مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره چهاردهم، شمارهٔ ۵، شهریور ۱۳۹۱، صفحه ۲۸-۲۰

اثر عصاره هیدرومتانولی بهار نارنج Citrus aurantium بر تشنج ناشی از پنتیلن تترازول در موش های صحرایی نر

مهدی عباس نژاد (PhD)[1*]، بتول کرامت (PhD)[1]، سعید اسماعیلی ماهانی (PhD)[1]، مریم رضایی زاده رودکرد (MSc)[1]

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

دریافت: ۹۰/۹/۲۶، اصلاح: ۹۰/۱۱/۱۹، پذیرش: ۹۱/۲/۱۳

خلاصه

سابقه و هدف: در طب سنتی ایران استفاده از بهار نارنج جهت درمان طیف وسیعی از بیماری های عصبی به عنوان آرامش بخش، خواب آور و ضد تشنج پیشنهاد گردیده است استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها از جمله تشنج بعلت اثرات سوء کمتر، رو به فزونی می باشد. لذا این مطالعه به منظور بررسی خواص بهار نارنج در کنترل حملات تشنج در موش صحرایی انجام شد.

مواد و روشها: این مطالعه تجربی بر روی ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (۲۵۰-۲۰۰gr) که به ۶ گروه کنترل(PTZ)، کنترل مثبت (فنوباربیتال) و گروه درمانی عصاره (۷۵ mg/kg و ۱۵۰ و ۳۰۰ و ۶۰۰) تقسیم شدند، انجام گردید. تزریق به صورت داخل صفاقی انجام شد. پس از جمع آوری و خشک کردن گل برگ های تازه گیاه، عصاره متانولی (۷۰٪) بوسیله پرکولاتور تهیه و پس از حذف اتانول، عصاره بوسیله آون در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد خشک شد. برای ایجاد تشنج از پنتیلن تترازول با دوز ۹۰ mg/kg استفاده گردید و تغییرات زمان شروع تشنج، دوام تشنج، درصد مرگ و میر و درصد حفاظت از حملات تشنجی برای گروههای مختلف اندازه گیری و با گروه کنترل (PTZ) و کنترل مثبت (فنوباربیتال) مقایسه گردید.

یافته ها: نتایج نشان داد که دوز (mg/kg) ۳۰۰ عصاره دوره تأخیر تشنج را (۸±۱۹۸٪) در مقایسه با گروه کنترل (۳±۷۸٪) و طول دوره تشنج را (۴۶±۴۳۰٪) در مقایسه با گروه کنترل (۱۱۰±۱۳۵۰٪) بطور معنی داری کاهش داد ($p<0/05$). حفاظت از حملات نیز توسط دوزهای متفاوت در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان داد که مؤثر ترین دوز ۶۰۰ mg/kg (۶±۷۸٪) در مقایسه با گروه کنترل صفر بود ($p<0/05$). مرگ و میر ناشی از تشنج نیز بطور معنی داری توسط عصاره در دوز ۳۰۰ mg/kg برابر با ۰٪ (صفر) در مقایسه با گروه کنترل (۳۶٪) کاهش یافت ($p<0/01$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می رسد که عصاره هیدرو متانولی بهار نارنج می تواند برای پیشگیری از حملات تشنج بکار رود.

واژه های کلیدی: بهار نارنج، تشنج، موش صحرایی.

مقدمه

لزوم درمان طولانی مدت، مداوم و توأم با داروها، زمینه بروز عوارض جانبی متعدد داروها را جهت کنترل و درمان صرع بیشتر فراهم می‌کند، لذا توجه به طب سنتی و داروهای گیاهی با هدف دستیابی به داروهای کم‌خطر و با حداقل عوارض جانبی اهمیت پیدا می کند (۱). شیوع صرع حدود ۹-۷ در هزار می باشد و در همه سنین، نژادها و هر دو جنس بروز می کند. حملات صرعی در نتیجه عدم توازن در مهار و تحریک ارتباطات نورونی ایجاد می شوند که خود به علت تخلیه های ناگهانی و کنترل نشده نورون ها در سیستم عصبی مرکزی به وجود می آیند (۴-۲). در واقع صرع مجموعه ای از اختلالات سیستم اعصاب مرکزی است که به صورت تشنجات ناگهانی، زودگذر، تکرار شونده و غیر قابل پیش بینی با منشاء حسی، حرکتی و اتونوم ظاهر می شود (۵). از عوامل عمده ایجاد تشنج می توان به عفونت، ایسکمی و ضربه مغزی اشاره کرد (۷-۵) که به دنبال آن یک حالت التهابی در سیستم اعصاب مرکزی پدیدار می شود که این التهاب می تواند در مغز با بروز یک سری اختلالات و بیماری های عصبی از جمله صرع همراه باشد (۸و۵). برای ایجاد تشنج روش های مختلفی وجود دارد. کیندلینگ یکی از مهمترین مدل ها برای ایجاد تشنج به صورت مزمن می باشد (۹). پنتیلین تترازول (PTZ) در موش سوری و صحرایی، بصورت تزریق مکرر دوزهای زیر آستانه، کیندلینگ شیمیایی ایجاد می کند که این اثر می تواند حداقل ۸ ماه پس از تزریق باقی بماند، کیندلینگ شیمیایی با PTZ به عنوان مدلی برای صرع عمومی پذیرفته شده است (۱۰). صرع کنترل نشده علاوه بر آنکه باعث محدودیت بسیاری در فعالیت های روزانه فرد می گردد، می تواند آسیب های برگشت ناپذیر در سلولهای مغزی نیز ایجاد کند (۱۱). در سال ۱۹۱۲ برای اولین بار فنوباربیتال به عنوان یک داروی ضد تشنج جدید و مفید به کار گرفته شد و پس از آن فنی توئین معرفی شد (۱). از آنجا که درمان صرع نیازمند استفاده طولانی مدت و مداوم از داروها است. زمینه بروز عوارض جانبی نیز افزایش می یابد. بنابراین ضرورت توجه دوباره به طب سنتی و داروهای گیاهی با هدف دستیابی به داروهای کم خطر و با حداقل عوارض جانبی آشکارتر می شود . تحقیقات حاکی از اثر ضد

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۲۰۰۵/۴۱/پ م دانشگاه شهید باهنر کرمان می باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: کرمان، انتهای بلوار ۲۲ بهمن، مجتمع دانشگاه شهید باهنر، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تلفن: ۳۲۲۲۰۳۲-۰۳۴۱
e-mail: mabbas@mail.uk.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.3.7]

تشنجی گیاه بومادران می باشد (۱۲). گونه های مختلف Citrus به عنوان غذا استفاده می شوند، در طب سنتی پوست و برگ ها و ریشه آن ها به عنوان چاشنی یا دارو مورد استفاده قرار می گیرند (۱۳). جنس های Citrus حاوی ترکیبات فعالی مثل کومارین ها، فلاونوئیدها و مونوترپنوئیدها می باشند (۱۴). از میوه های این جنس جهت کاهش وزن استفاده می شود و عصاره آن ها به ویژه عصاره میوه نارنج منبع طبیعی حاوی ترکیباتی مثل سینفرین و کومارین می باشد (۱۶و۱۵) سینفرین آگونیست α- آدرنرژیک بوده و گیرنده های β ۳- آدرنرژیکی را فعال می کند. اکتاپامین هم آگونیست گیرنده های β ۳- آدرنرژیکی می باشد (۱۸و۱۷) که هر دو ترکیب تولید cAMP را مهار می کنند (۱۵). این آمین ها اثرات مختلفی را در بدن اعمال می کنند. از جمله در پاتوفیزیولوژی میگرن و سایر انواع سردردها نقش دارند (۱۹). پی – سینفرین بعنوان پروتوآلکالوئید در نارنج اثرات شبه افسردگی در مدلهای حیوانی دارد، که این اثر وابسته به دوز نمی باشد (۲۰). به نظر می رسد که گیرنده های α ۱ – آدرنرژیکی در این امر نقش داشته باشند، زیرا اثرات سینفرین توسط تجویز آنتاگونیست α ۱ – آدرنرژیکی مثل پرازوسین معکوس می شود (۲۱) کومارین ها هم از ترکیبات موجود در جنس Citrus می باشند که اثرات آن ها بر روی سیستم عصبی مرکزی از جمله اثر ضد دردی می باشد (۲۳و۲۲).

یکی از گونه های Citrus، نارنج با نام علمی Citrus Aurantium می باشد که از جمله گیاهان دارویی پر مصرف و بومی کشور ایران است و به عنوان پرتقال ترش شناخته می شود. در طب سنتی ایران گل های این گیاه در درمان بیماریهای عصبی نظیر هیستری، تشنج و ضعف اعصاب استفاده می شود. بعلاوه این گیاه به عنوان آرام بخش, خواب آور, اشتها آور و برطرف کننده تپش قلب شناخته شده است (۲۵و۲۴). مواد تشکیل دهنده essential oil گل ها و یا برگ های جوان این گیاه حاکی از وجود، آلکالوئید، لینالول، لینالیل استات، مسیرین، لیمونن و لیمونوئید و درصد قابل توجهی از فلاونوئیدها در برگ ها و گلهای این گیاه بوده که نشان دهنده بالا بودن این ترکیبات در گل ها نسبت به برگ ها است (۳۰–۲۶و۲۴). لینالول در حفاظت حیوان از حمله های صرعی القا شده در موش های سوری نقش موثری دارد (۳۵–۳۳). مطالعه Komiya و همکاران نشان داد که اسانس فرار لیمو باعث اثرات ضد اضطرابی و شبه ضد افسردگی در موش های سوری می شود. عامل مؤثر در این فعالیت ها عمدتاً لیمونن موجود در گیاه شناخته شد که از طریق گیرنده 5-HT $_{1A}$ اثر آرام بخشی خود را اعمال می کند (۳۴).

مطالعات دیگر نیز حاکی از اثر آرامش بخشی و ضد تشنجی لیمونین در مدل های حیوانی می باشد (۳۳). اثرات ضد اضطرابی و آرام بخشی آن در مطالعات انسانی نیز تایید شده است (۳۶). میسرین یا بتا– میسرین موجود در گیاه یک ترکیب منوترپنی است. میسرین از اسانس روغنی گیاهانی چون برگ بو، شاهپسند و سایر گیاهان بدست می آید (۳۷) و دارای اثرات ضد دردی، بلوکه کنندگی کانال سدیمی ولتاژی (۳۹و۳۸) و شل کنندگی عضلات (۴۱و۴۰) می باشد. فلاونوئیدهای موجود در گیاهان تاثیرات فارماکولوژیک وسیعی از جمله ممانعت از اکسیداسیون لیپوپروتئین های با وزن مولکولی پایین، جلوگیری از تجمع پلاکت ها و همچنین پایداری سلول های ایمنی را دارا هستند. لذا در درمان ناراحتی های روانی، عفونت های ویروسی، تورم و آلرژی استفاده می شوند (۴۰). Banaiyan و همکاران نشان دادند که استفاده از بهار نارنج قبل از عمل جراحی و به صورت پیش دارو دارای خواص ضد اضطرابی می باشد که این اثرات به دلیل ترکیبات موجود در بهار نارنج به خصوص فلاونوئیدها می باشد (۴۱).

با توجه به بکار گیری بهار نارنج در طب سنتی به عنوان تسکین دهنده اعصاب، آرامش بخش، خواب آور و نیز وجود اثرات ضد اضطرابی آن در ایران، این مطالعه به منظور بررسی خواص عصاره بهار نارنج در کنترل حملات، در موشهای صحرایی نر انجام شد.

مواد و روشها

گیاه مورد استفاده: در این مطالعه از گلبرگ های تازه نارنج با عنوان بهار نارنج استفاده شد. عصاره C. aurantium از باغات مرکبات کرمان جمع آوری و به تائید گیاه شناسان هر باریوم گروه زیست شناسی دانشگاه شهید باهنر رسید و با شماره ۱۴۰۲ در هرباریوم ثبت گردید و در سایه خشک و سپس آسیاب شد، در این تحقیق از روش پرکولاسیون استفاده گردید (۳۸). ۵۰ گرم از پودر گیاه را در دستگاه پرکولاتور ریخته و عصاره گیری با متانول ۷۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت انجام گردید. عصاره حاصل توسط دستگاه Rotatory evaporator تغلیظ و بعد از آن به داخل شیشه ساعت منتقل گردید و به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا سریع تر و کاملا خشک شود. در مرحله آخر رطوبت عصاره ۲/۳٪ بود.

تهیه محلول های تزریقی: دوزهای (mg/ml) ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰ و۶۰۰ از عصاره تهیه شد. پنتیلن تترازول (PTZ) از شرکت Aldrich- chemie با خلوص ۹۸ درصد با غلظت mg/kg ۹۰ برای ایجاد تشنج تهیه گردید (۴۲). فنوباربیتال از شرکت Chinoin- Budapest به عنوان داروی استاندارد ضد تشنج با غلظت mg/kg ۴۰ تهیه گردید. حجم تزریقی برای کلیه محلول های فوق ml/۱۰gr ۰/۱ وزن موش و به صورت داخل صفاقی بود. گروه کنترل علاوه بر اینکه توسط PTZ دچار تشنج شده بودند، برای درمان نرمال سالین دریافت کردند. فنوباربیتال ۲۵ دقیقه قبل از PTZ تجویز شد (۴۱–۳۹).

حیوانات آزمایشگاهی: موش های صحرایی نر نژاد Wistar با وزن ۲۵۰–۲۰۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. موش ها به طور جداگانه در قفس های استاندارد با سیکل شبانه روزی ۱۲ ساعته تاریکی و روشنایی و با دمای کنترل شده (۱±۲۲) سانتیگراد نگهداری شدند. حیوانات مورد مطالعه ۵ روز قبل از انجام آزمایش به طور روزانه بین ساعات ۱۰–۹ قبل از ظهر برای سازش با شرایط آزمایش و به حداقل رساندن استرس دست آموز می شدند. سپس حیوانات به طور تصادفی در گروه های ۶ تایی قرار گرفتند.

بعد از تزریق پنتیلن تترازول با دوز ۹۰mg/kg به هر یک از موش ها, شاخص های ذیل با استفاده از کورنومتر بر حسب ثانیه اندازه گیری و ثبت شد.

زمان شروع تشنج: فاصله زمانی از لحظه تزریق پنتیلن تترازول تا شروع حملات تونیک و کلونیک تشنج محاسبه گردید. با بروز حملات تشنج که عموما با کلونوس اندام حرکتی جلویی است مرحله اول تشنج مشخص می شود (۹).

دوام تشنج: فاصله زمانی از لحظه شروع تشنج تا خاتمه تشنج یا مرگ حیوان.

درصد مرگ و میر: نسبت تعداد موش هایی که متعاقب تزریق پنتیلن تترازول مردند به کل موش های آن گروه.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.3.7]

درصد محافظت protection percentage (٪): تعداد موشهایی که در هر گروه به آزمایش ها پاسخ داده اند.

محاسبه درصد محافظت هر پارامتر توسط فرمول زیر محاسبه شد (۴۳).

$$P\%=1-(nt/Nt)(nc/NC)\times100$$

در رابطه فوق nt: تعداد موش های گروه آزمایش هستند که پاسخ داده اند, Nt: تعداد کل موش های گروه آزمایش, nc: تعداد موش های گروه کنترل که پاسخ می دهند و Nc: تعداد موش های گروه کنترل می باشند.

گروه های مورد آزمایش:

گروه۱: موش های تشنجی بودند که نرمال سالین به عنوان حلال داروها در آن ها تزریق شد.

گروه های ۵-۲: در این گروه ها دوزهای(mg/kg) ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ عصاره بهار نارنج نیم ساعت قبل از تزریق PTZ صورت گرفت.

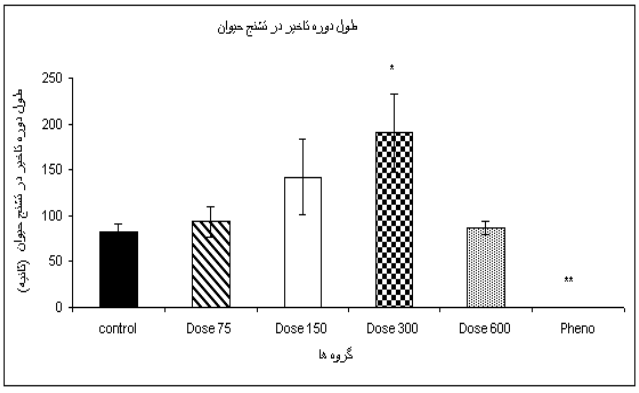
گروه ۶: گروه شاهد مثبت به صورت داخل صفاقی ۴۰mg/kg داروی فنوباربیتال را دریافت کردند.

محاسبات آماری: زمان شروع تشنج، دوام تشنج, درصد مرگ و میر و درصد محافظت در گروه های ۶ تایی ثبت گردید و برای مقایسه داده ها از آزمون ANOVA یک طرفه و متعاقب آن از آزمون Tukey استفاده شده و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد (۴۱).

یافته ها

با تزریق دوز ۹۰ mg/kg پنتیلن تترازول طیف وسیعی از حملات تشنجی در حیوانات شامل تیک های خفیف، راست شدن دم، خوابیدن گوش ها، جمع کردن دست ها و محدود شدن قدرت حرکت حیوان و یا حرکات لرزشی پی در پی و غیر ارادی و حرکات شدید تشنجی بود، ایجاد گردید.

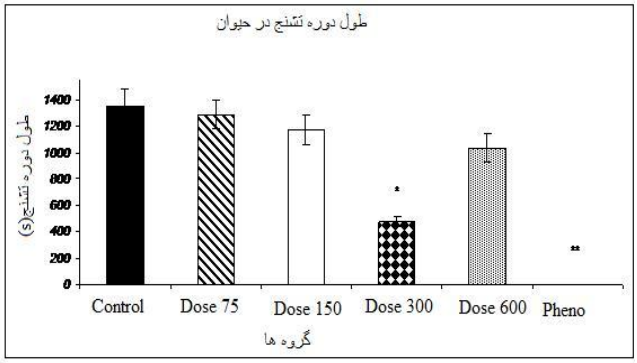
اثر تزریق عصاره هیدرومتانولی بهار نارنج بر تاخیر تشنج ناشی از پنتیلن تترازول: میانگین طول دوره تاخیر تشنج برای گروه کنترل ۸۵ ثانیه بود، درصورتیکه در رابطه با دوز ۳۰۰ mg/kg، ۱۸۰ ثانیه می باشد ($p<0/05$). همچنین اختلاف معنی داری بین دوزهای ۷۵ mg/kg، ۱۵۰، و ۶۰۰mg/kg دیده نشد (نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه اثر دوزهای مختلف عصاره بهار نارنج با گروه کنترل و شاهد مثبت که فنوباربیتال دریافت کرده بود بر تاخیر تشنج ناشی از پنتیلن تترازول. دوز ۳۰۰ mg/kg و گروه شاهد مثبت (n=7) ، **P<0.01, *P<0.05, phenol= Phenobarbital

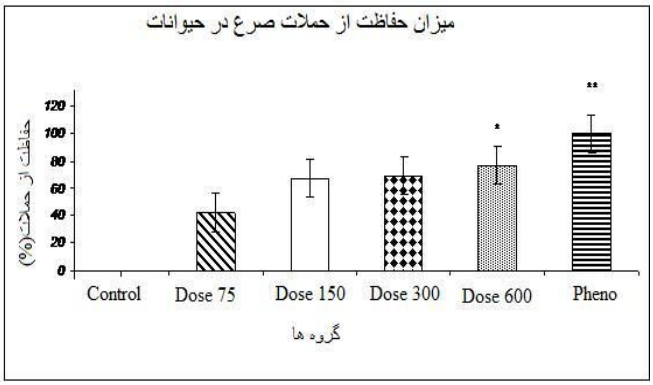
با تزریق دوزهای مختلف عصاره گیاه بهار نارنج ۵، ۱۵۰، ۳۰۰ mg/kg و ۶۰۰ مشاهده شد که این عصاره با افزایش غلظت تا ۳۰۰mg/kg باعث افزایش زمان تاخیر شروع حملات کلونیک و تونیک در موش صحرایی نر شد که در دوز ۳۰۰mg/kg عصاره تاثیر معنی دار می باشد ($p<0/05$).

اثر تزریق عصاره هیدرومتانولی بهار نارنج بر طول دوره تشنج ناشی از پنتیلن تترازول: میانگین طول دوره تشنج برای گروه کنترل ۱۳۵۰ ثانیه بود، در صورتیکه در رابطه با دوز ۳۰۰ mg/kg، ۴۳۰ ثانیه و فنوباربیتال صفر ثانیه می باشد ($p<0/05$). اختلاف معنی داری بین دوزهای ۷۵ mg/kg، ۱۵۰ و ۶۰۰ دیده نشد. نتایج نشان داد که دوز ۳۰۰mg/kg باعث کاهش طول مدت حملات کلونیک و تونیک تشنج گردید و در گروه شاهد مثبت (فنوباربیتال ۴۰mg/kg) باعث توقف حملات کامل شد (نمودار ۲).



نمودار ۲: مقایسه اثر دوزهای مختلف عصاره بهار نارنج با گروه کنترل و شاهد مثبت که فنوباربیتال دریافت کرده بود بر طول دوره تشنج ناشی از پنتیلن تترازول. دوز ۳۰۰ mg/kg و گروه شاهد مثبت (n=7) **P<0.01, *P<0.05, phenol= Phenobarbital

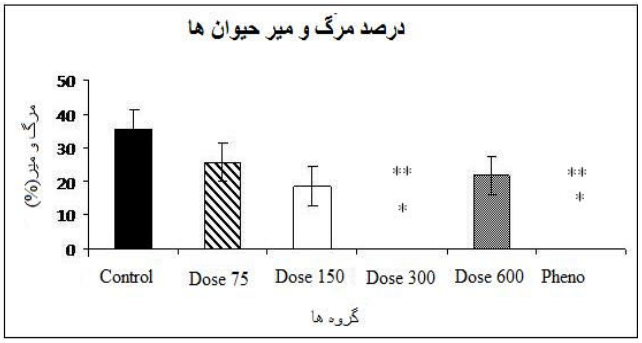
اثر تزریق عصاره هیدرومتانولی بهار نارنج بر درصد محافظت حیوان از تشنج ناشی از پنتیلن تترازول: درصد محافظت حیوان از تشنج برای گروه کنترل ۰٪ بود، درصورتیکه در رابطه با دوز ۳۰۰mg/kg، ۷۲٪ و در گروه فنوباربیتال ۹۴٪ می باشد ($p<0/05$) اختلاف معنی داری بین دوزهای ۷۵ mg/kg، ۱۵۰، و ۶۰۰ دیده نشد (نمودار ۳).



[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.3.7]

نمودار ۳: مقایسه اثر دوزهای مختلف عصاره بهار نارنج با گروه کنترل و شاهد مثبت که فنوباربیتال دریافت کرده بود بر درصد حفاظت از حملات صرع در حیوانات. دوزmg/kg ۶۰۰ و گروه شاهد مثبت pheno= Phenobarbital **P<0.01, *P<0.05, (n=7)

اثر تزریق عصاره هیدرومتانولی بهار نارنج بر درصد مرگ و میر حیوان در تشنج ناشی از پنتیلن تترازول: میانگین درصد مرگ و میر حیوان در تشنج برای گروه کنترل ۳۶٪ بود، در صورتیکه در رابطه با دوز mg/kg ۳۰۰ و گروه فنوباربیتال ۰٪ می باشد. در این رابطه بین دو گروه اختلاف معنی داری دیده نشد (p<۰/۰۵). همچنین اختلاف معنی داری بین دوزهای mg/kg ۷۵، ۱۵۰، و ۶۰۰ دیده نشد (نمودار ۴).



نمودار ۴: مقایسه اثر دوزهای مختلف عصاره بهار نارنج با گروه کنترل و شاهد مثبت (دریافت کننده فنوباربیتال) بر درصد مرگ و میر حیوانات. (n=7)، **P<0.01, *P<0.05, phenol=Phenobarbital

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه نشان داد که عصاره هیدرومتانولی بهار نارنج بخصوص در دوز ۳۰۰mg/kg موجب افزایش زمان تاخیری در شروع حملات تشنجی و کاهش طول مدت آن ها، کاهش درصد مرگ و میر حیوانات و نیز افزایش درصد محافظت حیوانات در برابر اثرات تشنج شد. همچنین اثر این عصاره بر کاهش درصد مرگ و میر حیوانات با اثر فنوباربیتال که یک داروی ضد صرع است، قابل مقایسه می باشد. همچنین مشخص گردید که اثرات فوق تا حدودی وابسته به دوز هستند چون دوز mg/kg ۳۰۰ از دوزهای کمتر و بیشتر اثرات بهتری را اعمال کرده است.

مطالعات انجام شده در مورد مواد تشکیل دهنده گل ها و یا برگ های جوان این گیاه نشان دهنده وجود ترکیباتی مثل لینانول، لینانیل استات، میسرین، لیمونن، لیمونوئید و فلاونوئیدها می باشد (۲۸-۲۶و۲۴). خیلی از عصاره های گیاهی با داشتن ترکیبات مشابه اثرات ضد صرعی نشان داده اند (۴۶-۴۴) اثرات ضد اضطرابی و آرام کننده اسانس گیاهی C.aurantium توسط مطالعات گذشته کاملا تائید شده است (۵۰-۴۷). یکی از ترکیبات اصلی عصاره بهار نارنج، لیمونن است که باعث کاهش فعالیت همزمان و دسته جمعی نورون های سیستم عصبی مرکزی می شود (۵۱). لیمونن از طریق گردش خون محیطی وارد مغز می شود و سپس به گیرنده های GABA A متصل شده که فعال شدن آن ها باعث ایجاد اثرات ضد اضطرابی می گردد (۵۱). تحقیقات مکمل دیگر نشان دادند که لیمونن اثرات قدرتمند ضد استرسی خود را با اثر بر روی گیرنده GABA A و افزایش غلظت گاما- آمینوبوتیریک اسید اعمال می کند (۵۲).

مشخص شده که در جوندگان اسانس فرار لیمو اثرات ضد اضطرابی ایجاد می کند. در خصوص توجیه اثرات آرام بخش بهار نارنج بر سیستم عصبی در مدل حیوانی به وجود ترکیب لیمونن و میسرین در آب اشاره شده و نشان داده شد که این دو ترکیب دارای خواص بیولوژیکی بوده و باعث اثرات مهار کنندگی بر سیستم اعصاب مرکزی می گردند (۵۳). بنابراین شاید بتوان گفت لیمونن یکی از ترکیباتی است که با اثر بر سیستم گاباارژیکی و از طریق سرکوب سیستم عصبی مرکزی همانطور که باعث ایجاد اثرات ضد اضطرابی می شود اثرات ضد صرعی را هم اعمال می کند.

کاندید دیگر در خصوص اثرات آرام بخشی و ضد استرس بهار نارنج، (۵۴) کومارین های موجود در گیاه هستند که Pereira در مطالعه خود نشان داد که تجویز حاد کومارین ها احتمالا از طریق اثر بر گیرنده GABA A باعث افزایش رها شدن گاما- آمینو بوتیریک اسید در قشر پریفرونتال می گردد و از آنجایی که میانجی گاما- آمینوبوتیریک اسید نقش مهمی در مهار نورون های مغز دارد بنابراین کومارین ها می توانند اثراتی در بهبود حملات تشنجی و صرعی داشته باشند (۵۰). عامل دیگری که دارای اثر کاهندگی بر فعالیت CNS می باشد لینالول است که در عصاره بهار نارنج وجود دارد. نشان داده شده که لینالول ویژگی سرکوب گرانه خود را از طریق مهار رهایش استیل کولین اعمال می کند (۵۳). علاوه بر این لینالول آنتاگونیست رقابتی گیرنده NMDA می باشد (۵۵و۳۳) و مشخص شده که بلوکه شدن گیرنده NMDA گلوتاماتی در اثرات ضد صرعی فلبامات سهیم می باشد (۵۳).

فلاونوئید ها دسته دیگری از ترکیبات موجود در عصاره بهار نارنج می باشند که تمایل بسیار بالایی به گیرنده های بنزودیازپینی سیستم عصبی مرکزی دارند و از این طریق باعث ایجاد سرکوب و آرامش در سیستم عصبی مرکزی می گردند. Mahmoudi و همکاران نشان دادند که فلاونوئید جدا شده از عصاره بهار نارنج دارای اثرات آرام بخش می باشد (۵۴). بسیاری از فلاونوئیدها در سیستم عصبی مرکزی لیگاندهایی برای گیرنده های گاما آمینو بوتیریک اسید نوع A ($GABA_A$) می باشند که منجر به این نظریه شده که می توانند به عنوان مولکول های شبه بنزودیازپینی عمل کنند. این نظریه توسط اثرات رفتاری آن ها در مدل های حیوانی اضطراب، افسردگی و تشنج ثابت شده است (۵۷و۵۶و۵۲). گفته شده فلاون های طبیعی و سنتتیک نیز ممکن است جریان های کلر تولید شده توسط گاما آمینو بوتیریک اسید را تعدیل کنند (۵۹-۵۷). مشتقات فلاونونی زیادی یافت شده اند که لیگاند هایی برای گیرنده های $GABA_A$ در سیستم عصبی مرکزی می باشند و با اتصال به نقاط اتصال داروهایی مثل بنزودیازپین ها منجر به فعالیت های سرکوبی در سیستم عصبی مرکزی موش های سوری می شوند (۵۵و۵۳).

در تأئید مطالب فوق گزارش شده که فلاونوئیدها مشابه دیازپام که تشنج ها را به طور کامل متوقف می سازد توانایی کنش متقابل با گیرنده های $GABA_A$ مرکزی را دارند. گیرنده های یونوتروف $GABA_A$ که توسط گاما آمینو بوتیریک اسید فعال می شوند کانالهای دریچه دار لیگاندی هستند که بیش ترین انتقالهای مهاری را در سیناپس ها میانجی گری می کنند. عملکرد گیرنده های $GABA_A$ نه تنها از ایجاد صرع جلوگیری می کنند بلکه از گسترش فعالیت صرعی در

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.3.7]

سرتاسر بافت کورتکس مغز ممانعت به عمل می آورند (۶۰). روی گیرنده $GABA_A$ حداقل ۱۱ جایگاه مجزا برای کنش متقابل با لیگاندهای مختلف وجود دارد (۵۹). فلاونوئیدهایی مثل فلاون ها به عنوان بنزودیازپین های گیاهی شناخته شده اند (۶۲و۶۱) و اثرات تعدیلی متفاوتی بر جایگاه بنزودیازپینی گیرنده $GABA_A$ دارند اما فاقد اثرات جانبی بنزودیازپین ها هستند (۶۳). گیرنده های $GABA_A$ دارای زیر واحد های α_1 و α_2 مجزایی می باشند. شواهد نشان می دهند که ترکیب های فلاونوئیدی موجود در عصاره C. aurantium به عنوان آگونیست نسبی و به طور گزینشی با تمایل بیش تر به زیر واحد α_2 و تمایل کمتر به زیر واحد α_1 گیرنده های $GABA_A$ تمایل نشان می دهند و باعث اثرات ضد تشنجی می شوند (۶۴). طبیعی است که ترکیبات مؤثره و نیز جزء اصلی و نسبت درصد اجزاء متشکله هر گیاه دارویی تابع شرایط رشد آن است و در تحقیق حاضر نیز نمی توان ادعا کرد مواد تشکیل دهنده عصاره عیناً مثل عصارهای مورد بررسی توسط سایر محققین بوده اما اصولاً شباهت های زیاد وابسته به جنس و گونه دیده می شود. همانطور که دیده شد اثر عصاره بصورت وابسته به دوز اعمال گردید که دوز ۳۰۰mg/kg بهتر از دوزهای کمتر و حتی بیشترین دوز ۶۰۰ mg/kg اثر پیشگیری بر حملات تشنج را نشان داد، که علت آن تا به حال برای ما مشخص نشده است، بنظر میرسد مشخص کردن ED50 و LT برای عصاره برای ادامه سودمند باشد.

به طور خلاصه نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره بهار نارنج که در طب سنتی ایرانیان جایگاه ویژه ای دارد و از آن به عنوان تسکین دهنده اعصاب و آرام بخش یاد شده است دارای اثر پیشگیرانه در بروز حملات تشنج ناشی از PTZ در موش های صحرایی است. این اثر وابسته به دوز عصاره می تواند وابسته به عواملی مثل فلاونوئیدهای موجود در عصاره که تمایل به گیرنده های $GABA_A$ دارند، مثل لیمونن ولینالول باشد که برای مشخص شدن مکانیسم دقیق احتیاج به طراحی آزمایش های تکمیلی می باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه شهید باهنر و از آقای دکتر میرتاج الدینی مسئول هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه شهید باهنر به دلیل همکاری و مساعدت خوب، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.3.7]

Effect of Hydro-Methanolic Extract of Sour Orange Flowers, Citrus Aurantium, on Pentylentetrazole Induced Seizure in Male Rats

M. Abbasnejad (PhD)[*1], B. Keramat (PhD)[1], S. Esmaili Mahani (PhD)[1], M. Rezaeezade-Roukerd (MSc)[1]

1. Department of Biology, School of Science, Shaheed Bahonar University, Kerman, Iran

J Babol Univ Med Sci; 14(5); Sep 2012; pp: 20-28.

Received: Dec 17th 2011, Revised: Feb 8th 2012, Accepted: May 2nd 2012.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: In Iranian folk medicine, Citrus aurantium flower extract is used to treat some neural diseases such as sleep disorder and anxiety. Tend to use medicinal herbs to treat diseases such as seizure, is growing. The present study was undertaken to evaluate the anticonvulsant effect of sour orange flowers of Citrus aurantium.

METHODS: In this experimental study, 42 adult male Wistar rats (200-250g) were divided into 6 groups: control (PTZ), positive control (phenobarbital) and extract treated groups (75, 150, 300 and 600 mg/kg, i.p,). Fresh sour orange flowers were collected, methanolic extract (70%) was provided by percolator, after the evaporation of methanol, the extract was dried by oven at the 40°C. Pentylentetrazole (90 mg/kg) was used for induction of seizure. Changes in the onset time of seizure, duration of seizure, percent of mortality and percent of seizure protection were determined in different groups and compared with control (PTZ) and positive control (phenobarbital).

FINDINGS: The extract (300 mg/kg), significantly reduced the latency of onset of seizure (198±8%) as compared with control (78±3%) ($p<0.05$), also duration of seizure significantly was reduced by the extract (300mg/kg) (430±46%) compared with control (1350±110%) ($p<0.05$). Percent of seizure protection significantly was increased by extract in comparison with control group; the dose of 600 mg/kg (78±6%) was the most effective dose in compared to control (0%) ($p< 0.05$). Seizure related mortality was significantly decreased by extract (300 mg/kg) (0%) in compared to control (36%) ($p<0.01$).

CONCLUSION: According to the results of this study, it seems that hydro-methanolic extract of Citrus aurantium can be used to prevent seizures.

KEY WORDS: *Citrus aurantium, Seizure, Rat.*

[*]**Corresponding Author;**
Address: Department of Biology, School of Science, Shaheed Bahonar University, Kerman, Iran
Tel: + 98 341 3222032
E-mail: mabbas@mail.uk.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.3.7]

References

1. Guerreiro CA. Guidelines for drug treatment of epilepsy: A critical review. Arq Neuropsiquiatr 2008;66(3A):591-9.
2. Cordo MG, Orlandi M LeccaD, Carboni G, Frau V Giorgi O. Pentylentetrazol-induced kindling in rats: effect of GABA function inhibitors. Pharmacol Behav 1991;40(2):329-33.
3. Hopkins A, Shorvon S, Casino G. Epilepsy. London: Chapman & Hall 1995; pp: 38-82.
4. Schrader LM, Stern JM, Koski L, Nuwer MR, Engel J. Seizure incidence during single-and-paired pulse transcranial magnetic stimulation (TMS) in individual with epilepsy. Clin Neurophysiol 2004;115(12): 2728-37.
5. Porter RJ, Meldrum BS. Antiseizure drugs. In: Katzung BG, eds. Basic and clinical pharmacology. New York: Lange Medical Books. McGraw Hill 2001; pp: 345-8.
6. McNamara JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. J Neuro Sci 1994;14(6): 3413-25.
7. Willmore LJ. Post treatment epilepsy: cellular mechanisms and implications for treatment. Epilepsia 1990;31(Suppl 3): 67-73.
8. Matyszak MK. Inflammation in the CNS: Balance between immunological privilege and immune responses. Prog Neurobiol 1998;56(1):19-35.
9. Akamatsu N, Fueta Y, Endo Y, et al. The therapeutic effects of high frequency transcranial magnetic stimulation on penthylentetrazol- induced status epilepticus in rats. Int Congr Ser 2005;1278:423-6.
10. Krug M, Koch M, Grecksch G, Schulzeck K. Pentylentetrazol kindling changes the ability to induced potentiation phenomena in the hipocampal CA1 region. Physiol Behav 1997;62(4):721-7.
11. Carvey PM. Drug action in the CNS. 1st ed. New York: Oxford University Press 1998; pp: 123-56.
12. Heidari MR, Ebrahimi S, Mehrabani M, Pardakhti A, Vafa Zadeh. Effects of Methanolic extract of Achillea Wilhelmsii C. koch on seizure induced by Picrotoxin in mice. J Babol Univ Med Sci 2005;7 (4):7-13. [in Persian]
13. Chiu NY, Chang KH. The illustrated medicinal plants of Taiwan. Taiwan: SMC Publishing 1987; p: 121.
14. Chan YY, Li CH, Shen YC, Wu TS. Anti- inflammatory principles from the stem and root barks of Citrus media. Chem Pharm Bull (Tokyo) 2010;58(1):61-5.
15. Airriess CN, Rudling JE, Midgley JM, Evens PD. Selective inhibition of adenylyl cyclase by octopamine via a human cloned alpha 2A-adrenoceptor. Br J Pharmacol 1997;122(2):191-8.
16. Calapai G, Firenzuoli F, Saitta A, et al. Antiobesity and cardiovascular effects of Citrus aurantium extracts in the rat: a preliminary report. Fitoterapia 1999;70(6):586-92.
17. Carpene C, Galitzky J, Fontana E, et al. Selective activation of beta3-adrenoceptors by octopamine: comparative studies in mammalian fat cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1999;359(4):310-21.
18. D'Andrea G, Terrazzino S, Fortin D, Farruggio A, Rinaldi L, Leon A. HPLC electrochemical detection of trace amines in human plasma and platelets and expression of mRNA transcripts of trace amine receptors in circulating leukocytes. Neurosci Lett 2003;346(1-2):89-92.
19. D'Andrea G, Terrazzino S, Fortin D, Cocco P, Balbi T, Leon A. Elusive amines and primary headaches: historical background and prospectives. Neurol Sci 2003;24(Suppl 2):65-7.
20. Song DK, Suh HW, Jung JS, Wie MB, Son KH, Kim YH. Antidepressant-like effects of p-synephrine in mouse models of immobility tests. Neurosci Lett 1996;214:107-10.
21. Kim KW, Kim HD, Jung JS, et al. Characterization of antidepressant-like effects of psynephrine stereoisomers. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2001;364(1):21-6.
22. Leal LKAM, Matos ME, Matos FJA, Rieiro RA, Ferreira FV, Viana GSB. Antinociceptive and antiedermatogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from Torresea cearensis Fr. All. Phytomedicine 1997;4:221-7.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.3.7]

23. Leal LK, Ferreira AA, Bezerra GA, Matos FJ, Viana GSB. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. J Ethnopharmacol 2000;70(2):151-9.

24. LM Lopes C, Gonçalves e Sá C, de Almeida AA, et al. Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of Citrus limon (Burn) essential oil in mice. Pharmazie 2011;66(8):623-7.

25. Zargari A. Medicine plants. 1st ed. Tehran: Tehran University Publication 1992; p: 484. [in Persian]

26. Ghassemi N, Azadbakht M, Sabzevari Sh. Phytochemical Analysis of Essential Oil of Citrus bigardia L Growing in Shiraz. DARU J Pharm Sci 1997;7(1):23-8. [in Persian]

27. Azadbakht M, Khoori V, Nayeb Pour M, Pourabook M, Fazelinejad S. The role of adrenoceptors in the electrophysiological effects of hydroalcoholic extract of Citrus bigaradia in experimental model of atrial fibrilation of isolated atrioventricular node of rabbits. J Mazandaran Univ Med Sci 2009;18(68):1-10. [in Persian]

28. Mosaddegh M, Kamali Nejad M, Dehmaoobad Sharif Abadi A, et. al. Composition of the volatile oils of the Citrus Bigaradia, Citrus Limon and Citrus Delicio. J Med Plants 2004;3(11):25-30. [in Persian]

29. Phillipson JD. Phytochemistry and pharmacognosy. Phytochemistry 2007;68(22-24): 2960-72.

30. Faturi CB, Leite RJ, Alves PB, Canton AC, Teixeira-Silva F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry 2010;34(4):605-9.

31. Elisabetsky E, Marschner J, Souza, DO. Effects of Linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. Neurochem Res 1995;20(4):461-5.

32. Elisabetsky E, Coelho de Souza GP, dos Santos MAC, et al. Sedative properties of Linalool. Fitoterapia 1995;66: 407-14.

33. Elisabetsky E, Brum LF, Souza DO. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. Phytomedicine 1999;6(2):107-13.

34. Komiya M, Takeuchi T, Harada E. Lemon oil vapor causes an anti- stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. Behav Brain Res 2006;172(2):240-9.

35. Fukumoto S, Morishita A, Furutachi K, et al. Effect of flavour components in lemon essential oil on physical or psychological stress. Stress Health 2008;24:3-12.

36. Sugawara Y, Hara C, Tamura K, et al. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool. Sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalool. Anal Chim Acta 1998;365: 293-9.

37. Chyau CC, Mau JL, Wu CM. Characteristics of the Steam-Distilled Oil and Carbon Dioxide Extract of Zanthoxylum simulans Fruits. J Agric Food Chem 1996;44(4):1096-9.

38. Haeseler, G, Maue, D, Grosskreutz, J, et al. Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. Eur J Anaesthesiol 2002;19(8):571-9.

39. do Vale TG, Furtado EC, Santos JG Jr, Viana GS. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotype from Lippia Alba (Mill) n.e. Brown. Phytomedicine 2002;9(8):709-14.

40. da Silva VA, de Freitas JC, Mattos AP, et al. Neurobehavioral study of the effect of beta-myrcene on rodents. Braz J Med Biol Res. 1991; 24: 827-31.

41. Banaiyan G, Rasti Boroujeni A, Shirmardi M. Comparison of the effect of Citrus aurantium and diazepam on preoperative anxiety. J Shahrekord Univ Med Sci 2009;10 (4):13-18. [in Persian]

42. Bandyopadhyay A. Pentylentetrazol (PTZ)-kindling development in intact and subcortical structure lesioned rats. Indian J Exp Biol 1989;27(9):829-30.

43. Shariat S. Extraction, exploitation, recognition and evaluation the effective material of medical herbs. 2nd ed. Isfahan: Mani Publications 1992; pp: 15-40. [in Persian]

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.3.7]

44. Heidari MR, Mandegary A, Hosseini A, Vahedian M. Anticonvulsant effect of methanolic extract of Echium amoenum Fisch and C. A Mey. against seizure induced by picrotoxin in mice. Pak J Biol Sci 2006;9:772-6.

45. Gower AJ, Noyer M, Verloes R, Gobert J, Wulfert E. Ucb L059, A novel anticonvulsant drug: Pharmacological profile in animals. Euro J Pharmacol 1992;222(2-3):193-203.

46. Heidari MR, Asadipour A, Rashid- Farokhi P, Assad H, Mandegary A. Effect of Rosmarinus officinalis L. extracts on the seizure induced by picrotoxin in mice. Pakistan J Bilo Sci 2005;8:1807-11.

47. Carvalho Freits MI, Costa M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from Citrus aurantium L. Biol Pharm Bull 2002;25(12):1629-33.

48. Pultrini Ade M, Galindo LA, Costa M. Effects of the essential oil from Citrus aurantium L. in experimental anxiety models in mice. Life Sci 2006;78(15):1720-5.

49. Vale TG, Furtado EC, Santos Jr JG, Viana GS. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from Lippia alba (Mill.) n.e. Brown. Phytomedicine 2002;9(8):709-14.

50. Pereira EC, Lucetti DL, Barbosa Filho JM. Coumarin effects on amino acid levels in mice prefrontal cortex and hippocampus. Neurosci Lett 2009;454(2):139-42.

51. Re L, Barocci S, Sonnino S, et al. Linalool modifies the nicotinic receptor–ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. Pharmacol Res 2000; 42:177-81.

52. Silva Brum LF, Emanuelli T, Souza DO, et. al. Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. Neurochem Res. 2001; 26:191–194.

53. Deckers CLP, Genton P, Sills GJ, Schmidt D. Current limitations of antiepileptic drug therapy: a conference review. Epilepsy Res 2003;53(1-2):1-17.

54. Mahmoudi M, Shamsi Meymandi M, Foroumadi AR, Raftari SH, Asadi Shekari M. Antidepressant effect of sour orange flowers extract on lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors in rat. J Kerman Univ Med Sci 2005;12(4): 244-51. [in Persian]

55. Johston GAR. $GABA_A$ receptor channel pharmacology. Curr Pharam Des 2005;11:1867-85.

56. Marder M, Estiú G, Bruno Blanch L, et al. Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of Flavone derivatives with the benzodiazepine binding site of the $GABA_A$ receptor complex. Bioorg Med Chem 2001;9(2):323-35.

57. Campbell EL, Chebib M, Johnston GA. The dietary flavonoids apigenin and (−)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant $GABA_A$ receptors. Biochem Pharmacol 2004;68(8):1631-8.

58. Goutman JD, Waxemberg MD, Doñate-Oliver F, Pomata PE, Calvo DJ. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by $GABA_A$ and $GABA_C$ receptors. Eur J Pharmacol 2003;461(2-3):79-87.

59. Hall BJ, Chebib M, Hanrahan JR, Johnston GA. 6-Methylflavanone, a more efficacious positive allosteric modulator of gammaaminobutyric acid (GABA) action at human recombinant α2β2γ2L than at α1β2γ2L and α1β2 GABAA receptors expressed in Xenopus oocytes. Eur J Pharmacol 2005;512(2-3):97-104.

60. Fisher A, Walker MC, Bowery NG. Mechanism of action of anti-epileptic drugs. In: Sander JW, Walker MC, and Smalls JE, eds. Epilepsy 2003: From synapse to society. A practical guide to epilepsy. Crowborough: Meritus Communications 2003; pp:249-72.

61. Huang X, Liu T, Gu J, et al. 3D-QSAR Model of flavonoids binding at benzodiazepine site in GABAA receptors. J Med Chem 2001;44(12):1883-91.

62. Shen DW, Higgs MH, Salvay D, Olney JW, Lukasiewicz PD, Romano C. Morphological and electrophysiological evidence for an ionotropic GABA receptor of novel pharmacology. J Neurophysiol 2002;87(1): 250-6.

63. Hanrahan JR, Chebib M, Davucheron NLM, et al. Semisynthetic preparation of amentoflavone: a negative modulator at $GABA_A$ receptors. Bioorg Med Chem Lett 2003;13(14):2281-4.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.3.7]

64. Karimidokht Shahbabaki A, Oryan SH, Parivar K. Anticonvulsant activity of ethanolic extract and aqueous fraction of launaea acanthodes gum in comparison with diazepam in mice. J Qazvin Univ Med Sci 2009;13(1):14-20. [in Persian]

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.3.7]