراید، باعث القای تشنج می‌گردد (۱۶، ۱۸، ۱۹). GABA_A گیرنده‌ی ناقل عصبی مهاری در سیستم اعصاب مرکزی مهره‌داران می‌باشد (۲۰). زمانی که این گیرنده فعال است کانال یون کلراید گیرنده باز شده، منجر به جریان یون کلر و هایپرپلاریزاسیون عصبی می‌گردد (۲۱). این گیرنده دارای چندین جایگاه اتصال آلوستریک می‌باشد که از طریق آن داروهای مختلفی می‌توانند جریان یون کلراید ایجاد شده به وسیله‌ی GABA را تنظیم کنند (۲۰). بنزودیازپین‌ها و باربیتورات‌ها به عنوان تقویت‌کننده‌ی های جریان یون کلراید ناشی از GABA شناخته شده‌اند (۲۱، ۲۲).

ناقلین شیمیایی مختلف دیگری با مکانیسم‌های مربوط در تحریک تشنج و صرع دخالت دارند. گلوتامات، ناقل عصبی است که در پی حملات صرعی میزان آن افزایش یافته و عملاً نقش تحریکی در ایجاد صرع دارد (۲۳، ۲۴). از طرفی دیگر، سیستم کولینرژیک نیز در ایجاد صرع شناخته شده است (۲۵). به همین دلیل از آگونیست گیرنده‌ی موسکاربینی (پیلوکارپین) جهت ایجاد صرع استفاده می‌کنند (۲۶-۲۸).

تاکنون از داروهای شیمیایی بسیاری جهت درمان صرع استفاده شده‌است، ولی حملات تشنجی در حدود ۱۵ درصد بیماران صرعی توسط درمان دارویی قابل کنترل نمی‌باشند (۱۴، ۲۹، ۳۰). گیاه کاکوتی متعلق به خانواده‌ی

داخل پلیت استریل، منتقل و در انکوباتور در درجه‌ی حرارت ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت تا عصاره‌ی هیدروالکلیبرگ گیاه کاکوتی خشک شود. میزان عصاره‌ی گرفته‌شده از ۱۰۰ گرم پودر ۱۱/۵ گرم بود و از پودر حاصل برای تهیه‌ی دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم استفاده‌شد. ضمناً برای تهیه‌ی محلول‌ها از نرمالسالین ۹درصد استفاده گردید (۳، ۶، ۹، ۱۰، ۱۹).

۳- تعیین سمیت حاد (LD50) عصاره‌ی آبی - الکل‌ی پس از تزریق داخل صفاقی عصاره با دوزهای ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، ۱۰۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و ۱۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به سه گروه ۱۰ تایی از موش‌های سوری و پس از مشاهدات ۴۸ ساعته مشخص شد که مرگ و میر در گروه ۱۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و بالاتر صورت می‌پذیرد (۳۳).

۴- ایجاد تشنج مدل مطالعاتی در این آزمایش، مدل کیندلینگ شیمیایی بود. پنتیلین تترازول (PTZ) (سیگما) در محلول نرمالسالین ۹ دهم درصد، حل و با دوز ۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی (IP) به حیوانات، تزریق شد که به تدریج باعث بروز تشنج گردید (۳۴، ۳۵). شدت تشنج در این مدل مطابق با مراحل ذیل، ارزیابی گردید:

مرحله‌ی تونیک: سفتی شدید عضلات و کشیده شدن دست‌ها و پاها به طرفین.

مرحله‌ی کلونیک: یک‌دوره‌ی کوتاه‌مدت از تشنج با حرکات پیچشی سر و گردن و حرکات دست‌ها و پرش‌های شدید و دورزدن.

مرحله‌ی تونیک - کلونیک: تشنج‌های جنرالیزه شده با انقباض‌های تونیک ناگهانی و حالات صرع پایدار همراه با پرش‌های بسیار کوتاه‌مدت.

مرحله‌ی افتادن: از دست رفتن تعادل موش‌ها در اثر تشنج و افتادن آنها به یک طرف.

نعناعی‌هاست. این گیاه، در مناطق مختلف ایران به‌خصوص در نواحی شمال و شمال غرب و مناطق کوهستانی مرکزی وجود دارد که دارای خواص درمانی متعددی است (۲۹، ۳۱).

مواد و روش‌ها

۱- حیوانات و شرایط آزمایش

در این مطالعه، از موش سوری نر با محدوده‌ی وزنی ۲۵ - ۳۰ گرم که از موسسه‌ی رازی حصارک کرج خریداری شده بودند، استفاده‌شد. حیوانات آزمایشگاهی در اتاق مخصوص حیوانات مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی قزوین نگهداری شدند. حیوانات موردآزمایش در این اتاق با دمای ۲۲ درجه و در دوره‌ی ۱۲ ساعته تاریکی - روشنایی نگهداری شدند و در مدت نگهداری، آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند و قبل از هر آزمایش توسط پژوهشگر، دست‌ورزی می‌شدند. از هر موش فقط یک‌بار برای آزمایش استفاده شد و تمامی آزمایش‌ها بین ساعت ۸ الی ۲۰ صورت گرفت.

۲- جمع‌آوری گیاه و روش تهیه‌ی عصاره

برگ‌های این گیاه از کوه‌های دامغان جمع‌آوری شده و توسط متخصصان زیست‌شناسی شاغل در هرباریوم دانشکده‌ی زیست‌شناسی دانشگاه آزاد دامغان باکد 163 شناسایی شدند (۳۲). ۱۰۰ گرم از پودر برگ گیاه کاکوتیرا در ۵۰۰ سی‌سی آب مقطر و ۵۰۰ سی‌سی اتانول ۹۶ درصد، ریخته و در یک بالن ۲۰۰۰ سی‌سی به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۲ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. لازم است در ۱۲ ساعت چند بار محلول توسط شیکر تکان داد شود. بعد از ۷۲ ساعت محلول، صاف (با کاغذ صافی) و در یک بالن استریل و دارای لوله‌ی کوتاه (خروجی) قرار داده شد و بعد از این‌که محلول صاف گردید، محلول حاصل‌شده، فیلتر و در داخل بن ماری (حمام آب‌جوش در درجه‌ی حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. هنگامی که محلول تغلیظ شد، به

مرحله‌ی پرش: پرش‌های ناگهانی بالاتر از ۲۰ سانتی‌متر از سطح زمین و همچنین درصد حفاظت از مرگ حیوان‌ها حین تشنج به صورت مستقل ثبت و مورد ارزیابی قرار گرفت.

حیوان‌های مورد مطالعه در پنج گروه هشتایی تقسیم‌بندی شدند که عبارتند از: گروه کنترل و چهار گروه تحت درمان با دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم از عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه کاکوتی (۷، ۸، ۳۴، ۳۵).

میزان اثربخشی عصاره در پیشگیری علایم تشنج براساس متغیرهای ذیل صورت گرفت:

- ۱) زمان تاخیر در شروع هر یک از مراحل تشنج (Delay Time)
- ۲) مدت زمان امتداد مرحله‌ی تونیکوتونیک - کلونیک (Duration Time)
- ۳) تعداد افتادن و پرش حیوان‌ها حین تشنج
- ۴) تعداد مرگ و میردره‌رگروه

به این ترتیب درگروه کنترل و درگروه‌های درمان (پس از گذشت ۳۰ دقیقه از درمان با عصاره)، کیندلینگ شیمیایی با تزریق پنتیلن تترازول با دوز ۸۰ میلی-گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی (IP) در حیوانات ایجاد شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه، رفتار و حرکات آن‌ها توسط دوربین فیلمبرداری (دیجیتال - سونی)، ضبط و به صورت دقیق مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفت و تمامی متغیرهای ارزیابی به صورت دقیق در تمامی گروه‌ها ثبت شد. درگروه‌های درمان قبل از تزریق پنتیلن تترازول، عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه کاکوتی ابتدا به ترتیب با دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی به حیوان‌ها، تزریق و پس از گذشت ۳۰ دقیقه پنتیلن تترازول به آنها تزریق می‌شد.

۵- روش‌های آماری

در این مطالعه نتایج به‌دست‌آمده به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شد. مقایسه‌ی آماری بین گروه‌های

آزمایشی با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و مقایسه‌ی بین گروه‌های آزمایشی با آزمون‌های تکمیلی از نرم‌افزار SPSS16 استفاده شد و به منظور بررسی اختلاف آماری میانگین‌ها از آزمون ANOVA و سپس از آزمون-های Tukey و LSD استفاده گردید. $P < 0.05$ به عنوان معیار معنادار بودن اختلاف میانگین‌ها در نظر گرفته شد.

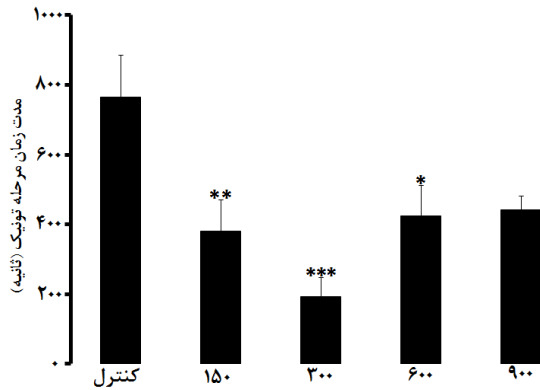
یافته‌ها

نتایج تست آماری ANOVA میان میانگین زمان شروع مراحل مختلف تشنج در بین گروه‌های دریافت‌کننده‌ی عصاره با گروه کنترل تفاوت آماری معناداری نشان داد. به این صورت که بین میانگین زمان شروع تشنج تونیک در دوز ۶۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم ($P < 0.001$)، میانگین زمان شروع تشنج کلونیک در دوز ۶۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم ($P < 0.05$) و میانگین زمان شروع تشنج ژنرالیزه تونیک - کلونیک در دوز ۶۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم ($P < 0.05$) و در دوز ۹۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم ($P < 0.001$) نسبت به گروه کنترل تفاوت آماری معناداری وجود داشت (نمودار ۱).

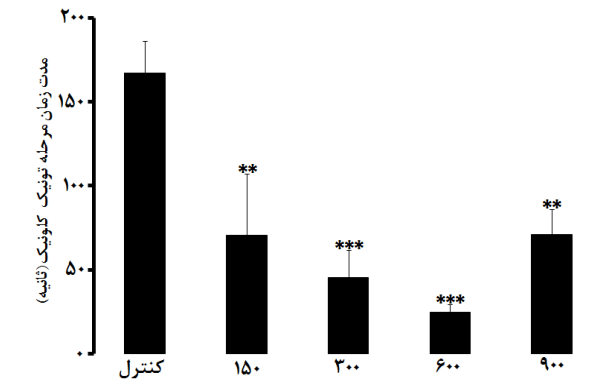
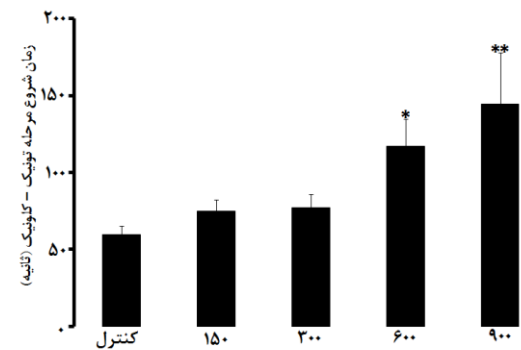
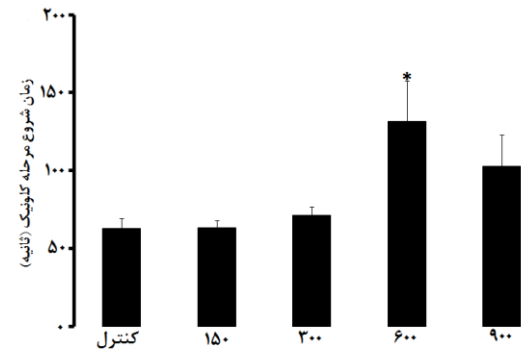
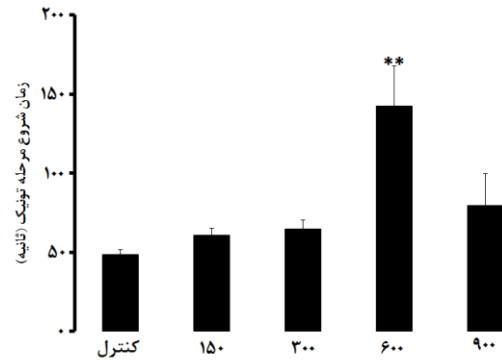
دوز ۶۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم کمیت Tonic Seizure Latency در سطح $P < 0.001$ و برای کمیت Clonic Seizure Latency در سطح $P < 0.05$ به طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش داد. برای تمام گروه‌ها تعداد ۸ عدد منظور شده‌است.

دوزهای ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم کمیت Tonic-Clonic Seizure Latency را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش دادند $P < 0.05$ ، ۱ هزارم P. برای همه‌ی گروه‌ها $n = 8$ می‌باشد.

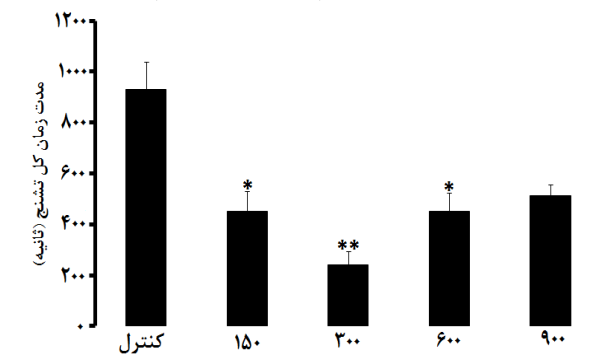
همچنین نتایج جهت بررسی میانگین طول مدت تشنج نشان داد که میانگین طول مدت تشنج تونیک در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی عصاره با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم ($P < 0.01$)، دوز ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم ($P < 0.001$) و دوز ۶۰۰ میلی‌گرم به ازای هر



نمودار ۲: اثر تزریق داخل صفاقی عصاره هیدروکلیدی برگ گیاه کاکوتی (دوزهای ۱۵۰ تا ۹۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بر مدت تشنج تونیک (Tonic Seizure Duration Time) ناشی از تزریق پنتیلین تترازول (۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم).



نمودار ۳: اثر تزریق داخل صفاقی عصاره هیدروکلیدی برگ گیاه کاکوتی (دوزهای ۱۵۰ تا ۹۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بر مدت تشنج تونیک-کلونیک (Tonic-Clonic Seizure Duration Time) ناشی از تزریق پنتیلین تترازول (۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم).



نمودار ۴: اثر تزریق داخل صفاقی عصاره هیدروکلیدی برگ گیاه کاکوتی (دوزهای ۱۵۰ تا ۹۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بر مدت زمان کل تشنج (Generalized Seizure Total Time) ناشی از تزریق پنتیلین تترازول (۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم).

نسبت به گروه کنترل کاهش دادند ($P < 0.05$), $P < 0.01$.

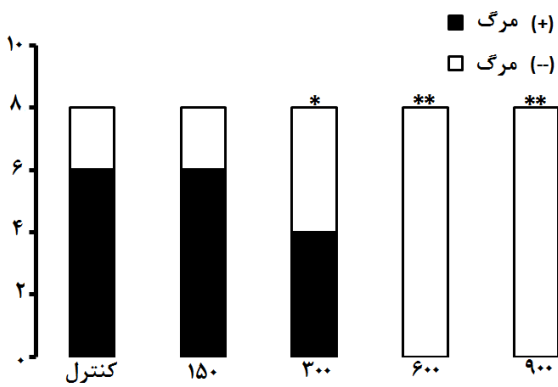
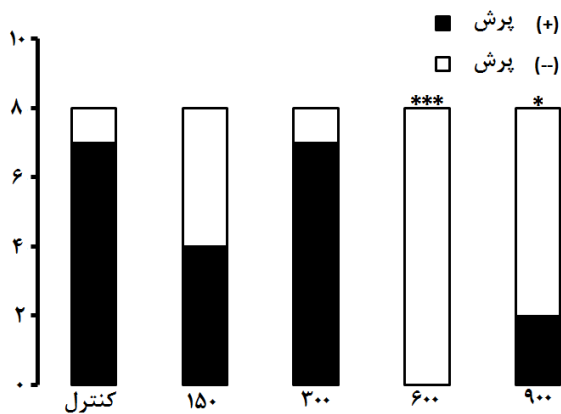
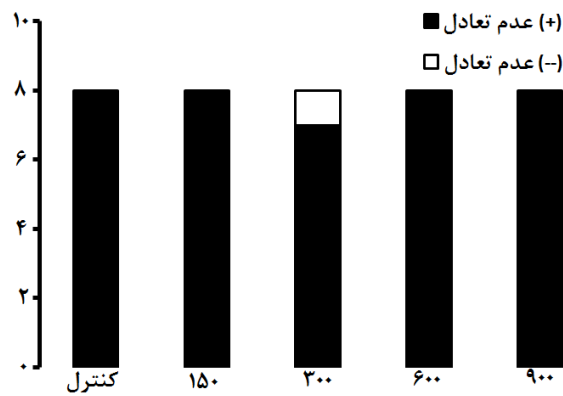
($P < 0.001$). برای همه‌ی گروه‌ها $n = 8$ می‌باشد.

میانگین طول مدت تشنج ژنرالیزه تونیک -

نمودار ۱: اثر تزریق داخل صفاقی عصاره‌ی هیدروکلیدی برگ گیاه کاکوتی (دوزهای ۱۵۰ تا ۹۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بر مدت زمان تأخیری تا شروع تشنج تونیک (Tonic Seizure Latency) در نمودار بالایی، مدت زمان تأخیری تا شروع تشنج کلونیک (Clonic Seizure Latency) در نمودار میانی و مدت زمان تأخیری تا شروع تشنج تونیک-کلونیک (Tonic-Clonic Seizure Latency) در نمودار پایینی ناشی از تزریق پنتیلین تترازول (۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم).

کیلوگرم ($P < 0.05$) نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری وجود داشت (نمودار ۲).

دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم عصاره‌ی هیدروکلیدی برگ گیاه کاکوتی کمیت Tonic Seizure Duration Time را به‌طور معناداری



نمودار ۵: اثر تزریق داخل صفاقی عصاره هیدروالکلی برگ گیاه کاکوتی (دوزهای ۱۵۰ تا ۹۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بر میزان از دست دادن تعادل، پریش و مرگ ناشی از تزریق پنتیلین تترازول (۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم).

صورتی که در دوزهای ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم هیچ کدام از حیوانات دچار مرگ نشدند ($P < 0.001$) و بین میانگین تعداد مرگ در دوز ۳۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم، نسبت به گروه کنترل نیز تفاوت معناداری دیده شد ($P < 0.05$) (نمودار ۵).

کلونیک نسبت به گروه کنترل تفاوت آماری قابل توجهی دیده شد و دریافت این عصاره در حیوان باعث کاهش طول مدت تشنج ژنرالیزه شده که در دوز ۱۵۰ و ۹۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم ($P < 0.01$) و در دوزهای ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم ($P < 0.001$) بود (نمودار ۳).

دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه کاکوتی کمیت Tonic-Clonic Seizure Duration Time را به طور معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش دادند ($P < 0.01$).

میانگین طول مدت کل زمان تشنج که از زمان تزریق پنتیلین تترازول تا زمان قطع تشنج‌ها بررسی شد در دوزهای ۱۵۰ و ۶۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم ($P < 0.05$) و دوز ۳۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم ($P < 0.001$) نسبت به گروه کنترل، تفاوت معناداری وجود داشت (نمودار ۴).

دوزهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه کاکوتی کمیت Generalized Seizure Total Time را به طور معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش دادند ($P < 0.01$).

میانگین تعداد حیواناتی که در اثر تزریق پنتیلین تترازول دچار عدم تعادل شده و به یک طرف افتادند در شکل ۷ با Falling نشان داده شده است بین گروه‌های درمانی و کنترل تفاوت معناداری وجود نداشت (شکل ۷). ولی بین میانگین تعداد پریش بین گروه کنترل و دریافت‌کننده‌ی عصاره با دوز ۹۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم ($P < 0.05$) و دوز ۶۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم تفاوت معنادار ($P < 0.001$) وجود داشت. به صورتی که در دوز ۶۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم هیچ کدام از حیوانات دچار پریش نشدند (نمودار ۵).

همچنین نتایج نشان دادند که این عصاره باعث حفاظت حیوان در برابر تزریق پنتیلین تترازول می‌شود. به

PTZ برای ایجاد صرع، احتمالاً پنتیلن ترازول همراه با سرکوب عمل مهاری گابا موجب تحریک گیرنده‌ی کولینرژیک می‌گردد و برگ گیاه کاکوتی با اعمال اثر آنتی-کولینرژیک، صرع در هیپوکامپ را مهار می‌نماید (۱۴، ۱۵، ۲۹-۳۱، ۳۳، ۳۸، ۳۹).

علاوه بر این، این گیاه دارای ترکیبات آروماتیک است که این ترکیبات در کاهش اضطراب و تنش‌های روانی موثرند و اثرات آرام‌بخشی بر سیستم عصبی دارند (۱۳، ۲۹، ۳۲، ۳۳، ۳۶).

با توجه به نتایج آزمایش بیشترین پاسخ ضد

صرعی در مدت زمان باقی ماندن در تشنج در دوز ۳۰۰ mg/kg مشاهده شد. درحالی‌که انتظار می‌رود دوزهای بالاتر تاثیر بیشتری را بر روی مدت زمان باقی ماندن در تشنج داشته باشند. احتمالاً بتوان این اثر متفاوت دوزهای عصاره را مربوط به تغییر مسیر سیگنالینگ سلولی در دوزهای مختلف یک لیگاند دانست که برای بسیاری از داروها نیز وجود دارد. به عبارت دیگر می‌توان اشاره نمود شاید دوز کمتر عصاره‌ی برگ کاکوتی مستقیماً از طریق اثر آنتاگونیستی روی گیرنده کولینرژیک عمل می‌نماید، درحالی‌که در دوزهای بالاتر موجب رفع مهار از روی گیرنده‌های GABA می‌شود.

نتیجه گیری

در مجموع، مطالعه‌ی کنونی نشان داد که عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه کاکوتی (*Ziziphora tenuior* L.) دارای اثر ضد تشنجی مناسبی در موش‌های سوری می‌باشد. بنابراین برای تعیین اثر عصاره‌ی این گیاه علیه صرع عمومی در انسان نیاز به مطالعات جدی‌تر، دقیق‌تر و نهایتاً کلینیکی وجود دارد.

بدون شک مطالعات آینده به منظور جداسازی ماده‌ی موثر عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه کاکوتی مشخص خواهد نمود که کدامیک از ترکیبات موجود در عصاره (و یا ترکیبی از چند ماده)، مسؤول اثر ضد تشنجی

گروه‌هایی از حیوانات که دوزهای ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از این عصاره را دریافت می‌کردند میزان پرش را به طور معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش دادند ($P < 0.001$ ، $P < 0.05$). میزان Death در همه‌ی گروه‌های ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم به طور معناداری کاهش یافت ($P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.01$). میزان مرگ و میر نیز در همه‌ی گروه‌های تحت درمان به صفر رسید.

بحث

مطالعه‌ی حاضر شواهدی را فراهم‌آورد که نشان داد عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه کاکوتی دارای اثرات ضد تشنجی می‌باشد. به طوری‌که تزریق عصاره‌ی این گیاه بیشتر در دوزهای ۶۰۰ و ۹۰۰ باعث افزایش زمان تأخیری تا شروع تشنج گردید. همچنین نتایج ما نشان داد که تجویز عصاره در تمامی دوزها، البته نه به صورت وابسته به دوز، باعث کاهش طول مدت مراحل تونیک، کلونیک، تونیک - کلونیک و کاهش مدت زمان کل تشنج گردید. علاوه بر این، عصاره‌ی مورد استفاده در این مطالعه، مرگ و میر و تعداد پرش‌های ناگهانی حیوانات را هنگام تشنج کاهش بخشید که این کاهش در دوزهای ۶۰۰ و ۹۰۰ معنادار بود.

تحقیقاتی که تاکنون انجام شده است، مدارکی دال بر وجود ترکیبات گابائریژیک، آنتی‌کولینرژیک و گلوتاماترژیک در گیاه کاکوتی را ارائه نموده‌اند (۳۳، ۳۶). فلاونوئیدهای موجود در این گیاه با تاثیر بر اتصالات آلوستریکی روی گیرنده GABA باعث تقویت اثرات مهاری GABA شده و از این طریق باعث تاثیرات ضد تشنجی می‌شوند (۳۷، ۳۸).

تحقیقات حاکی از این است که در هنگام کاهش یا فقدان مهار گابائریژیک، فعال شدن گیرنده‌ی استیل کولین از طریق چرخه‌ی تحریکی، موجب ایجاد صرع در هیپوکامپ موش نابالغ می‌شود (۱۶). با توجه به استفاده از

تشکر و قدردانی

این پژوهش با همکاری مراکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شده و نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از کلیه‌ی پرسنل این مراکز اعلام می‌دارند.

آن بوده و یا اثرات ضد تشنجی عصاره‌ی کاکوتی ممکن است ناشی از مجموعه‌ای از ترکیبات موجود در آن باشد که تعیین سهم هر یک نیازمند تحقیقات بیشتر و جداگانه است.

References

1. Boon P, Vonck K, Derick J, Camembert J. Vogues Nerve Stimulation for Refractory Epilepsy. *Seizure* 2001;10:456-8.
2. Mohammad S, Hanifeh F, Aqdas D, Hamid B, Mohammad K, Jamshid N. Iranian Society of Physiology and Pharmacology. 2011;15:66-71.
3. Alimohammadi B, Azhdari-Zarmehri H, Sofiabadi M, Moslem AR. Anticonvulsant Effect of Hydroalcoholic Extract of *Scrophularia Striata* Boiss. on Pentylentetrazol-Induced Seizure in Mice. *Kerman University of Medical Sciences Journal*. 2014;21(3):207-18.
4. Dadollahy S. Effect of Methanol Extract of Chamomile on Picrotoxin- Induced Seizures in Mice. *Kerman University of Medical Sciences* 2005.
5. Dooley M, Plosker G. Levetiracetam. A Review of Its Adjunctive Use in the Management of Partial Onset Seizures. *Drugs* 2000;60:871-93.
6. Azhdari-Zarmehri H, Naderi F, Erami E, Mohammad-Zadeh M. Effects of *Salvia Sahendica* hydroalcoholic extract on PTZ induced seizure in male mice. *Koomesh Journal*. 2013;14(4):497-504.
7. Kim H, Jee E, Ahn K, Choi H, Jang Y. Identification of Marker Compounds in Herbal Drugs on TLC With DART-MS. *Arch Pharm Res* 2010;33 1355-9.
8. Reyes-Garcia V. The Relevance of Traditional Knowledge Systems for Ethnopharmacological Research: Theoretical and Methodological Contributions. *J Ethnobiol Ethnomed* 2010:32-6.
9. Naderi F, Azhdari-Zarmehri H, Erami E, Sonboli A, Sofiabadi M, Mohammadzade M. The Effect of *Tanacetum sonbolii* Hydroalcoholic Extract on PTZ Induced Seizures in Male Mice. *Herbal Plants Journal*. 2010;11(4):193-201.
10. Saeidi F, Azhdari-Zarmehri H, Alimohammadi B, Erami E. The Effect of Hydroalcoholic Extract of *Heracleum Persicum* on Pentylentetrazol _Induced Seizure in Mice. *Zanjan University of Medical Sciences Journal*. 2013(21):86.
11. Yazdani D, Shahnazi S, Jamshidi A, Reza Zadeh S, Mojab F. Study on Variation of Essential Oil Quality and Quantity in Dry and Fresh Herb of Thyme and Tarragon. *Med Plants* 2005;5 132.
12. Akhandzadeh S. Encyclopedia of Iranian Medicinal Plants. Tehran: Arjmand; 2000.
13. Amin G. Traditional Medicinal Plants of Iran: Institute of Medicinal Plant Research; 1991.
14. Gilani A, Aziz N, Khan M, Shaheen F, Jabeen Q, Siddiqui B, et al. Ethnopharmacological Evaluation of the Anticonvulsant, Sedative and Antispasmodic Activities of *Lavandula Stoechas* L. *J Ethnopharmacol* 2000;71 161-7.
15. Sayyah M, Valizadeh J, Kamalinejad M. Anticonvulsant Activity of the Leaf Essential Oil of *Laurus Nobilis* Against Pentylentetrazole- and Maximal Electroshock-Induced Seizures. *Phytomedicine* 2002;9:212-6.
16. Behnam-Rassouli M, Ghayour M, Ghayour N. Investigating the Anti-Epileptic and Sedative Effects of Hydroalcoholic Extract of *Melissa Officinalis* (Lemon Balm) Leaf on Pentylentetrazol Induced Epileptiform Seizures in Wistar Rat. *J med plnts* 2011;11 65-72.
17. GA. J. GABA(A) Receptor Channel Pharmacology: *Curr Pharm Des* 2005.
18. Golmohammadi R, Pejhan A, Azhdari-Zarmehri H, Mohammad-Zadeh M. The role of ethanol on the anticonvulsant effect of valproic acid and cortical microvascular changes after epileptogenesis in mice. *Neurol Sci*. 2012.
19. Sofiabadi M, Esmaeili M, Haghdoost Yazdy H, Azhdari Zarmehri H. The Effect of Intraperitoneally Injection of *Matricaria Chamomilla* Ethanolic Extract on Seizure. *Herbal Plants Journal*. 2011;11(4).
20. Huang R, Bell-Horner C, Dibas M, Covey D, Drewe J, Dillon G. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA (A)) receptors: mechanism and site of action. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 298(3):986-95.
21. Samini M, Shafarodi H, Elahedini S. Lyndon effect on clonic seizure threshold induced by PTZ in mice. *Tehran Univ Med J*. 2005;63(7):529-36.

22. Hevers W, Luddens H. The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA channel subtypes. *Mol Neurobiol.* 1998 18(1):35-86.
23. Czapinski P, Blaszczyk B, Czuczwar S. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Curr Top Med Chem.* 2005;5(1):3-14.
24. Treiman D. GABAergic mechanisms in epilepsy: *Epilepsia*; 2001.
25. Erakovic V, Zupan G, Varljen J, Laginja Simonic A. Altered activities seizure: *Epilepsy Res*; 2001.
26. Potier S, Psarropoulou C. Endogenous acetylcholine facilitates epileptogenesis in immature rat neocortex. *Neurosci Lett.* 2001;13(1):25-8.
27. Wang Y, Zhou W, Li J, Liu Y, Yue Y, Zheng J. Anticonvulsant effects of phencyclone hydrochloride and other anticholinergic drugs in soman poisoning: neurochemical mechanisms. *Life Sci.* 2005;78(2):210-23.
28. Zhang L, Yang B, Lu B K, G., Wang Z, Xia Y. ne alkaloids production in transgenic *Hyoscyamus niger* hairy root cultures over-expressing putrescine N-methyltransferase is methyl jasmonate-dependent. *Tropa Planta.* 2007;225(4):887-96.
29. Brum L, Elisabethsky E, Souza D. Effects of Linalool on [(3)H]MK801 and [(3)H] Muscimol Binding in Mouse Cortical Membranes. *Phytother Res* 2001;15:422-5.
30. Roger JP, Brian SM. Antiepileptic Drugs In: Katzung B. G., (Ed.), *Basic and Clinical Pharmacology.* 7 ed. Stanford: Appleton & Longe; 2001.
31. Azarniod H. *Industrialized and Toxic Herbal Plants of Iran Lands.* Tehran Tehran University; 2005.
32. Thompson J, Chalchat J, Michet A, Linhart Y, Ehlers B. Qualitative and Quantitative Variation in Monoterpene Co-Occurrence and Composition in the Essential Oil of *Thymus Vulgaris* Chemotypes. *J Chem Ecol* 2003;29 859-80.
33. Taherian A, Rashidi Pour A, Arefi M, Vafaei A, Emami Abarghoei M, Sadeghi H, et al. Assessment of Hydroalcoholic Extract of *Thymus Vulgaris* on Neurogenic and Inflammatory Pain in Mice. *Babol Univ Med Sci* 2005;7 24-9.
34. Carvey P. *Drug Action in the CNS:* Oxford University Press 1998.
35. Hopkins A, Shorvon S, Cascino G. *Epilepsy.* London: Chapman and Hall; 1995.
36. Briseid J, Dyrud O. The Smooth Muscle Relaxing Effect of Thyme (*Thymus Vulgaris* L). *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1962.
37. Johnston G. GABA(A) Receptor Channel Pharmacology: *Curr Pharm Des* 2005.
38. Salah S, Jager A. Screening of Traditionally Used Lebanese Herbs for Neurological Activities. *J Ethnopharmacol* 2005;97 145-9.
39. Leung A. *Encyclopedia of Common Natural Ingredients.* Interscience Publication. p. 309-11.

Anticonvulsant activity of hydro-alcoholic extract of *Ziziphoratenuior L.* on pentylenetetrazol induced seizure in mice

Hossein Piri

Assistant Professor of Biochemistry, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Benyamin Alimohammadi

B.Sc. in Nursing, Nursing and Midwifery School, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Fatemeh Saeidi

B.Sc. in Anesthesia, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Firoozeh Naderi

M.Sc. in Nursing, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

***Hassan Azhdari-Zarmehri**

Assistant Professor of Physiology, Department of Basic Sciences and Neurosciences Research Center, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran

Received:23/10/2015, Revised:13/12/2015, Accepted:24/01/2016

Corresponding Author:

Hassan Azhdari-Zarmehri,
Assistant Professor of Physiology,
Department of Basic Sciences and
Neurosciences Research Center,
Torbat Heydariyeh University of
Medical Sciences, Torbat
Heydariyeh, Iran
E-mail:
hassan.azhdari@gmail.com

Abstract

Background and Objectives: About half to one percent of the world population suffer from epilepsy. Seizure is the most common symptoms of epilepsy due to abnormal electrical discharge of neurons in the brain. Due to side effects of chemical drugs, herbal plants are widely used to control seizures. In this study, Anticonvulsant activity of hydro-alcoholic extract of (*Ziziphoratenuior L.*) was investigated in mice.

Materials and Methods: In this study, 40 male mice (25-30 g) were randomly selected and divided into five groups of 8, that included a control group (receiving saline and PTZ) and 4 treatment groups (receiving the extract doses of 150, 300, 600, 900 mg / kg). 30 minutes after IP administration with saline (in control group) and different doses of extract (in treatment groups), PTZ (80 mg/kg) were injected and were transferred to a special cage immediately and convulsive behaviors were recorded by a camera during the 20 minutes. Then, the different phases of seizure were evaluated.

Results: Extract injection in all doses by dose- dependently delayed the onset time of clonic, tonic and tonic-clonic seizures, but doses of 600 and 900 mg/kg had showed the greatest effect on onset time. The duration time of tonic, clonic and tonic-clonic seizures in animals that received extract also reduced. Extract injection also dose-dependently decreased the rate of mortality and the number of suddenly jumping during seizures, these effects in doses of 600 and 900 mg/kg was significant.

Conclusion: Our study showed that, the hydro-alcoholic extract of (*Ziziphoratenuior L.*) had an appropriate anticonvulsant activity and it seems the future studies will be necessary to separate its ingredients and understand its mechanism of action.

Keywords: *Ziziphoratenuior L.*, Anticonvulsant activity, Pentylenetetrazol, Seizure, Mice