

## The effect of hydro-alcoholic extract of (*Matricaria recutita L.*) on pentylenetetrazole-induced seizure and its relationship with nitric oxide in mice

Kazemi M<sup>1</sup>, Ghavipanjeh Gh<sup>1\*</sup>, Shahaboddin ME<sup>2</sup>, Banitaba-Bidgoli M<sup>1</sup>

1- Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.  
2- Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Disease, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

Received: 2018/05/31 | Accepted: 2018/07/15

### Abstract:

**Background:** *Matricaria recutita* (MAT) has a series of flavonoid compounds with benzodiazepine-like properties. So, it may be effective in the treatment of epilepsy and seizures. This study aimed at examining the effect of intraperitoneal injection of the hydro-alcoholic extract of *Matricaria recutita* on seizures induced by pentylenetetrazole (PTZ) in mice.

**Materials and Methods:** In this study, 56 male mice (25-30 g) were divided into seven groups (n=8): 1-control (saline), 2-control (PTZ), 3-MAT (50mg/kg), 4-MAT (100 mg/kg), 5- MAT (200 mg/kg), 6- diazepam (1mg/kg) and 7- MAT (50 mg/kg)+diazepam (0.25 mg/kg). After 10 days of treatment in different groups, the PTZ-induced seizure threshold was assessed and nitric oxide (NOX) metabolites in the brain tissue were measured by the Greiss method.

**Results:** The chamomile hydro-alcoholic extract (200 mg/kg), and diazepam (1 mg/kg) significantly increased the seizure threshold ( $P<0.001$ ). The chamomile hydro-alcoholic extract (50, and 100 mg/kg) did not show anticonvulsant activity. The concentrations of NOX in the diazepam (1 mg/kg), MAT 100 mg/kg, and MAT 200 mg/kg groups were significantly lower than those in the control (PTZ) group and co-administration of MAT (50 mg/kg) with diazepam (0.25) decreased the NOX concentration. The hydro-alcoholic extract of MAT (50 mg/kg) had no significant effect on the NOX concentration.

**Conclusion:** According to the results of this study, the chamomile hydro-alcoholic extract has an inhibitory effect on the PTZ-induced seizure and NOX in male mice.

**Keyword:** Epilepsy, Seizure, *Matricaria recutita* L., Nitric oxide, Mice

\* Corresponding Author.

Email: Ghavipanjeh-gh@kaums.ac.ir

Tel: 0098 913 217 6920

Fax: 0098 315 554 0021

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2018; Vol. 22, No 4, Pages 346-354

Please cite this article as: Kazemi M, Ghavipanjeh Gh, Shahaboddin ME, Banitaba-Bidgoli M. The effect of hydro-alcoholic extract of (*Matricaria recutita L.*) on pentylenetetrazole-induced seizure and its relationship with nitric oxide in mice. Feyz 2018; 22(4): 346-54.

# بررسی اثر عصاره هیدرولالکلی گیاه بابونه آلمانی (*Matricaria recutita L.*) بر تشنج ناشی از پنتیلن ترازاول و ارتباط آن با نیتریک اکساید در موش کوچک آزمایشگاهی

مریم کاظمی<sup>۱</sup>، غلامرضا قوی پنجه<sup>۲</sup>، محمد اسماعیل شهاب الدین<sup>۳</sup>، سید مجتبی بنی طباء بیدگلی<sup>۴</sup>

## خلاصه:

سابقه و هدف: بابونه (*Matricaria recutita L.*) دارای ترکیبات فلاونوئیدی با خواص شبه بیزودیازپینی است. لذا، ممکن است در درمان صرع و تشنج مؤثر باشد. در این مطالعه اثر تزریق درونصفاقی عصاره هیدرولالکلی بابونه بر تشنج القاء شده با پنتیلن ترازاول (PTZ) در موش کوچک آزمایشگاهی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ۵۶ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر با وزن ۲۵-۳۰ گرم استفاده که به ۷ گروه ۸ تایی تقسیم شدند: ۱- کنترل (سالین): ۲- کنترل منفی (PTZ): ۳- عصاره بابونه ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم؛ ۴- عصاره بابونه ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم؛ ۵- عصاره بابونه ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم؛ ۶- دیازپام ۱ میلی گرم/کیلوگرم؛ و ۷- عصاره بابونه ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم+دیازپام (۰/۲۵ میلی- گرم/کیلوگرم). پس از ۱۰ روز پیش درمان (تزریق درونصفاقی) در گروه‌های مختلف، آستانه تشنج القاء شده با تزریق وریدی PTZ ارزیابی شد و اندازه‌گیری متabolیت‌های نیتریک اکساید ( $\text{NO}_x$ ) در بافت مغز با روش گریس انجام گرفت.

نتایج: عصاره هیدرولالکلی بابونه (۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) و دیازپام (۱ میلی گرم/کیلوگرم) به صورت معنی دار ( $P < 0.001$ ) آستانه تشنج را افزایش داده و دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم عصاره هیدرولالکلی بابونه خواص ضد تشنجی نشان ندادند. سطح  $\text{NO}_x$  در گروه دیازپام (۱ میلی گرم/کیلوگرم) و عصاره هیدرولالکلی بابونه (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) در مقایسه با کنترل کاهش معنی داری داشته و همچنین در گروه ترکیبی بابونه (۵۰ میلی گرم/کیلوگرم+دیازپام (۰/۲۵ میلی گرم/کیلوگرم) غلظت  $\text{NO}_x$  کاهش داشت. عصاره هیدرولالکلی بابونه (۵۰ میلی گرم/کیلوگرم) هیچ گونه اثر معنی داری بر غلظت  $\text{NO}_x$  نداشت.

نتیجه‌گیری: عصاره هیدرولالکلی بابونه آلمانی اثر کاهشی بر تشنج ناشی از PTZ و غلظت  $\text{NO}_x$  دارد.

واژگان کلیدی: صرع، تشنج، بابونه آلمانی، نیتریک اکساید، موش کوچک آزمایشگاهی

دو ماهنامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۴، مهر و آبان ۹۷، صفحات ۳۵۴-۳۴۶

سه مکانیسم اصلی دخیل در ایجاد تشنج شامل کاهش مکانیسم-های مهاری مغز بدويژه کاهش مهار سیناپسی ناشی از گابا، افزایش N-methyl-D-aspartate (NMDA) و افزایش تخلیه‌های درون‌زای نورونی حاصل از افزایش جریان کلیسمی وابسته به ولتاژ می‌باشد. تظاهرات بالینی این اختلال بسته به میزان و چگونگی انتشار تشنج از فعالیت شدید تشنجی تا پدیده‌های تحریکی که به آسانی قابل تشخیص نیستند، متفاوت است [۴]. مدارکی مبنی بر دخالت رادیکال‌های آزاد در پاتوژنر تشنج موجود است. رادیکال‌های آزاد می‌توانند موجب تخریب غشاء و اختلال عملکرد نورون‌ها شوند. این فاکتورها از طریق افزایش سطح گلوتامات مغزی، فعال کردن گیرنده‌های NMDA و نیز تولید نیتریک اکساید (NO) روی حملات تشنجی تاثیر می‌گذارند [۵]. اگرچه نقش نیتریک اکساید در پاتوفیزیولوژی صرع نامشخص است، ولی مطالعات نشان می-دهند که نیتریک اکساید باعث از بین رفت نورون‌ها شده، گلیها را تکثیر می‌کند و می‌تواند در پاتوژنر صرع دخیل باشد [۵]. گزارش شده که ۳۰-۴۰ درصد بیماران مبتلا به صرع به روش‌های درمانی مقاوم بوده و یا به درمان پاسخ نمی‌دهند [۶]. علی‌رغم وجود تعداد

## مقدمه

صرع دومین اختلال شایع بیماری‌های عصبی بعد از سکته‌های مغزی به شمار می‌آید. بر اساس مطالعات انجام شده، تخمین زده می‌شود که حدود ۶۵ میلیون نفر در جهان مبتلا به صرع باشند [۱، ۲]. بیماری‌های صرعی در انسان ناشی از اختلالات عصبی-رنقاری پیچیده هستند که در اثر تحریک پذیری غیرطبیعی سلول‌های عصبی در مناطق مختلف مغز ایجاد می‌شوند [۳]. مکانیسم‌های متعددی سبب ایجاد تشنج در مغزهای طبیعی و صرعی می‌شود.

دانشجویی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۱ استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۲ استادیار، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متabolیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۳ مری، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

\* لشان نویسنده مسئول، کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی

تلفن: ۰۹۱۳۲۱۷۶۹۲۰ - ۰۳۱ ۵۵۵۴۰۰۲۱

پست الکترونیک: Ghavipanjeh-gh@kaums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۲۴ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۳/۱۰

دانشگاه علوم پزشکی کاشان تهیه شد. موش‌های سوری در حیوانخانه با درجه حرارت ۲۰-۲۲ درجه سانتی‌گراد و میزان رطوبت ۵۵ درصد و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی در قفسه‌های مجزا نگهداری شده و دسترسی آسان به غذای استاندارد و آب داشتند. پتیلن ترازوول (PTZ) از شرکت Sigma-Aldrich سالین حل گردید. لازم به ذکر است که در این مطالعه تمام روش‌های آزمایشگاهی زیر نظر کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان با کد IR.KAUMS.REC.1396.38 صورت گرفت. جهت انجام آزمایش حیوانات به طور تصادفی به ۷ گروه ۸ تابی [۱۷] تقسیم شده و پس از توزین و شماره‌گذاری به روش زیر تحت تعجیز قرار گرفتند: ۱- گروه کنترل (استفاده از نرمال سالین بعنوان حلال عصاره و به مدت ۱۰ روز متواالی)؛ ۲- گروه کنترل منفی که نرمال سالین بعنوان حلال عصاره ۴۵ دقیقه قبل از تزریق داخل وریدی PTZ دریافت کردند؛ ۳- گروه کنترل مثبت که حیوانات به مدت ۱۰ روز متواالی دیازپام با دوز ۱ میلی- گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفائی دریافت کرده و در روز آخر دیازپام ۴۵ دقیقه قبل از تست تشنج به حیوانات تزریق گردید. ۴- ۵- ۶- گروه‌های تحت آزمایش که به ترتیب ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی- گرم/کیلوگرم عصاره هیدروالکلی باپونه به مدت ۱۰ روز متواالی دریافت کرده و در روز آخر عصاره ۴۵ دقیقه قبل از تست تشنج به حیوانات تزریق گردید؛ و ۷- گروهی که دوز غیرموثر دیازپام ۰/۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به همراه دوز غیرموثر عصاره ۵۰ میلی- گرم/کیلوگرم) را به صورت تزریق داخل صفائی ۴۵ دقیقه قبل از تست تشنج دریافت کردند.

#### تهیه عصاره:

سرشارخه گل باپونه از نمونه هرباریومی موسسه جنگل‌ها و مراعع کشور با کد ۱۹۸۵۶ در فصل گل‌دهی از منطقه فندقلو استان اردبیل تهیه گردید. برای عصاره‌گیری بعد از آسیاب کردن گیاه خشک شده آن را در داخل ظروف مخصوص ریخته و در ۳۰۰ گرم/لیتر آتانول ۸۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت نگه داشته شد. پس از فیلتر کردن، آتانول از محلول به‌وسیله دستگاه روتاری برداشته شد. برای تهیه دوزهای مورد نظر، عصاره به دست آمده در نرمال سالین حل گردید و سپس مورد استفاده قرار گرفت [۱۸].

#### ایجاد تشنج با انفولوژیون پتیلن ترازوول:

ابتدا حیوانات طی ۱۰ روز متواالی تحت پیش‌درمان با تزریق داخل صفائی داروها قرار گرفتند. سپس، در روز دهم

نسبتاً زیاد داروهای ضد صرع که می‌توانند فعالیت تشنجی را تضعیف کنند، متاسفانه تاکنون دارویی که بتواند به‌دبیال صدمات CNS از ایجاد کاتلون تشنجی جلوگیری کند، شناخته نشده است. علاوه بر آن، مصرف داروهای شیمیایی ضد صرع با عوارض جانبی و در برخی موارد با مسمومیت دارویی همراه هستند، لذا توجه دوباره محققان به گیاهان دارویی با عارضه جانبی کمتر جهت کنترل حملات صرع معطوف شده است. برای مثال، می‌توان به گیاه بابونه اشاره کرد [۷]. تاکنون حدود ۱۳۰ گونه از بابونه Matricaria شده که در میان آنها بابونه آلمانی (*recutita* L.) شناخته شده‌تر از بقیه است [۸]. گیاهان خانواده کاسنی (Astraceae) گیاهان علفی با برگ‌ها با شکل متنوع هستند که به‌ندرت به صورت درختچه می‌باشند. یکی از گونه‌های ارزشمند این خانواده بابونه آلمانی می‌باشد. از مهم‌ترین ترکیب‌های این گیاه فلاونوئیدها، سزکوئیتین‌های آلفا-بیزاپول، کاما-زولن، فارنزن را می‌توان نام برد. گلچه‌های این گیاه حاوی لوتوولین، اپی‌ژنین و همچنین کوثرستین آزاد می‌باشد [۹-۱۱]. یافته‌های قبلی نشان داده‌اند که ترکیبات فلی موجود در ساختار بابونه بعنوان آنتی‌اکسیدان و از بین برنده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و از تخریب کلارژن در برابر رادیکال‌های آئینون سوپراکسید حفاظت می‌نمایند [۱۲]. ترکیبات فلی از جمله فلاونوئیدها از طریق مهار سیستم سیتوکروم P450 باعث کاهش رادیکال‌های آزاد می‌شوند [۱۳]. فلاونوئیدهای بابونه بر طیف وسیعی از آنزیم‌های بدن پستانداران از جمله نیتریک اکسید سنتاز تاثیر می‌گذارند؛ این تاثیرات و توانایی‌های گسترده فلاونوئیدها باعث شده که آنها را تغییر دهنده‌های بیولوژیکی بنامند [۱۴]. از طرف دیگر رادیکال‌های آزاد در پاتوژن‌بیماری از بیماری‌ها از جمله صرع دخیل می‌باشند و نقش نیتریک اکساید در تشنج همچنین در تشنج‌های القاء شده با پتیلن ترازوول دیده شده است [۱۵]. احتمال می‌رود عصاره بابونه به‌علت داشتن اپی‌ژنین با سیستم گاباائزیک اثرات ضد تشنجی داشته باشد [۱۶]. علی‌رغم چندین مطالعه محدود که روی اثر ضد تشنجی بابونه آلمانی انجام شده [۱۶]، تاکنون مطالعه‌ای درباره اثر ضد تشنجی بابونه و تداخل آن با سیستم نیتریک گزارش نشده است. با توجه به مصرف طولانی مدت داروهای ضد تشنج و همچنین عوارض جانبی آنها این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاه بابونه آلمانی بر تشنجات ناشی از پتیلن ترازوول در موش کوچک آزمایشگاهی طراحی گردید.

#### مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی تعداد ۵۶ سر موش سوری نر نزد NMRI (۲۵-۳۰ گرم) از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی

اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک اکساید در بافت مغز:  
سنجد غلظت نیتریک اکساید بافت مغزی بر اساس واکنش گریس انجام شد [۲۱]. به علت اینکه سنجد مستقیم این فاکتور در نمونه‌های پیولوژیکی مشکل است، به همین علت مقدار نیتریت ( $\text{NO}_2$ ) و نیترات ( $\text{NO}_3$ ) به عنوان شاخصی برای تولید نیتریک اکساید مورد سنجد قرار می‌گیرد [۲۱]. محلول کاری گریس حاوی فسفریک اسید ۵ درصد حاوی N-(1-)Naphthyl ethylenediamine dihydrochloride و سولفنا-نیل آمید است. پروتئین‌های موجود در نمونه با اضافه کردن استونیتریل با نسبت ۲ (استونیتریل) به ۱ (پلاسمایا بافت هموژنه) و سانتریفیوژ کردن در ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شدند. محلول پروتئین‌زادایی شده برای انجام آزمایش استفاده گردید.

#### روش‌های آماری:

نتایج به دست آمده به کمک نرمافزار SPSS و انجام آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) و آزمون تعییبی Tukey مورد بررسی قرار گرفتند. سطح معنی‌داری بین گروه‌ها ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شد. نتایج این مطالعه به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار در نمودارها نشان داده شده است.

#### نتایج

اثر دوزهای مختلف عصاره آبی-الکلی بابونه آلمانی بر دوز آستانه تشنج:

آستانه تشنج در گروه دریافت‌کننده  $30/28 \pm 1/34$  PTZ میلی‌گرم/کیلوگرم و در گروه‌های بابونه (۱۰۰، ۵۰، و ۲۰) به ترتیب  $48/57 \pm 1/54$ ،  $27/93 \pm 1/35$ ،  $22/43 \pm 1/48$  و  $1/44$  میلی‌گرم/کیلوگرم و در گروه دریافت‌کننده دیازپام  $82/68 \pm 0/44$  میلی‌گرم/کیلوگرم به دست آمد. آستانه تشنج در گروه دریافت‌کننده ترکیب دوز غیر-موثر دیازپام و دوز غیرموثر عصاره بابونه  $54/64 \pm 2/28$  میلی‌گرم/کیلوگرم مشاهده شد که نشان می‌دهد افزایش معنی‌داری در آستانه تشنج گروه دریافت‌کننده دوز غیرموثر عصاره بابونه و دوز غیرموثر دیازپام نسبت به گروه PTZ به وجود آمده است. نتایج این مطالعه نشان داد که آستانه تشنج در گروه‌های دریافت‌کننده بابونه با دوز  $200$  میلی‌گرم/کیلوگرم و دیازپام  $1$  میلی‌گرم/کیلوگرم و همچنین گروه دریافت‌کننده دوز غیرموثر عصاره بابونه و دوز غیرموثر دیازپام نسبت به گروه PTZ افزایش معنی‌دار داشته است ( $P < 0.01$ ). آستانه تشنج در گروه بابونه با دوز  $50$  میلی‌گرم/کیلوگرم نسبت به گروه PTZ تغییر معنی‌داری نشان نداد (نمودار شماره ۱).

داروی PTZ (۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) در نرمال سالین حل شده و با سرعت ثابت  $0/5$  میلی‌لیتر/دقیقه توسط پمپ تزریق به داخل یکی از وریدهای دمی حیوان تزریق شد. به منظور تعیین آستانه تشنج، حیوان بعد از توزین داخل مهار کننده قرار گرفت و داروی پتیلن ترازوول به وسیله یک لوله پلی‌اتیلن که از یک سو به سرنگ انسولین حاوی PTZ و از سوی دیگر به سوزن شماره ۳۰ دنداپرژشکی متصل بود تزریق گردید. انفوژیون PTZ تا زمان بروز تشنج میوکلونیک ادامه یافت. حیوان در طول مدت تزریق تحت نظر بوده و زمان بین شروع تزریق تا شروع تشنج میوکلونیک بر حسب دقیقه ثبت شد. زمان ثبت شده برای هر مرحله با استفاده از فرمول زیر به دوز آستانه تشنج تبدیل شد [۱۹]:

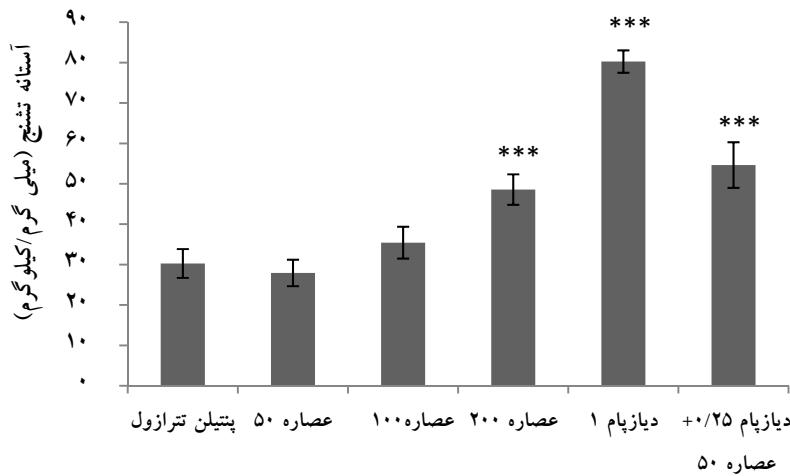
$$\frac{\text{زمان ثبت شده (min)}}{\text{وزن (kg)}} = \frac{\left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right) * \text{سرعت تزریق} \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}}\right)}{\text{دوز آستانه تشنج} \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}}\right)}$$

#### سنجد فاکتورهای بیوشیمیایی:

به منظور سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی، پس از ثبت مشاهدات رفتاری تمامی حیوانات در همه گروه‌ها با استفاده از اتر بیهوش شده و پس از قطع سر، مغز آنها به سرعت خارج شد. سپس، مغز حیوانات با بافر فسفات سالین (PBS) هموژنیزه شد. در مرحله بعد محلول هموژنیزه حاصل در دستگاه سانتریفیوژ با دور  $3500$  دور در دقیقه و به مدت  $10$  دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، محلول شفاف رویی جدا گردید، بخش زیرین رسوب کرده را دور ریخته و محلول شفاف رویی برای سنجش استفاده گردید. سنجش پروتئین بافت مغزی با روش بردفورد و سنجش میزان نیتریک اکساید به روش گریس انجام شد.

#### سنجد میزان پروتئین بافت مغز:

جهت استاندارد سازی اندازه‌گیری غلظت NO سنجش پروتئین بافت مغزی با روش بردفورد انجام گرفت [۲۰] و در این مطالعه میزان نیتریک اکساید به ازای میلی‌گرم پروتئین موجود در بافت گزارش شد. در این روش جهت تهیه معرف بردفورد ابتدا  $100$  میلی‌گرم کوماسی بلو 250-G با  $100$  میلی‌لیتر اسید فسفریک  $85$  درصد مخلوط می‌شود. برای این روش از آلبومین سرم گاوی جهت تهیه استانداردها استفاده گردید. حجم مناسبی از عصاره بافتی را به حجم  $1$  میلی‌لیتر رسانده و  $3$  میلی‌لیتر از محلول بردفورد به آن اضافه نموده و به مدت دقیقه  $10$  انکوبه گردید. سپس، در طول موج  $595$  نانومتر جذب قرائت شد. غلظت پروتئین با رسم استانداردهای موردنظر به دست آمد.



نمودار شماره ۱: اثر دوزهای مختلف عصاره آبی-الکلی بابونه آلمانی و دیازپام بر دوز آستانه تشنجه در مدل تزریق داخل وریدی پتیلین ترازوول (Mean $\pm$  SEM, n=8) (PTZ).

\*\* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار گروه‌ها با  $P<0.01$  در مقایسه با گروه PTZ می‌باشد.

### بحث

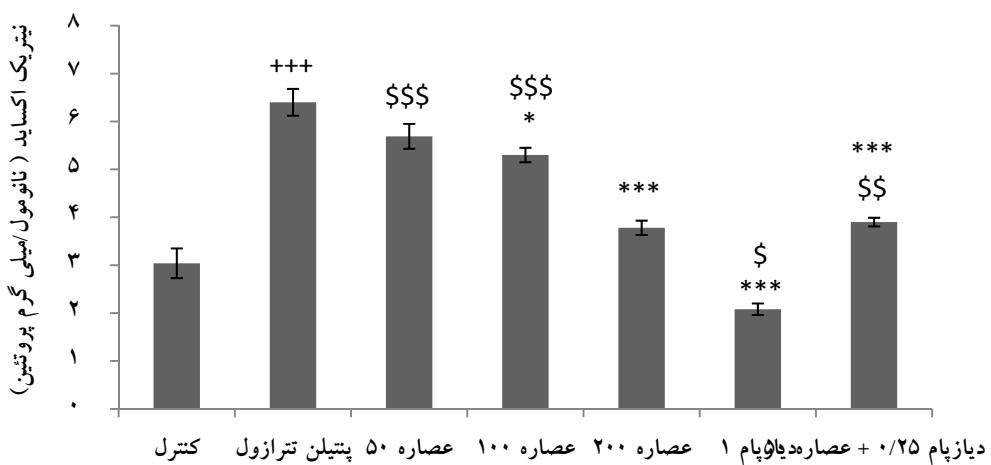
**گیاهان دارویی بهدلیل کاربرد درمانی آن‌ها از گذشتہ دور مورد توجه ویژه مردم بوده‌اند و اثرات درمانی آن‌ها طی سال‌های متعددی به اثبات رسیده است [۲۲]. گزارشاتی مبنی بر اثرات ضد صرعی بابونه وجود دارد که هم‌راستا با مطالعه حاضر می‌باشد. برای مثال، در مطالعه صوفی آبادی و همکاران اثر تزریق درون‌صفاقی دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدرووالکلی بابونه بر تشنجه در موش‌های صحرایی نر بررسی شده است. طبق نتایج این مطالعه تجویز درون‌صفاقی عصاره هیدرووالکلی بابونه می‌تواند به طور مؤثری تشنجه القاء شده با پتیلین ترازوول را کاهش دهد. همچنین، در مطالعه ارضی و همکاران تاثیر عصاره مذکور بر تشنجات ناشی از نیکوتین بررسی شده و نشان داده شده است که بابونه روی فاکتورهای شروع تشنجه، دوام تشنجه و شدت آن اثر مهاری داشته است [۲۳]. عصاره بابونه حاوی ۱۲۰ نوع ترکیب شیمیایی است که از جمله مهم‌ترین ترکیبات فعل موجود آن می‌توان به کامازولین، اپیژنین و بیسابلول اشاره نمود [۲۴]. در این مطالعه تأثیر پیش‌درمانی سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدرووالکلی گیاه بابونه در درمان تشنجه ناشی از القاء تزریق PTZ بررسی شد. براساس نتایج بدست آمده دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آستانه تشنجه را به طور معنی‌داری افزایش داد. از دیازپام به عنوان گروه کنترل مثبت استفاده شد که با دوز ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم اثر قوی‌تری در مهار تشنجه نسبت به عصاره داشت. دیازپام آگونیست گیرنده‌های بنزودیازپینی بوده و با اثر روی گیرنده‌های گابا و در نهایت ورود یون کلر به نورون‌ها اثر ضد تشنجه خود را اعمال می‌کند [۲۵]. دیازپام با افزایش**

اثر دوزهای مختلف عصاره آبی-الکلی بابونه آلمانی بر میزان نیتریک اکساید بافت مغز:

سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید در گروه کنترل  $۳/۰\pm ۰/۳۱$  نانومول/میلی‌گرم پروتئین بود و در گروه دریافت‌کننده پتیلین ترازوول به  $۶/۴۰\pm ۰/۲۸$  نانومول/میلی‌گرم پروتئین افزایش یافت که در مقایسه با گروه کنترل این افزایش معنی‌دار بود ( $P<0.001$ ). سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید در نمونه‌های هموژنیزه بافت مغز در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره بابونه با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به ترتیب  $۳/۷۸\pm ۰/۱۸$  و  $۵/۳۰\pm ۰/۱۵$  نانومول/میلی‌گرم پروتئین بود و نسبت به گروه دریافت‌کننده پتیلین ترازوول کاهش یافت که این کاهش در گروه بابونه با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم با  $P<0.05$  و برای عصاره با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم با  $P<0.01$  معنی‌دار بود. میزان متابولیت‌های NO در نمونه‌های هموژنیزه بافت مغز در گروه‌های دیازپام با دوزهای ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن حیوان و گروه دریافت‌کننده ترکیب دیازپام و بابونه به ترتیب  $۴/۲۸\pm ۰/۰۹$  و  $۲/۸\pm ۰/۱۲$  نانومول/میلی‌گرم پروتئین بود که در گروه‌های دریافت‌کننده دیازپام ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم و ترکیب دوز غیرموثر بابونه و دوز غیرموثر دیازپام در مقایسه با گروه دریافت‌کننده پتیلین ترازوول کاهش معنی‌داری نشان داد ( $P<0.05$ ). میزان متابولیت‌های NO در نمونه‌های هموژنیزه بافت مغز در گروه دیازپام با دوز ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم با  $P<0.001$  پایین‌تر از میزان متابولیت‌های NO در نمونه‌های هموژنیزه بافت مغز در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره بابونه با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ و ترکیب دیازپام و بابونه بود (نمودار شماره ۲).

آزاد کرده و همچنین PTZ جریان کلری القا شده با نوروترانسミتر را کاهش می دهد [۲۶، ۲۷].

عملکرد گابا آستانه تشنج را در گروه صرعی شده با PTZ افزایش داده و اثر ضد تشنجی دارد. کانالهای کلسیمی و سدیمی را تحت تاثیر قرار داده و ذخایر یون‌های کلسیمی درون سلولی را



نمودار شماره ۲- اثر دوزهای مختلف عصاره آبی-الکلی بابونه آلمانی بر میزان نیتریک اکساید در بافت مغز  
(Mean ± SEM, n=8)

\$\$\$ نشان دهنده تفاوت معنی دار گروهها با  $P<0.001$  در مقایسه با گروه کنترل می باشد.

\*\* نشان دهنده تفاوت معنی دار گروهها با  $P<0.01$  در مقایسه با گروه PTZ می باشد.

++ نشان دهنده تفاوت معنی دار گروه PTZ با  $P<0.001$  در مقایسه با گروه کنترل می باشد.

\$ نشان دهنده تفاوت معنی دار گروهها با  $P<0.05$  در مقایسه با گروه کنترل می باشد.

\* نشان دهنده تفاوت معنی دار گروهها با  $P<0.05$  در مقایسه با گروه PTZ می باشد.

است یکی از مکانیسم‌های اصلی درگیر در بروز اثر ضد تشنجی بابونه تحریک سیستم گابا و گیرنده‌های بنزو دیازپینی باشد [۳۰]. نشان داده شده است که فلاونوییدهای موجود در بابونه لیگاند های برای گیرنده‌های گابا در سیستم اعصاب مرکزی هستند و علاوه بر این، آنها به عنوان مولکول‌های شبیه بنزو دیازپینی عمل می‌کنند [۳۱، ۳۲]. تحقیقات نشان داده است که اپیزنین به گیرنده‌های بنزو دیازپینی متصل شده و احتمالاً ورود گلر را از طریق کانال‌های کلری تسهیل کرده و باعث هیپرپلاریزاسیون سلول می‌شود [۱۴، ۱۵]. با این حال، در یکی از مطالعات بیان شده است که تمایل اپیزنین به گیرنده‌های بنزو دیازپینی کم بوده و اثر آن به وسیله آنتاگونیست ویژه گیرنده بنزو دیازپینی بلوکه نمی‌شود [۳۳]. بابونه کانال‌های پتاسیمی را فعال کرده و کانال‌های کلسیمی را غیر فعال می‌کند و ممکن است این امر موجب اثرات آرام‌بخشی، خواب‌آوری، ضد تشنجی و ضد اضطرابی این دارو باشد. از آنجایی که PTZ باعث افزایش مقدار کلسیم داخل سلولی و کاهش ورود یون گلر به درون سلول می‌شود، می‌تواند باعث تشنج شود. این احتمال وجود دارد که عصاره بابونه با مهار کانال‌های کلسیمی و

این احتمال وجود دارد که عصاره بابونه از طریق گیرنده‌های گابا موجب افزایش ورود گلر به درون نورون‌ها و هایپرپلاریزه شدن آنها گردیده باشد که شاید مکانیسم احتمالی اثر ضد تشنجی بابونه برای مقابله با تشنجات ناشی از PTZ باشد. گیرنده GABA<sub>A</sub> گیرنده ناقل عصبی مهاری بر جسته در سیستم اعصاب مرکزی مهره‌داران است. گیرنده‌های GABA<sub>A</sub> با کانال‌های کلری مرتبط هستند و در صورت فعال شدن این کانال‌ها، رسیدن پتانسیل غشاء به پتانسیل آستانه را که برای تولید پتانسیل عمل ضروری است مشکل می‌کنند [۲۸]. مهار گیرنده‌های گابا و یا تحریک کانال‌های سدیمی، کانال‌های کلسیمی و گیرنده گلوتامات در سیستم اعصاب مرکزی منجر به تحریک نورون‌ها و ایجاد تشنج می‌شود. داروهای ضد صرع سیستم‌های تحریکی مغز (کانال‌های سدیمی، کانال‌های کلسیمی و گیرنده گلوتامات) را مهار کرده و سیستم‌های مهاری (گیرنده گابا) را فعال می‌کنند [۴]. مطالعات نشان داده است که اپیزنین موجود در عصاره بابونه می‌تواند اثراتی مشابه گابا داشته و با باز کردن کانال‌های کلری و هایپرپلاریزه کردن نورون‌ها آستانه تشنج را افزایش دهد [۲۹]. بنابراین، ممکن

مهم‌ترین ترکیب‌های دارویی هستند [۳۸]. ترکیبات فنلی از جمله فلاونوئیدها از طریق مهار سیستم سیتوکروم P450 باعث کاهش رادیکال‌های آزاد می‌شود. فلاونوئیدهای بابونه بر طیف وسیعی از آنزیم‌های بدن پستانداران از جمله نیتریک اکسید سنتاز تاثیر می‌گذارند و از طرفی رادیکال‌های آزاد در پاتوژن بسیاری از بیماری‌ها از جمله صرع دخیل می‌باشند. نقش نیتریک اکساید در تشنج‌های القاء شده با پتیلن ترازوول اثبات شده است. بر این اساس احتمال می‌رود که شاید بابونه با دخالت در مسیر سنتز یا عمل نیتریک اکساید موجب کاهش شدت تشنجات ناشی از PTZ شده است. با توجه به استفاده از عصاره تام گیاه بابونه در این پژوهش و ترکیبات متفاوتی که در آن وجود دارد، تعیین دقیق این که کدام-یک از ترکیبات موجود در عصاره مسئول اثر ضد تشنجی آن بوده ضرورت دارد. پیشینه مطالعاتی این گیاه نشان می‌دهد که کارهای تحقیقاتی چندانی روی آن صورت نگرفته است. بنابراین جهت روشن شدن بیشتر موضوع پیشنهاد می‌شود اثر عصاره گیاه بابونه به‌همراه آتناگونیست گیرنده‌های گاباژرژیک در موش‌های نر و ماده بررسی و مقایسه شود.

### نتیجه‌گیری

صرف عصاره هیدروالکلی گیاه بابونه (۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، دیازپام ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم و ترکیب دوز غیرموثر بابونه و دوز غیرموثر دیازپام توانست سطح آستانه تشنج ناشی از تزریق حد PTZ را در موش‌های کوچک آزمایشگاهی به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. همچنین، مصرف عصاره هیدروالکلی گیاه بابونه (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و دیازپام ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم و نیز ترکیب دوز غیرموثر بابونه و دوز غیرموثر دیازپام توانست میزان NO را در مغز موش‌های مبتلا به ضایعه تشنجی به‌طور معنی‌داری کاهش دهد. این نتیجه مؤید اثرات ضد تشنجی مصرف این گیاه در طب ستّی می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی شماره ۹۶۳۸ مربوط به پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم مریم کاظمی می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی کاشان اجرا شده است. بدین‌وسیله، نویسنده‌گان از کلیه کسانی که در گردآوری این پژوهش همکاری و مساعدت نمودند، کمال سپاسگزاری را دارند.

کاهش سطح آن در نورون‌ها موجب افزایش آستانه تشنج در گروه عصاره ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم شده باشد. این موضوع اساساً مولکولی اثر تضعیفی این گیاه را روی فعالیت CNS توجیه می‌کند. این شواهد فرضیه مؤثر بودن گیاه بابونه را بر تشنج تقویت می‌کند. مطالعات نشان داده است که رادیکال‌های آزاد در پاتوژن صرع دخالت دارند و این فاکتورها از طریق افزایش سطح گلوتامات مغزی، فعال کردن گیرنده‌های NMDA و نیز تولید نیتریک اکساید روی حملات تشنجی تاثیر می‌گذارند [۵]. فلاونوئیدها آنتی‌اکسیدان‌های موثری در خشی کردن رادیکال‌های آزاد هستند و می‌توانند رادیکال‌های آزاد را پاک‌سازی کنند. ترکیبات فنلی می‌توانند یک اتم هیدروژن را از گروه OH آروماتیک به رادیکال آزاد داده و آن را خشی کنند [۳۷]. بخشی از اثرات ضد تشنجی بابونه به عوامل فنلی موجود در آن نسبت داده می‌شود [۲۹]. NO در تنظیم متابولیسم پایه دوبامین-گلوتامات و گابا ایفای نقش می‌کند؛ پس NO می‌تواند نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی صرع و افسردگی داشته باشد [۳۴]. NO در شکل نقش دارد. نیتریک اکساید در نورون‌ها به‌وسیله آنزیم نیتریک اکساید سیستاز نورونی سنتز می‌شود. در سیستم‌های بیولوژیکی نیتریک اکساید به نیتریت و نیترات تجزیه می‌شود. در سیستم عصبی مرکزی مقادیر زیاد نیتریک اکساید تولید شده به‌وسیله نورون‌ها تشنجات لیمبیک ایجاد می‌کند [۵]. نقش و عملکرد نیتریک اکساید در ایجاد یا مهار تشنج به‌طور کامل روشن نشده است. در مطالعه حاضر تزریق PTZ سبب افزایش سطح متابولیت‌های NO در بافت مغز شد. گونه‌های واکنشی نیتروژن (RNS) به‌ویژه NO مازاد در چندین مدل حیوانی تشنجی نشان داده شده است. وجود نیتریک اکساید مازاد در مغز ممکن است سبب آسیب سلول‌های عصبی شود. مقادیر زیاد نیتریک اکساید به‌دبان تحريك گیرنده NMDA در مغز تولید می‌شود [۳۵]. در مطالعه Han و همکاران DOZها تکراری PTZ باعث افزایش مقادیر نیتریت‌های حاصل از NO در مقایسه با گروه‌های درمان شده با نیتروایندازول شد [۳۶]. بعضی مطالعات نشان می‌دهند که NO به عنوان ماده محرك نورون‌ها عمل می‌کند و بنابراین در ایجاد تشنج نقش مهمی دارد؛ در حالی که مطالعات دیگر NO را یک ماده ضد تشنج می‌دانند که در حفاظت مغز در برابر آسیب‌های تشنج ایفای نقش می‌کند [۳۷]. فلاونوئیدها از مواد مؤثره تشکیل‌دهنده گل‌های بابونه و از جمله

**References:**

- [1] Sander JW. The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol* 2003; 16(2): 165-70.
- [2] Thurman DJ, Beghi E, Begley CE, Berg AT, Buchhalter JR, Ding D, et al. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. *Epilepsia* 2011; 52 Suppl 7: 2-26.
- [3] Salmani ME, Mirnajafizadeh J, Fathollahi Y. Offsetting of aberrations associated with seizure proneness in rat hippocampus area CA1 by theta pulse stimulation-induced activity pattern. *Neuroscience* 2007; 149(3): 518-26.
- [4] Fauci EB, Isselbacher K, Wilson J, Martin J, Kasper D, Hauser S, Longo D. Harrison's Principles of Internal Medicine 14<sup>th</sup> ed. 1998.
- [5] Reid CA, Jackson GD, Berkovic SF, Petrou S. New therapeutic opportunities in epilepsy: a genetic perspective. *Pharmacol Ther* 2010; 128(2): 274-80.
- [6] Axel B, Gisela G, Mathias B. Anti epileptic drugs their effects on kindled seizure and kindling induced learning impairment. *Pharm Biochem Behav* 1995; 52(3): 453-9.
- [7] Miraj S, Alesaeidi S. A systematic review study of therapeutic effects of Matricaria recutita chamomile (chamomile). *Electron Physician* 2016; 8(9): 3024-31.
- [8] Jahan M, Koocheki A. Effect of organic production of german chamomile (Matricaria chamomilla L.) on its chemical composition. *In Agronomy Horticulture* 2004.
- [9] Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, et al. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol* 2002; 20(12): 522-31.
- [10] Ganzera M, Schneider P, Stuppner H. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (Matricaria recutita L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. *Life Sci* 2006; 78(8): 856-61.
- [11] Srivastava JK, Pandey M, Gupta S. Chamomile, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. *Life Sci* 2009; 85(19-20): 663-9.
- [12] Kováčik J, Klejdus B, Baćkor M. Nitric oxide signals ROS scavenger-mediated enhancement of PAL activity in nitrogen-deficient Matricaria chamomilla roots: side effects of scavengers. *Free Radical Biol Med* 2009; 46(12): 1686-93.
- [13] Cordova CAS, Siqueira IR, Netto CA, Yunes RA, Volpatto AM, Filho VC, et al. Protective properties of butanolic extract of the Calendula officinalis L.(marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. *Redox Report* 2002; 7(2): 95-102.
- [14] Agullo G, Gamet-Payrastre L, Fernandez Y, Anciaux N, Demigne C, Remesy C. Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *Cancer Lett* 1996; 105(1): 61-70.
- [15] Osonoe K, Mori N, Suzuki K, Osonoe M. Antiepileptic effects of inhibitors of nitric oxide synthase examined in pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *Brain Res* 1994; 663(2): 338-40.
- [16] Heidari MR, Dadollahi Z, Mehrabani M, Mehrabi H, Pourzadeh-Hosseini M, Behravan E, et al. Study of Antiseizure Effects of Matricaria recutita Extract in Mice. *An NY Acad Sci* 2009; 1171(1): 300-4.
- [17] Heydari A, Norouzzadeh A, Khoshbaten A, Asgari A, Ghasemi A, Najafi S, et al. Effects of short-term and subchronic lead poisoning on nitric oxide metabolites and vascular responsiveness in rat. *Toxicol Lett* 2006; 166(1): 88-94.
- [18] Karbalay-Doust S, A Noorafshan, F Dehghani, MR Panjehshahin, A Monabati. Effects of Hydroalcoholic Extract of Matricaria chamomilla on Serum Testosterone and Estradiol Levels, Spermatozoon Quality, and Tail Length in Rat. *Iran J Med Sci* 2015; 35(2): 122-8.
- [19] Chen HH, Chan MH. Developmental lead exposure differentially alters the susceptibility to chemocunvulsants in rat. *Toxicology* 2002; 173(3): 249-57.
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry* 1976; 72(1): 248-54.
- [21] Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors* 2003; 3(8): 276.
- [22] Van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett Appl Microbiol* 2009; 48(4): 440-6.
- [23] Arzi A, Kesmati M, Alikhani M. Preventive effect of hydroalcoholic extract of Matricaria Chamomilla on Nicotine induced convulsions in mice. *J Babol Univ Med Sci* 2004; 6(2): 12-7.
- [24] Mosbofuaak MJ. Effect of organic production of german chamomile (Matricaria chamomilla L.) on its chemical composition. *Pajouhesh Sazandegi* 2004(61): 87-95.
- [25] Shih JJ, Ochoa JG. A systematic review of Antiepileptic drugs initiation and withdrawal. *Neurologist* 2009; 15(3): 122-31.
- [26] Chen L, Chan YS, Yung WH. GABA-B receptor activation in the rat globus pallidus potently suppresses pentylenetetrazol-induced tonic seizures. *J Biomed Sci* 2004; 11(4): 457-64.
- [27] Erdogan F, Golgeli A, Arman F, Ersoy AO. The effects of pentylenetetrazole-induced status epilepticus on behavior, emotional memory, and learning in rats. *Epilepsy Behav* 2004; 5(3): 388-93.
- [28] Staffstrom CE. Epilepsy: A Review of Selected Clinical Syndromes and Advances in Basic Science.

- J Cerebral Blood Flow Metabol** 2006; 26(8): 983-1004.
- [29] Tsang SY, Xue H. Development of Effective Therapeutics Targeting the GABA<sub>A</sub> Receptor: Naturally Occurring Alternatives. **Curr Pharm Des** 2004; 10(9): 1035-44.
- [30] Lepley DM, Li B, Birt DF, Pelling JC. The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. **Carcinogenesis** 1996; 17(11): 2367-75.
- [31] Fernández SP, Wasowski C, Loscalzo LM, Granger RE, Johnston GAR, Paladini AC, et al. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. **Eur J Pharmacol** 2006; 539(3): 168-76.
- [32] Medina JH, Viola H, Wolfman C, Marder M, Wasowski C, Calvo D, et al. Overview--flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. **Neurochem Res** 1997; 22(4): 419-25.
- [33] Avallone R, Zanolli P, Puia G, Kleinschmitz M, Schreier P, Baraldi M. Pharmacological profile of apigenine, a flavonoid isolated from matricaria chamomilla. **Biochem Pharmacol** 2000; 59(11): 1387-94.
- [34] Dhir A, Kulkarni SK. Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide** 2011; 24(3): 125-31.
- [35] Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **Trends Neurosci** 1991; 14(2): 60-7.
- [36] Han D, Yamada K, Senzaki K, Xiong H, Nawa H, Nabeshima T. Involvement of nitric oxide in pentylenetetrazole-induced kindling in rats. **J Neurochem** 2000; 74(2): 792-8.
- [37] Zandieh A, Maleki F, Hajimirzabeigi A, Zandieh B, Khalilzadeh O, Dehpour AR. Anticonvulsant effect of celecoxib on pentylenetetrazole-induced convulsion: Modulation by NO pathway. **Act Neurobiol Exp** 2010; 70(4): 390-7.
- [38] Švehlíková V, Bennett RN, Mellon FA, Needs PW, Piacente S, Kroon PA, et al. Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). **Phytochemistry** 2004; 65(16): 2323-32.