

## بررسی اثر ضد تشنجی عصاره هیدروالکلی سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L) در موش کوچک و ارتباط آن با نیتریک اکساید

غلامرضا کریمی<sup>۱\*</sup>، حسین حسین زاده<sup>۲</sup>، هادی بختیاری<sup>۳</sup>

۱- استادیار فارماکودینامی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲- استاد فارماکودینامی و سم شناسی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۳- داروساز

\* آدرس مکاتبه: مشهد، دانشکده داروسازی صندوق پستی: ۹۱۷۷۵-۱۳۶۵ تلفن: ۶۶-۸۶۲۳۲۵۵ (۰۵۱۱)

نمبر: ۸۶۲۳۲۵۱ (۰۵۱۱)

پست الکترونیکی: gho\_karimi@yahoo.com

### چکیده

در این مطالعه اثر ضد تشنجی عصاره هیدروالکلی ریشه و ریزوم گیاه سنبل الطیب در مدل پنتیلین تترازول و الکتروشوک مورد بررسی قرار گرفت. در آزمون پنتیلین تترازول تمام دوزهای به کار رفته باعث افزایش معنی داری در زمان شروع تشنج نسبت به نرمال سالین گردیدند. عصاره در مدل الکتروشوک تاثیری در جلوگیری از تشنج نداشت. L-NAME در دوزهای ۱۰، ۵، ۱ میلی گرم بر کیلوگرم باعث کاهش زمان شروع تشنج در مدل پنتیلین تترازول گردید. نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی سنبل الطیب می تواند در جلوگیری از علایم صرع کوچک موثر باشد. بخشی از مکانیسم اثر ضد تشنجی گیاه در ارتباط با نیتریک اکساید است.

کلواژگان: سنبل الطیب، پنتیلین تترازول، الکتروشوک، نیتریک اکساید

## مقدمه

تشنج، تخلیه الکتریکی ناگهانی و غیرطبیعی یک گروه از نرون‌های سیستم عصبی مرکزی است و بسته به میزان و چگونگی انتشار آن تظاهرات بالینی متفاوتی بروز می‌نماید. صرع بیماری مزمن است که در آن تشنج با تغییر فرآیندهای ذهنی - نباتی، وضعیت هوشیاری و یا حرکات غیرارادی همراه است. شیوع صرع در جوامع مختلف را حدود ۰/۳ تا ۰/۵ درصد برآورد نموده‌اند و گزارش‌ها نشان می‌دهد که میزان آن در کشورهای رو به توسعه بالاتر است [۱].

سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.) گیاهی است علفی از خانواده والریاناسه که در نواحی معتدل قاره آسیا، اروپا و آمریکا یافت می‌شود و قسمت مورد استفاده آن ریزوم و ریشه‌های افشان است. سه گروه ترکیب شیمیایی در این گیاه یافت شده است که عبارتند از: ۱- مونو سسکویی‌ترین‌ها ۲- ایریدویدتری‌استرها ۳- آلکالوئیدهای پیریدین [۲، ۳]. در طب سنتی برای رفع خستگی، اثرات آرام‌بخشی و همچنین درمان تشنج، دردهای عصبی و گرفتگی عضلانی استفاده شده است [۴، ۳، ۲]. مطالعات داروشناسی در حیوانات نشان داد که عصاره اتانولی والریان تشنج حاصل از پیکروتوکسین را جلوگیری نموده لیکن بر روی تشنج ناشی از هارمان بی‌تاثیر است. عصاره اتانولی همچنین مدت زمان خواب به‌وجود آمده در اثر باربیتوراتها را افزایش داده و تاثیر بر روی احساس درد یا درجه حرارت بدن نداشته است [۵]. در مشاهدات بالینی بر روی انسان‌ها عصاره آبی والریان کیفیت خواب را بهبود می‌بخشد و زمان شروع خواب را کاهش می‌دهد. عصاره دارای اثر ضد اضطراب ملایم نیز می‌باشد. در فارماکوپه بسیاری از کشورها مانند آلمان ریشه والریان برای درمان بی‌قراری و اختلالات خواب پذیرفته شده است

[۶، ۳، ۲]. این مطالعه جهت بررسی اثر ضد تشنجی عصاره هیدروالکلی در مدل الکتروشوک و پنتیلین تترازول و نقش احتمالی نیتریک اکساید در این اثرات صورت گرفته است.

## مواد و روش‌ها

### حیوان

موش سفید کوچک (نژاد BALB/c) با محدوده وزنی ۲۵-۲۰ گرم از مرکز تکثیر پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه رازی تهیه گردیدند. این حیوانات در دوره روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته و دمای  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  و با دسترسی آزاد به آب و غذا، در اتاق حیوانات دانشکده داروسازی مشهد نگهداری گردیدند.

### گیاه

ریشه و ریزوم سنبل‌الطیب از شرکت تولیدکننده گیاهان دارویی زردبند واقع در تهران تهیه گردید.

### مواد

پودر پنتیلین تترازول (PTZ) و نیترو آل آرژنتین متیل استر (L-NAME)؛ (سیگما - سوئیس)، آمپول دیازپام (تولید دارو - ایران) نرمال سالین (ثامن - ایران).

### عصاره‌گیری از گیاه

ابتدا ریشه و ریزوم گیاه توسط آسیاب خرد شده و سپس ۱۰ گرم از آن با ۴۰ گرم آب و ۶۰ گرم اتانول مخلوط گردیده و به مدت ۲ ساعت بر روی تکان‌دهنده (Shaker) قرار گرفت. مخلوط حاصل را با کاغذ صافی و قیف بوخنر صاف کرده و محلول به‌دست آمده توسط دستگاه حذف حلال تغلیظ و در

شروع کشش اندام عقبی (Hind Limb Tonic Extension= HLTE) ثبت گردید.

### تعیین سمیت حاد عصاره هیدروالکی

گروه‌های ۶ تایی از حیوانات را در نظر گرفته و دوزهای مختلف از عصاره به صورت ip به آنها تزریق گردید. تعداد مرگ بعد از ۲۴ ساعت ثبت شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

برای انجام آزمون‌های آماری از نرم‌افزارهای Instat و PCS استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار گزارش شده است. به منظور بررسی اختلاف آماری میانگین‌ها از آزمون ANOVA و سپس Tukey-Kramer استفاده گردید. برای مقایسه درصد حفاظت از مرگ از آزمون Fisher's استفاده گردید.  $p < 0.05$  به عنوان معیار معنی‌دار بودن اختلاف میانگین‌ها در نظر گرفته شد.

## نتایج

از هر ۱۰ گرم ریشه و ریزوم خرد شده گیاه، پس از عصاره‌گیری حدود ۲ گرم ماده خشک به دست آمد. در مطالعه سمیت حاد،  $LD_{50}$  عصاره (۷/۹۳-۴/۶۳) g/kg تعیین شد. در آزمون پنتیلین تترازول تمام دوزهای به کار رفته از عصاره نسبت به نرمال سالین تفاوت معنی‌دار نشان دادند. دوز ۲/۱ g/kg اثری معادل دیازپام نشان داد. همچنین دوزهای استفاده شده به طور معنی‌داری باعث جلوگیری از مرگ و میر به وجود آمده در اثر پنتیلین تترازول شدند (جدول شماره ۱). در آزمون الکتروشوک هیچ‌یک از دوزهای عصاره هیدروالکی در جلوگیری از تشنج موثر نبودند و اثری معادل نرمال سالین از خود نشان دادند (جدول شماره ۲). L-NAME به تنهایی اثری بر روی زمان شروع کشش اندام‌های عقبی نداشت، لیکن به صورت وابسته به دوز زمان شروع کشش اندام‌های عقبی را در دوز ۲/۱ g/kg عصاره کاهش داد (جدول شماره ۳).

انتها بر روی بن ماری با حرارت ملایم ( $40^{\circ}C$ ) خشک گردید [۷].

### فعالیت ضد تشنجی عصاره هیدروالکی

#### آزمون پنتیلین تترازول

دوزهای ۳، ۲/۱، ۱/۲، ۰/۳ گرم بر کیلوگرم از عصاره انتخاب و ۳۰ دقیقه قبل از پنتیلین تترازول (۹۰ mg/kg) به صورت ip به حیوانات تزریق گردید. گروه شاهد مثبت دیازپام (۵ mg/kg) و شاهد منفی نرمال سالین (۱۰ ml/kg) دریافت کردند. زمان شروع کشش اندام عقبی (Hind Limb Tonic Extension= HLTE) و درصد محافظت از مرگ و میر ثبت گردید [۸].

#### آزمون الکتروشوک

دوزهای ۳، ۲/۱، ۱/۲، ۰/۳ گرم بر کیلوگرم از عصاره انتخاب گردید و به صورت ip به حیوانات تزریق شدند. ۳۰ دقیقه بعد حیوانات تحت تاثیر جریان الکتریکی متناوب (۶۰ هرتز، ۱۵۰ میلی آمپر، ۰/۲ ثانیه) با استفاده از الکترودهای متصل شده به گوش قرار گرفتند. گروه شاهد مثبت دیازپام (۵ mg/kg) و شاهد منفی نرمال سالین (۱۰ ml/kg) دریافت کردند. مدت زمان کشش اندام‌های عقبی (Hind Limb Tonic Extension= HLTE) ثبت گردید [۸].

#### اثر L-NAME در آزمون پنتیلین تترازول

ابتدا دوزهای ۱۰، ۵، ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم از L-MAME انتخاب گردیده، ۷۵ دقیقه قبل از پنتیلین تترازول (۹۰ mg/kg) به صورت ip به حیوانات تزریق گردیدند. در آزمایش بعد اثر هر یک از دوزهای ذکر شده برای L-NAME به همراه دوز ۲/۱ g/kg از عصاره هیدروالکی مورد ارزیابی قرار گرفت. L-NAME و عصاره هیدروالکی به ترتیب ۷۵ و ۳۰ دقیقه قبل از پنتیلین تترازول تجویز شدند. زمان

**جدول شماره ۱- اثر ضد تشنجی عصاره هیدروالکلی سنبل الطیب به روش پنتیلن تترازول**

محلول تزریقی	دوز	زمان شروع کشش اندامهای عقبی (ثانیه)	درصد محافظت از مرگ در ۲۴ ساعت
نرمال سالین	۱۰ ml/kg	۱۲۳/۵ ± ۶	۰
دیازپام	۵ mg/kg	۱۸۰۰/۰ ± ۰	٪۱۰۰ ***
عصاره هیدروالکلی	۰/۳ g/kg	۱۵۰۳/۰ ± ۲۰۲ ***	٪۷۵ **
عصاره هیدروالکلی	۱/۲ g/kg	۱۶۰۵/۰ ± ۱۹۵ ***	٪۸۷/۵ ***
عصاره هیدروالکلی	۲/۱ g/kg	۱۸۰۰/۰ ± ۰ ***	٪۱۰۰ ***
عصاره هیدروالکلی	۳ g/kg	۱۳۸۹/۰ ± ۲۶۹ ***	٪۵۰ *

\*p < ۰/۰۵, \*\*p < ۰/۰۱, \*\*\*p < ۰/۰۰۱, mean ± SEM, n = ۸

**جدول شماره ۲- اثر ضد تشنجی عصاره هیدروالکلی سنبل الطیب به روش الکتروشوک**

محلول تزریقی	دوز	مدت زمان کشش اندامهای عقبی (ثانیه)
نرمال سالین	۱۰ ml/kg	۱۶/۵ ± ۰/۵
دیازپام	۵ mg/kg	۱۲/۵ ± ۰/۵ ***
عصاره هیدروالکلی	۰/۳ g/kg	۱۶/۰ ± ۰/۵
عصاره هیدروالکلی	۱/۲ g/kg	۱۶/۵ ± ۰/۵
عصاره هیدروالکلی	۲/۱ g/kg	۱۶/۰ ± ۰/۵
عصاره هیدروالکلی	۳ g/kg	۱۹/۰ ± ۱/۰

\*p < ۰/۰۵, \*\*p < ۰/۰۱, \*\*\*p < ۰/۰۰۱, mean ± SEM, n = ۸

**جدول شماره ۳- بررسی اثر دوزهای مختلف L-NAME بر فعالیت ضد تشنجی عصاره هیدروالکلی سنبل الطیب به روش پنتیلن تترازول**

محلول تزریقی	دوز	زمان شروع کشش اندامهای عقبی (ثانیه)	درصد محافظت از مرگ در ۲۴ ساعت
نرمال سالین	۱۰ ml/kg	۱۲۳/۵ ± ۶	۰
L-NAME	۱ mg/kg	۱۳۳ ± ۱۱	۰
L-NAME	۵ mg/kg	۱۴۸ ± ۱۹	۰
L-NAME	۱۰ mg/kg	۱۶۷ ± ۱۳	۰
عصاره + L-NAME	۱ mg/kg + ۲/۱ g/kg	۱۱۸۰ ± ۱۸۳ ***	٪۶۲/۵ *
عصاره + L-NAME	۵ mg/kg + ۲/۱ g/kg	۹۵۸ ± ۱۴۴ ***	٪۳۷/۵
عصاره + L-NAME	۱۰ mg/kg + ۲/۱ g/kg	۵۵۸ ± ۶۳ **	٪۳۷/۵
عصاره	۲/۱ g/kg	۱۸۰۰ ± ۰ ***	٪۱۰۰ ***

\*p < ۰/۰۵, \*\*p < ۰/۰۱, \*\*\*p < ۰/۰۰۱, mean ± SEM, n = ۸

## بمط

از آنجایی که عصاره فقط در آزمون پنتیلین تترازول موثر بود بنابراین اثر L-NAME (مهارکننده تولید نیتریک اکساید) در این آزمون بررسی گردید. تجویز L-NAME اثر ضدتشنجی عصاره در مدل پنتیلین تترازول را کاهش داد. بنابراین احتمالاً بخشی از مکانیسم اثر عصاره حاصل عملکرد آن بر روی NO می باشد. در مطالعات مختلف اثرات متناقضی برای NO بر روی تشنج مشاهده شده است. در برخی مطالعات به عنوان یک ماده ضدتشنج [۱۲، ۱۱] و در برخی دیگر به عنوان یک ماده تشنج زا معرفی شده است [۱۴، ۱۳]. احتمالاً شرایط متفاوت آزمایش (نوع حیوان، روش ایجاد تشنج، ماده مهارکننده تولید NO) در بروز نتایج مختلف موثر بوده است. گزارش شده است که NO ال - گلوتامات متصل به غشای سیناپسی در مغز رت را به طور وابسته به دوز مهار نموده و دارای اثر فیدبک منفی بر روی رسپتورهای NMDA می باشد [۱۶، ۱۵]. بنابراین استفاده از مهارکننده های ساخت نیتریک اکساید باعث تضعیف اثرات فوق گردیده و تحریک پذیری نورون های بعد سیناپسی افزایش می یابد. این مشاهدات در موافقت با یافته های این تحقیق است که نشان می دهد NO در بروز اثر ضدتشنجی ترکیبات مختلف می تواند موثر باشد.

نتیجه گیری کلی آن که عصاره هیدروالکی ریشه و ریزوم سنبل الطیب ممکن است بر روی علائم بالینی صرع کوچک موثر باشد و بخشی از مکانیسم اثر آن مرتبط با NO است.

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره هیدروالکی ریزوم و ریشه گیاه سنبل الطیب در جلوگیری از مدل تشنجی پنتیلین تترازول موثر است، لیکن بر روی تشنجات حاصل از الکتروشوک تاثیری ندارد. داروهای موثر بر صرع کوچک، قادر به جلوگیری از تشنج در مدل پنتیلین تترازول هستند [۸]. بنابراین می توان گفت عصاره هیدروالکی نیز می تواند در جلوگیری از علائم صرع کوچک موثر باشد. داروهای موثر بر صرع بزرگ نیز از ایجاد تشنج در مدل الکتروشوک جلوگیری می نمایند [۸]. با توجه به نتایج به دست آمده، عصاره ذکر شده فاقد اثر درمانی مطلوب بر علائم بالینی صرع بزرگ است. از مکانیسم هایی که احتمالاً در بروز اثر ضدتشنجی عصاره موثر هستند می توان به موارد ذیل اشاره نمود.

- ۱- در عصاره آبی سنبل الطیب و فرآورده های تجاری آن وجود GABA گزارش شده است [۲].
- ۲- عصاره آبی - الکی گیاه آزاد شدن GABA از سیناپس ها را تحریک می نماید [۹].
- ۳- گلوتامین موجود در عصاره به راحتی از سد مغزی - خونی عبور کرده و توسط پایانه های عصبی جذب و به GABA تبدیل می شود [۹].
- ۴- والرینیک اسید موجود در عصاره باعث مهار آنزیم GABA Transaminase شده و در نتیجه مقدار GABA در CNS افزایش می یابد [۱۰].

## منابع

1. Lowenstein DH. Seizure and epilepsy In : Braunwald E, Hauser SL, Fauci AS. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw Hill. USA. 2001, pp: 2354-68.
2. DerMarderosian A. *The Review of Natural Product. Fact and comparisons*. USA. 2001, pp: 609-11.
3. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C. *PDR for Herbal Medicine*. Medical Economics Company. USA. 2000. pp: 783-785.
4. Duke JA. *Handbook of medicinal herbs*. CRC Press. UK. 2000, pp: 503-504.

5. Hiller KO, Zetler G. Neuropharmacological studies on ethanol extracts of *Valeriana officinalis*. *Phytother. Res.* 1996; 10: 145-51.
6. Houghton PJ. The scientific basis for the reputed activity of valerian. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999, 51: 505-12.
7. Anonymous. The United States Pharmacopia, The National Formulary. USP Convention, InC. Canada. 2002, pp: 2638-2640.
8. Vogel HG, Vogel WH. *Drug Discovery and Evaluation*. Springer. Germany. 1997, pp:260-5.
9. Santos MS, Ferreira F, Faro C, Pires E, Carvalho AP, Macedo T. The amount of GABA present in aqueous extract of valerian is sufficient to account for GABA release in synaptosomes. *Planta Med.* 1994; 60: 475-6.
10. Riedel E, Hansel R, Ehrke G. Inhibition of GABA catabolism by valerinic acid derivatives. *Planta Med.* 1982; 46: 219-20.
11. Buisson A, Iakhmeche N, Verrecchia C, Boulu RG. Nitric oxide: an endogenous anticonvulsant substance. *Neuroreport.* 1993; 4: 444-6.
12. Przegalinski E, Baran L, Siwanowicz T. The role of nitric oxide in kainate induced seizure in mice. *Neurosci Lett.* 1994; 170: 74-76.
13. De Sarro GB, Di Paola ED, De sarro A, Vidal MJ. Role of nitric oxide in the genesis of excitatory amino acid induced seizure from the deep prepiriform cortex. *Fundam. Clin Pharmacol.* 1991; 5: 503-11.
14. Mülsch A, Busse R, Mordvintcev PI, Vanin AF, Olesen SP. Nitric Oxide promotes seizure activity in kainate treated rats. *Neuroreport.* 1994; 5: 2325-8.
15. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. EDRF release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature*, 1988; 336: 385-7.
16. Manzoni O, Prezeau L, Mavin P, Bockaert J, Fagni L. Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron.* 1992; 8: 653-62.