Research Paper

The effect of aerial parts hydro-alcoholic extract of *Lavandula dentata* in the kainic acid rat model of temporal lobe epilepsy

Ladan Sedighnejad[1], Batool Rahmati[1,2*], Mehrdad Roghani[1,2], Shekoofe Azimi[1]

1. Department of Physiology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
2. Neurophysiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

*** Corresponding author e-mail: batrahmati@yahoo.com**

Citation: Sedighnejad L, Rahmati B, Roghani M, Azimi Sh. The effect of aerial parts hydro-alcoholic extract of Lavandula dentata in the kainic acid rat model of temporal lobe epilepsy. Daneshvar Medicine 2020; 28(2):28-39.

Abstract

Background and Objective: Temporal lobe epilepsy (TLE) is a widespread antiepileptic drug-refractory focal epilepsy. There is no report about antiepileptic effects of *Lavandula dentata* on kainic acid induced status epilepticus (SE) while it is used as *Ustukhuddoos*. This study evaluated the behavioral and biochemical effects of *Lavandula dentata* extract in intrahippocampal kainate-induced model of TLE.

Materials and Methods: 75 male wistar rats weighing 200-250 gr was divided into 5 groups including: 1. Sham 2. Extract pretreated sham 3. Kainic acid (1µg/rat) 4. Extract single dose (200 mg/kg one hour before surgery) pretreated kainic acid 5. Extract repeated (200 mg/kg every other day for 2 weeks) pretreated kainic acid. Extract injections were i.p at a volume of 0.3 ml.

Results: Chronic extract pretreatment reduced SE latency, enhanced total duration and occurrence of SE ($p < 0.05$) but also reduced mortality rate. The kainate group significantly elevated malondialdehyde (MDA) ($p < 0.05$), while single and repeated extract pretreatment decreased it ($p < 0.05$). Hippocampal glutathione (GSH) did not change in all groups 24 hours after kainate injection.

Conclusion: In spite of SE parameters intensification by chronic extract pretreatment, it seems that extract could reduce mortality rate through MDA reduction.

Keywords: Lavandula dentata, Kainic acid, Temporal lobe epilepsy, Rat, Oxidative stress

Received: 5 Mar 2020
Last revised: 10 June 2020
Accepted: 21 June 2020

مقاله پژوهشی

اثرات عصاره آبی الکلی بخش های هوایی لاوندولا دنتاتا بر صرع لوب گیجگاهی ناشی از تزریق اسیدکاینیک در موش بزرگ آزمایشگاهی

نویسندگان: لادن صدیق نژاد[۱]، بتول رحمتی[۲،۱]*، مهرداد روغنی[۲،۱]، شکوفه عظیمی[۱]

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: بتول رحمتی **Email: batrahmati@yahoo.com**

دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۵

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۹/۰۳/۲۱

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۱

چکیده

مقدمه و هدف: صرع لوب گیجگاهی صرع کانونی مقاوم به طیف وسیعی از داروهای ضد صرعی است. هیچ گزارشی در مورد اثرات ضد صرعی اسطوخودوس (lavandula dentata) بر تشنجات (Status Epilepticus) ناشی از اسیدکاینیک وجود ندارد در حالی که تحت عنوان اسطوخودوس استفاده می شود. از این رو این مطالعه اثرات رفتاری و بیوشیمیایی عصاره اسطوخودوس را بر صرع لوب گیجگاهی ناشی از تجویز داخل هیپوکمپی اسیدکاینیک بررسی کرده است.

مواد و روش ها: ۷۵ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار، محدوده وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم به پنج گروه شامل: ۱- شم ۲- شم پیش درمان شده با عصاره ۳- صرعی شده با اسیدکاینیک ٤- 1 µg/rat صرعی پیش درمان شده با تک دوز عصاره اسطوخودوس (۲۰۰ mg/kg یک ساعت قبل از جراحی) ٥- صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره اسطوخودوس (تزریق یک روز در میان به مدت ۲ هفته۲۰۰ mg/kg) تقسیم شدند. تمامی تزریقات عصاره به صورت داخل صفاقی، در حجم ۰/۳ ml بود.

نتایج: پیش درمانی کرونیک عصاره ضمن کاهش زمان بروز SE، طول مدت و دفعات وقوع آن را افزایش داد ($p<0.05$)، لیکن میزان مرگ و میر را تقلیل بخشید. گروه کاینات به طور معنی داری مالون دی آلدهید را افزایش داد ($p<0.05$)، در حالیکه پیش درمان تک و تکراری عصاره، آن را کاهش داد ($p<0.05$). گلوتاتیون هیپوکمپی در همه گروه‌ها ٢٤ ساعت پس از تزریق کاینات تغییر نکرد.

نتیجه‌گیری: علیرغم تشدید پارامترهای SE توسط پیش درمان مکرر با عصاره، احتمالاً عصاره توانست از طریق کاهش MDA، میزان مرگ و میر را کاهش دهد.

واژه های کلیدی: اسطوخودوس، اسیدکاینیک، صرع لوب گیجگاهی، موش بزرگ آزمایشگاهی، استرس اکسیداتیو

مقدمه

صرع بعد از سکته مغزی یکی از شایع ترین بیماری های نورودژنراتیو است. این بیماری بیش از ۵۰ میلیون نفر را در جهان درگیر ساخته است (۱). از این تعداد ٤٠ درصد دچار صرع پیچیده پارشیال به ویژه صرع لوب گیجگاهی هستند (۲،۳). صرع لوب گیجگاهی (TLE) شایع ترین صرع کانونی در بالغین است که براثر پیدایش کانون های تخلیه مکرر در هیپوکامپ و یا آمیگدال رخ می دهد و تشنج در آن با از بین رفتن هوشیاری همراه است (٤). اصطلاح حملات صرعی شکل (SE) زمانی به کار می‌رود که بیماری که دچار حملات صرعی شده است، در بین حملات هوشیاری خود را به دست نیاورد و یا حملات او بیش از ۳۰ دقیقه طول بکشد و در حیوانات تشنجات تکراری، پشت سر هم و طولانی مدت هر مرحله به مدت پنج دقیقه رخ دهد. SE موجب تشنجات راجعه و در واقع صرع خود به خودی می‌شود (۵)، به این دلیل مدل بسیار مناسبی برای مطالعات صرع است. مدل صرع القا شده با اسیدکاینیک در موش صحرایی دارای شباهت‌های بالینی بسیاری با صرع لوب گیجگاهی در انسان است (٦،۷). اسیدکاینیک، آنالوگ گیرنده های گلوتامات در گروه نوروتوکسین ها است که تزریق سیستمیک یا داخل مغزی آن از طریق تحریک گیرنده های خاص گلوتاماتی، موجب القای تشنج و آسیب نورونی می‌گردد (۹،۸). فعال شدن گیرنده های اسیدکاینیک منجر به فرایندهای داخل سلولی شامل: تشکیل رادیکال های آزاد، اختلال در عمل میتوکندری و واکنش های التهابی، بیان سیتوکین‌ها و استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۰،۱۱).

تشنج‌ها در حداقل ۳۰٪ از بیماران صرعی هنوز کنترل نشده است و میلیون‌ها نفر در سراسر جهان نیاز به داروهای موثرتری برای درمان دارند (۱۲). داروهای رایج مورد استفاده در درمان صرع اثرات ناخواسته متعددی دارد. از این رو تحقیق و دستیابی به داروهای جدید با عوارض جانبی کمتر با توجه به طولانی بودن مدت درمان صرع یک نیاز مبرم است. به همین دلیل امروزه استفاده از گیاهان دارویی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. اثربخشی گیاهان متعددی در درمان صرع توسط محققین به اثبات رسیده است (۱۳). در طب سنتی ایران به اثرات مفید بعضی از گیاهان دارویی از جمله اسطوخودوس در درمان بعضی از بیماری های اعصاب از جمله صرع اشاره شده است. لازم به توضیح است که در ایران چندین گونه از خانواده نعنائیان از جمله لاوندولا افیسینالیس، لاوندولا استوکاس، لاوندولا دنتاتا و نپتا منتوئیدس به عنوان اسطوخودوس شناخته می شوند و در عطاری ها با این نام فروخته می شوند. مطالعات نشان داده است که نپتامنتوئیدس یا اسطوخودوس ایرانی اثرات تشنجات ناشی از پنتیلن تترازول و ماکزیمال الکتروشوک را تشدید کرده است (١٤). از طرف دیگر مدارکی مبنی بر اثرات ضد تشنجی لاوندولا افیسینالیس و استوکاس وجود دارد (١٥،١٦). تاکنون مطالعه‌ای درباره اثرات لاوندولا دنتاتا بر تشنجات ناشی از صرع وجود ندارد در حالیکه تحت عنوان اسطوخودوس مصرف می‌شود؛ بنابراین، مطالعه اثرات لاوندولا دنتاتا بر تشنجات صرعی ضروری است.

با توجه به شباهت بالای مدل صرع القا شده توسط تزریق داخل مغزی اسید کاینیک با روند پاتوژنیک صرع لوب گیجگاهی در انسان و اهمیت بالینی این نوع صرع (۱۷) در این تحقیق بر آن شدیم تا اثرات عصاره آبی الکلی لاوندولا دنتاتا را بر صرع لوب گیجگاهی (در مدل صرعی اسیدکاینیک) مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها

حیوانات مورد آزمایش: موش های بزرگ آزمایشگاهی نر با محدوده وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم از مرکز علوم حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهیه شدند و در حیوان خانه دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تحت چرخه نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و رطوبت ۳۰ تا٤٠٪ و با درجه حرارت $21 \pm 2\ C^{\circ}$ نگهداری می شوند. (در هر قفس حداکثر ۵ موش) موش ها آزادانه

به آب و غذا دسترسی داشتند.۲۰ دقیقه پیش از شروع آزمایش حیوان ها به آزمایشگاه منتقل شدند تا با محیط سازش نمایند. حیوانات به طور تصادفی به پنج گروه ۱۵ تایی شامل: ۱- گروه شم: در روز جراحی به جای تزریق داخل مغزی اسیدکاینیک، نرمال سالین ۰/۹ درصد (1 µg/rat) را به صورت تزریق داخل مغزی دریافت کردند و از دو هفته قبل از جراحی نرمال سالین داخل صفاقی به طور یک روز در میان دریافت کردند.

(لازم به ذکر است تمامی تزریق های داخل صفاقی با حجم ۰/۳ ml تزریق شده است.)

۲- گروه شم عصاره: در روز جراحی به جای تزریق داخل مغزی اسیدکاینیک، نرمال سالین ۰/۹ درصد (1 µg/rat) را به صورت تزریق داخل مغزی دریافت کردند و از دو هفته قبل از جراحی عصاره اسطوخودوس داخل صفاقی به طور یک روز در میان با دوز 200 mg/Kg دریافت کردند. ۳- گروه صرعی: در روز جراحی تزریق داخل مغزی اسیدکاینیک (1 µg/rat) را به صورت داخل مغزی دریافت کردند و از دو هفته قبل از جراحی نرمال سالین داخل صفاقی به طور یک روز در میان با حجم ۰/۳ml دریافت کردند. ٤- گروه صرعی پیش درمان شده با تک دوز عصاره اسطوخودوس: در روز جراحی تزریق داخل مغزی اسیدکاینیک (1 µg/rat) را دریافت کردند و یک ساعت قبل از جراحی عصاره اسطوخودوس را با دوز 200 mg/Kg دریافت نمودند. ۵- گروه صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره اسطوخودوس: در روز جراحی تزریق داخل مغزی اسیدکاینیک (1 µg/rat) را دریافت کردند و از دو هفته قبل از جراحی عصاره اسطوخودوس داخل صفاقی به طور یک روز در میان با دوز 200 mg/Kg دریافت کردند.

روش تهیه عصاره

بعد از آسیاب کردن ۱ کیلوگرم گیاه اسطوخودوس (تهیه شده در فروشگاه محلی در تهران و در تأیید آزمایشگاه تخصصی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران voucher number:PMP-347) حدود ۲ لیتر محلول شامل ۵۲۰ سی سی آب مقطر و ۱٤۰۰ سی سی الکل (اتانول ۷۰٪) اضافه کردیم و سپس ٤۸ ساعت در محیط تاریک قرار گرفت سپس با جدا کردن تفاله ها از محلول باقی مانده، محلول به دفعات صاف شده، در بن ماری در درجه حرارت ٤۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به این ترتیب عصاره آبی-الکلی گیاه با یک قوام عسلی شکل به دست آمد. در مرحله بعد دوز 200 mg/Kg با استفاده از نرمال سالین برای مطالعه تهیه شد.

روش ایجاد صرع لوب گیجگاهی

این نوع صرع توسط اسیدکاینیک (ساخت کمپانی سیگما) با دوز 1 µg/rat و تزریق داخل مغزی ناحیه CA3 هیپوکامپ از طریق جراحی استریوتاکس ایجاد شد. پس از تزریق اسیدکاینیک حیوانات مورد مشاهده قرار می گرفتند تا بروز حمله مداوم صرعی شکل (SE) در آن‌ها تشخیص داده شود. طوریکه حیوانات پس از تجویز اسید کاینیک به داخل محفظه های پلاکسی گلاس منتقل شده و حرکات و رفتارهای آن ها به مدت ٤ ساعت توسط دوربین های دیجیتال ثبت شدند. یکی از علائم رفتاری مشخصه تشنجات موضعی با منشأ لوب گیجگاهی اتوماتیسم یا انجام حرکات غیر رفلکسی و غیرارادی است (۱۷) که به عنوان مرحله دوم طبقه بندی رفتارهای تشنجی شناخته می‌شود (۱۸). بر اساس این طبقه بندی رفتارهای صرعی به مراحل زیر تقسیم می شوند: ۱-خیره شدن و انقباضات دهانی ۲-اتوماتیسم ۳-کلونوس یکطرفه اندام جلویی ٤-کلونوس دوطرفه اندام جلویی ۵-کلونوس دوطرفه اندام جلویی همراه با افتادن ٦-تشنجات تونیک و کلونیک. مراحل ۱ تا ۳ جزء تشنجات موضعی و مراحل ٤ تا ٦ مربوط به تشنجات جنرالیزه است و در پژوهش حاضر تشنجات مرحله ۵ و ٦ مورد مطالعه و محاسبه قرار گرفت.۲٤ ساعت پس از تجویز کاینیک اسید و بررسی رفتار تشنجی، موش ها بی‌هوش و مغز آن ها جهت تهیه هموژنایز مغزی خارج و در فریزر به طور موقت فریز گردید.

آزمایشات بیوشیمیایی

سنجش مالون دی آلدئید: اندازه گیری سطح مالون دی آلدئید بر اساس روشی است که اساس آن واکنش تیوباربیتوریک اسید (TBA) است. در این روش مالون دی آلدئید یا مواد شبه مالون دی آلدئید باتیوباربیتوریک اسید واکنش داده و رنگ صورتی ایجاد می‌کنند که ماکزیمم جذب نوری آن ها، در طول موج ۵۳۲ نانومتر است. این واکنش در pH=2-3 و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد. بعد از سرد کردن نمونه جذب نوری خوانده شد. ابتدا هر مغز توسط هموژنایزر هموژنایز و سپس سانتریفیوژ شد. ۱۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت نمونه های سانتریفیوژ شده به ۱/۵ میلی‌لیتر تری کلرواسیداستیک و ۱/۵ میلی‌لیتر از TBA اضافه شد. تمامی نمونه ها و لوله های استاندارد با رقت های مختلف به مدت ۹۰ دقیقه در بن ماری آب جوش قرار داده شدند تا واکنش صورت گیرد سپس محلول ها در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و جذب نوری آن ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. سپس جذب های نوری به دست آمده برای محاسبه غلظت نهایی MDA با منحنی استاندارد مربوطه تطبیق داده شد تا میزان مالون دی آلدئید بر حسب میکروگرم در گرم پروتئین بافت مغزی به دست آید.

سنجش غلظت گلوتاتیون: جهت سنجش میزان گلوتاتیون واحد حجم هموژنه بافتی مغز، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه (بافت هموژنه) همراه با ۳۰۰ میکرولیتر بافر تریس که حاوی EDTA 2/0 مولار (ماده ضد انعقاد) است در لوله های فالکون ریخته و سپس ۲۰ میکرولیتر (۲،۲ dithio-bis-nitrobenzoic acid DTNB) () به غلظت ۰۱/۰ مولار به آن ها اضافه و نهایتاً حجم کلی محلول با اضافه کردن میزان مناسب از متانول خالص به ۲ میلی‌لیتر رسید. فرآیند انکوباسیون لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام و هر ۵ دقیقه یکبار تکان داده شد. سپس در دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. ۱۰۰ میکرولیتر از مایع شفاف در قسمت فوقانی لوله ها با استفاده از سمپلر به میکروپلیت منتقل و جذب نوری آن ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ٤١٢ نانومتر قرائت گردید. محاسبه غلظت نهایی این جذب های نوری از طریق مطابقت آنان با منحنی استاندارد مربوطه صورت گرفت.

روش های آماری

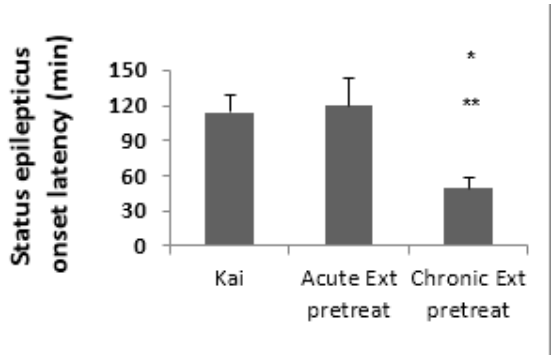
در این مطالعه نتایج به دست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. پس از مشخص کردن توزیع داده ها، برای آنالیز داده های مربوط به مشاهدات رفتاری و کمیت رفتار تشنجی، از آزمون آنووای یک طرفه و تست تعقیبی توکی استفاده شد. در مورد نتایج بیوشیمیایی نیز در صورت توزیع نرمال داده ها از آنووای یکطرفه و تست‌های مربوطه مثل Holm-Sidak و در صورت غیر نرمال بودن داده ها از کروسکال والیس و تست‌های مربوطه مثل Dunn استفاده شد.

جهت رسم کلیه نمودارها از نرم افزار اکسل ۲۰۱٦ وجهت آنالیز آماری از نرم افزار سیگما استات ۳،۵ بهره گیری شد. در مورد کلیه یافته ها، اختلاف در سطح p <۰/۰۵ به عنوان پاسخ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر عصاره آبی الکلی لوندولا دنتاتا بر فاکتورهای رفتار تشنجی

تأخیر SE: همانطور که در نمودار ۱ ملاحظه می‌گردد میزان تأخیر بروز SE ناشی از تزریق اسید کاینیک در گروه صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره کمترین میزان را به خود اختصاص داد. درواقع می توان اظهار نمود گروه صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره نیز زودتر از سایر گروه ها SE را آغاز کردند که این کاهش، تفاوت معنی داری (٤٩/٢٢±٩/٢٠) را با گروه های صرعی (١١٤/٢٨±١٤/٢٨) و صرعی پیش درمان شده با تک دوز عصاره (١٢٠±٢٤/٠٤) ایجاد کرد.(p<0.05)



نمودار ۱. اثر عصاره آبی–الکلی اسطوخودوس (دوز ۲۰۰ mg/kg) بر میزان تأخیر بروز تشنج ۹-۷: n (p<0.05)

Kai: گروه صرعی شده با کاینیک اسید

Acute Ext pretreat: گروه صرعی پیش درمان با تک دوز عصاره

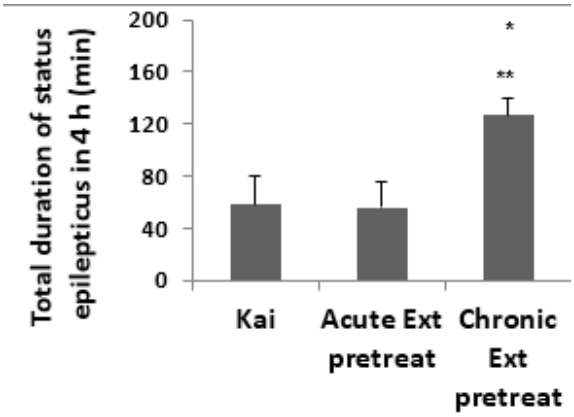
Chronic Ext pretreat: گروه صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره

* اختلاف معنادار در مقایسه با کاینیک اسید

** اختلاف معنادار در مقایسه با صرعی پیش درمان تک دوز

طول مدت SE:

همانطور که در نمودار ۲ ملاحظه می گردد میانگین طول مدت رفتار SE ناشی از تزریق کاینیک اسید، در گروه صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره (۱۲۶/۷۷±۱۲/٤٥) افزایش معناداری در مقایسه با گروه های صرعی پیش درمان شده با تک دوز عصاره (٥٦/۲±۱۹/٥۷) و صرعی (٥۸/۱۱±۲۲/۲۷) ایجاد کرد؛ به عبارت دیگر گروه صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره در مقایسه با دو گروه دیگر نه تنها نتوانست از طول مدت SE بکاهد بلکه حتی به طور معناداری مدت زمان بیشتری از SE را بروز داد.(p<0.05)



نمودار ۲: اثر عصاره آبی–الکلی اسطوخودوس (دوز ۲۰۰ mg/kg) بر میزان تأخیر بروز تشنج ۱۰-۹: n (p<0.05)

Kai: گروه صرعی شده با کاینیک اسید

Acute Ext pretreat : گروه صرعی پیش درمان با تک دوز عصاره

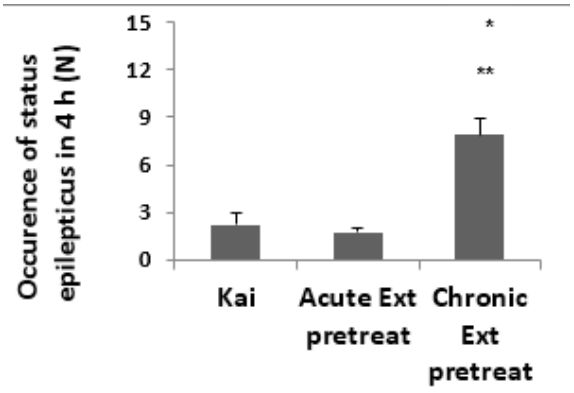
Chronic Ext pretreat : گروه صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره

* اختلاف معنادار در مقایسه با کاینیک اسید

** اختلاف معنادار در مقایسه با صرعی پیش درمان تک دوز

تعداد SE:

همانطور که در نمودار ۳ ملاحظه می گردد تعداد دفعات بروز SE در گروه صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره افزایش معنی داری (۷/۸۹±۱/۰۳) در مقایسه با گروه صرعی (۲/۲۲±۰/۷٦) و صرعی پیش درمان شده با تک دوز عصاره (۱/۷±۰/۳۳) ایجاد کرد.



نمودار۳: اثر عصاره آبی–الکلی اسطوخودوس (دوز ۲۰۰ mg/kg) بر میزان تأخیر بروز تشنج ۱۰-۹: n (p<0.05)

Kai: گروه صرعی شده با کاینیک اسید

Acute Ext pretreat : گروه صرعی پیش درمان با تک دوز عصاره

Chronic Ext pretreat: گروه صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره

* اختلاف معنادار در مقایسه با کاینیک اسید

** اختلاف معنادار در مقایسه با صرعی پیش درمان تک دوز

میزان مرگ و میر

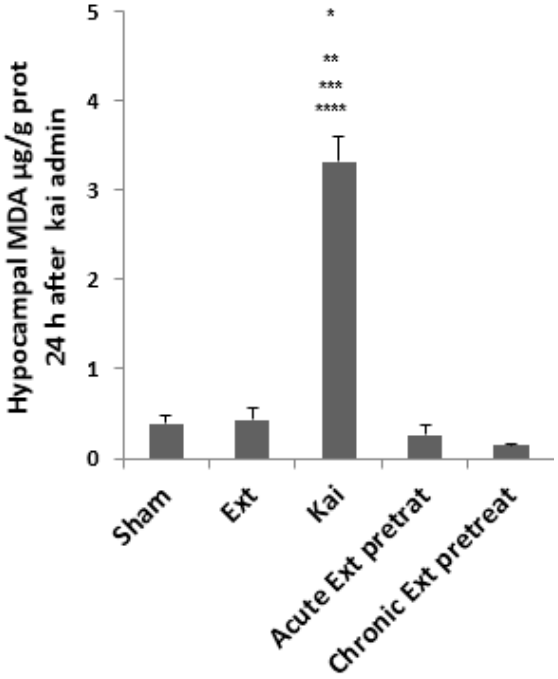
درصد مرگ و میر در گروه صرعی از ۳٦/۳٦ به ۱۸/۱۸ در گروه پیش درمانی تک دوز و ۱٦/٦۷ در گروه پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره تقلیل یافت؛ به عبارت دیگر درصد مرگ و میر در گروه صرعی پیش درمان شده با تک دوز عصاره به میزان ٥۰ درصد در مقایسه با گروه صرعی

تقلیل یافت و همچنین میزان مرگ و میر گروه صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره ٥٤ درصد در مقایسه با گروه صرعی کاهش یافت.

اثر عصاره آبی الکلی لوندولا دنتاتا بر فاکتورهای بیوشیمیایی

میزان MDA هیپوکامپ در ٢٤ ساعت پس از صرعی شدن:

همانطور که در نمودار ٤ نیز ملاحظه می گردد میزان MDA در گروه صرعی، در زمان ٢٤ ساعت پس از تجویز اسیدکاینیک، افزایش معناداری (٠/٢٧±٣/٣١) در مقایسه با تمامی گروه های شم (٠/١٠±٠/٣٩)، شم عصاره (٠/١٤±٠/٤٣)، صرعی پیش درمان شده با تک دوز عصاره (٠/١٠±٠/٢٦) و صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره (٠/٠٢±٠/١٥) ایجاد کرد ($p<0.05$)؛ به عبارت دیگر اسیدکاینیک میزان MDA را افزایش داد و پیش درمان با عصاره چه به صورت حاد و چه به صورت تکراری میزان MDA افزایش یافته توسط اسیدکاینیک را به طور معنی داری کاهش داد ($p<0.05$).



نمودار ٤. بررسی تغییرات میزان مالون دی آلدئید ٢٤ ساعت بعد از تزریق کاینیک اسید ٢-٤ =n (p<0.05) *

Ext: شم عصاره

Kai: گروه صرعی شده با کاینیک اسید

Acute Ext pretreat : گروه صرعی پیش درمان با تک دوز عصار

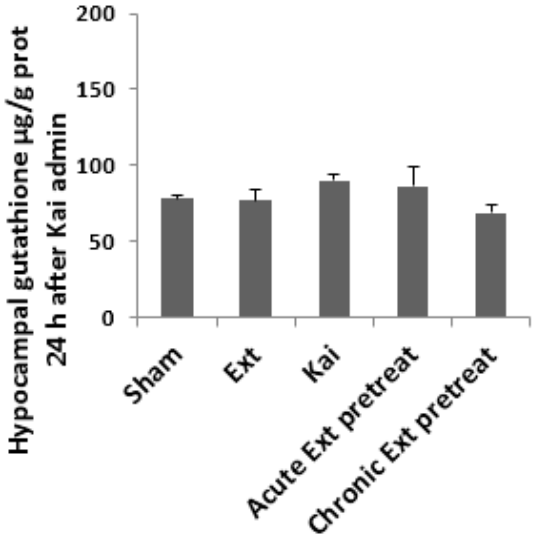
Chronic Ext pretreat: گروه صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره

* اختلاف معنادار در مقایسه با شم **اختلاف معنادار در مقایسه با شم عصاره

*** اختلاف معنادار در مقایسه با صرعی پیش درمان تک دوز عصاره

**** اختلاف معنادار در مقایسه با صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره

میزان گلوتاتیون هیپوکامپ در ٢٤ ساعت پس از صرعی شدن: مطابق نمودار ٥ ملاحظه می گردد میزان گلوتاتیون در تمامی گروه ها ٢٤ ساعت بعد از تزریق اسیدکاینیک، تغییر معناداری نشان نداد.



نمودار٥. بررسی تغییرات میزان گلوتاتیون در گروه های مختلف در ٢٤ ساعت بعد از جراحی ٣-٢= n

Ext: شم عصاره

Kai: گروه صرعی شده با کاینیک اسید

Acute Ext pretreat : گروه صرعی پیش درمان با تک دوز عصار

Chronic Ext pretreat: گروه صرعی پیش درمان شده با دوزهای مکرر عصاره

بحث و نتیجه گیری

تحلیل نتایج پارامترهای رفتار تشنجی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که دوز 200mg/kg عصاره آبی–الکلی گیاه اسطوخودوس (لوندولا دنتاتا) به صورت پیش درمان با دوزهای مکرر

عصاره سبب کاهش میزان تأخیر در زمان بروز تشنجات القایی ناشی از کاینیک اسید گردید. بدین معنا که موش ها سریع تر تشنجات SE خود را آغاز کردند و این کاهش تأخیر تفاوت معناداری را با سایر گروه ها نیز نشان داد ($p<0.05$)؛ بنابراین نتایج نشان می‌دهد عصاره نه تنها نتوانست موجب ممانعت از شروع زود به هنگام SE شود بلکه در گروه پیش درمانی طولانی مدت حتی موجب کاهش تأخیر بروز SE گردید و پیش درمانی تک دوز با عصاره در زمان بروز SE تفاوت معنادار در مقایسه با گروه صرعی نداشت. همچنین پیش درمانی کردن طولانی با عصاره موجب افزایش معنادار طول مدت SE نسبت به گروه صرعی گردید. علاوه بر این نتایج نشان داد، تعداد دفعات تشنجات در گروه صرعی پیش درمان طولانی مدت با عصاره نیز بیشترین میزان را به خود اختصاص داده و این افزایش، تفاوت معناداری را با گروه های صرعی و صرعی تحت پیش درمان تک دوز ایجاد کرد ($p<0.05$). همچنین پیش درمانی تک دوز با عصاره در طول مدت و تعداد دفعات SE در مقایسه با گروه صرعی تفاوتی نداشت؛ اما این در حالی است که میزان مرگ و میر با تجویز دوز 200 mg/Kg عصاره آبی – الکلی بخش های هوایی لاوندولا دنتاتا تقلیل یافته و درصد مرگ و میر گروه صرعی پیش درمان تک دوز با عصاره و گروه صرعی پیش درمان دوزهای مکرر، در مقایسه با گروه صرعی به ترتیب کاهش ۵۰ و ٥٤ درصدی داشته است. با توجه به نتایج به دست آمده نیز می‌توان به وضوح دید علی رغم این که عصاره اسطوخودوس نتوانست طول مدت رفتار تشنجی و زمان آغاز بروز تشنجات و تعداد دفعات تشنجی تأثیر مطلوب بگذارد، اما توانست میزان مرگ و میر را نسبت به گروه صرعی کاهش دهد که این شاخص، نتیجه مطلوب و قابل توجهی از اثر این گیاه بر صرع لوب گیجگاهی در مدل کاینیک اسید را نشان می‌دهد.

همچنین طبق مطالعاتی که مهربانی و همکاران در سال ۱۳۸۵ در خصوص اثر ضد تشنج دو گیاه اسطوخودوس (lavandula vera) و افتیمون بر تشنج ناشی از پنتیلن تترازول انجام دادند نشان داده شد، پیش درمانی با دوزهای مختلف عصاره آبی _متانولی Lavandula.vera باعث کاهش میزان مرگ و میر به طور معناداری گردید ($p<0/01$) که با پژوهش ما همخوانی دارد (۱۹).

گرچه مطالعات زیادی در رابطه با اثر ضد تشنجی گیاه اسطوخودوس در انواعی از مدلهای صرع وجود دارد، اما در رابطه با اثرات ضد تشنجی لاوندولا دنتاتا در صرع ناشی از اسید کاینیک مطالعه‌ای وجود ندارد. لذا این پژوهش نوآوری به همراه دارد.

تحلیل نتایج فاکتورهای بیوشیمیایی

۲-۱- مالون دی آلدئید هیپوکامپ موش ها:

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که موش های پیش درمان شده، از افزایش میزان MDA چه در گروه پیش درمان تک دوز و چه در پیش درمان طولانی مدت، در مقایسه با گروه صرعی جلوگیری به عمل آورده اند و میزان MDA گروه صرعی، در ٢٤ ساعت بعد از تزریق کاینیک اسید، در مقایسه با تمامی گروه ها افزایش معنی داری داشته است ($p<0/05$). لازم به ذکر است عصاره اسطوخودوس در گروه های پیش درمانی تک دوز و طولانی مدت توانست میزان MDA را تقریباً در حد گروه شم و شم عصاره پایین نگه دارد. با وجودیکه عصاره لاوندولا دنتاتا در کاهش میزان MDA بسیار مطلوب عمل کرده اما موفق به مهار تشنجات و تأخیر در آغاز تشنجات ناشی از القای صرع مدل کاینیک اسید نشده است.

لیپیدها یکی از اجزای مهم غشا سلول ها می باشند. پراکسیداسیون لیپیدها در شرایط پاتولوژی مانند بیماری های مختلف از قبیل بیماری های قلبی، تنفسی، مغزی و... نقش دارد. یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدی مالون دی آلدئید میباشد که به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو مدنظر قرار می گیرد. پراکسیداسیون لیپیدی باعث ایجاد رادیکال های آزاد می گردد. مالون دی آلدئید یک ملکول سمی بوده و شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است که توسط رادیکال های آزاد تولید می‌شود (۲۰).

در جریان صرع، برخی شاخص های استرس اکسیداتیو نظیر مالون دی آلدئید در بافت مغز افزایش می یابند (۲۰). همچنین مطالعات نشان داده اند، مواد با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، قادر به اعمال اثرات ضد صرعی و ضد تشنجی در بدن می باشند (۲۱،۲۲). آنتی اکسیدان ها قادرند از طریق افزایش پایداری غشاهای سلولی موجب افزایش مقاومت نورون ها در برابر آسیب اکسیداتیو گردند و از طرفی ظرفیت آنتی اکسیدانی مغز را در برابر آسیب اکسیداتیو افزایش دهند (۲۳). فعال شدن گیرنده های اینوتروپیکی گلوتامات به وسیله اسیدکاینک موجب افزایش کلسیم داخل سلولی و دپلاریزاسیون پتانسیل غشا میتوکندری نورون ها در بسیاری از مناطق هیپوکامپ می‌شود. این اثرات موجب اختلال در مصرف اکسیژن، تولید بیش از حد نیتریک اکساید وپراکسی نیتریت و درنتیجه آسیب دیدن اجزا سازنده ازجمله لیپیدها، پروتئین ها و غیره می‌شود (۲٤).

. تاکنون مطالعه ای در مورد اثر ضد صرعی لوندولا دنتاتا انجام نشده است اما تحقیقات در مورد اسطوخودوس های مشابه انجام شده است. به عنوان نمونه Sebai و همکاران در مطالعه خود اثر آنتی اکسیدانی لوندولا استوکاس را بررسی کرده و نشان دادند که لوندولا استوکاس موجب کاهش MDA و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها در موش هایی شده که دیابت در آن ها از طریق آلوکسان القا شده (۲۵) گردیده است. همچنین در مطالعه ای دیگر که سجادی و همکاران تحت عنوان اثرات آنتی اکسیدانی چند گیاه دارویی انجام دادند، نشان دادند که عصاره Lavandula angustifolia موجب کاهش اکسیداسیون سلول های کبدی موش شده و سطح MDA را کاهش داده است (۲٦). از آنجایی که استرس اکسیداتیو منتج از تزریق اسیدکاینیک می‌تواند منجر به اختلالات ناشی از تشنج و بروز رفتار تشنجی گردد، لذا به نظر می رسد استفاده از آنتی اکسیدان ها بتواند از آسیب و مرگ نورونی جلوگیری کند؛ اما مطالعات نشان می‌دهند لزوماً آنتی اکسیدان ها مانع تشنج و رفتار تشنجی نمی شوند (۲۷). مطالعات نشان داده است که تمامی آنتی اکسیدان ها و جاروبگرهای رادیکال آزاد در تمامی مدل های تشنج بروز تشنج را به تأخیر نمی‌اندازند. بعضی از آنتی اکسیدان ها فعالیت ضد تشنجی مشخص علیه صرع های القایی با کاینیک اسید یا پنتیلن تترازول را ندارند (۲۷). از این رو می توان پیشنهاد کر د که ترکیبات با خاصیت آنتی اکسیدانی لزوماً رفتارهای تشنجی را مهار نمی کنند. به طور مثال حیوانات درمان شده باترولوکس به دنبال صرع القا شده با کاینیک اسید، تشنجات شدید داشتند اما نمردند (۲۷).

گلوتاتیون هیپوکامپ موش ها

نتایج به دست آمده در خصوص شاخص آنتی اکسیدانی گلوتاتیون احیا نشان می‌دهد، میزان گلوتاتیون در ۲٤ ساعت بعد از تزریق کاینیک اسید در هیچ یک از گروه ها تفاوت معناداری باهم ایجاد نکرد.

فرم گلوتاتیون احیا (GSH) یک جاروبگر رادیکال آزاد مهم در سیستم عصبی پستانداران است و یک ضد تشنج درون زاد است. گلوتاتیون فراوان ترین ترکیب تیول دار غیرپروتئینی با جرم مولکولی پایین می باشد که نقش اصلی را در دفاع سلولی علیه استرس اکسیداتیو به عهده دارد؛ گلوتاتیون (GSH) یکی از اصلی ترین عوامل آنتی اکسیدانی محافظ در سلول هاست. مطالعات اخیر نشان داده است که اختلال در سیستم آنتی اکسیدانی، سیستم عصبی را آسیب پذیر و فرد را مستعد ابتلا به حملات صرعی می نماید. به بیان دیگر تولید رادیکال های آزاد تحریک کننده بروز حملات صرعی و حمله صرعی خود نیز قادر به ایجاد رادیکال های آزاد می باشد و بدین ترتیب به صورت بازخوردی، تحریک کننده حملات بعدی است. مطالعه Gluck و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان داد، میزان گلوتاتیون احیا (GSH) در هیپوکمپ در ۲٤ ساعت پس از تزریق کاینیک اسید، هیچ تغییری نشان نداد بلکه میزان گلوتاتیون در سربرال کورتکس افزایش یافت (۲۸). از آنجایی که پیش درمانی با عصاره اسطوخودوس، تغییری در میزان گلوتاتیون احیا و فعالیت آنتی اکسیدانی در ۲٤

ساعت پس از تزریق کاینیک اسید نسبت به گروه صرعی ایجاد نکرد اما مانع افزایش مالون دی آلدئید در هر دو گروه پیش درمان در مقایسه با گروه صرعی شد و میزان مرگ و میر را کاهش داد، احتمال می‌رود گیاه اثر حفاظتی خود را در کاهش میزان مرگ و میر از طریق ممانعت از افزایش MDA و مهار فاکتورهای استرس اکسیداتیو در مدل صرع القایی با کاینیک اسید اعمال کرده است.

نتیجه گیری

یافته های حاصل از پژوهش نشان می‌دهد که عصاره آبی- الکلی لوندولا دنتاتا در صرع لوب گیجگاهی مدل کاینیک اسید با وجودی که پارامترهای رفتار تشنجی شامل تعداد دفعات و طول مدت تشنج را افزایش و تأخیر در بروز تشنجات را نسبت به گروه کنترل کاهش داد، توانست درصد مرگ و میر را به طور قابل ملاحظه ای کاهش دهد. در بخش بیوشیمیایی لوندولا دنتاتا توانست مالون دی آلدئید را در هر دو گروه پیش درمان پس از ۲٤ ساعت از تزریق کاینیک اسید به طور معناداری در مقایسه با گروه صرعی پایین آورده و در حدود میزان گروه شم و شم عصاره پایین نگه دارد که بنظر می رسد همین اثر باعث کاهش مرگ و میر شده است.

منابع

1. Strine TW, Kobau R, Chapman DP, Thurman DJ, Price P, Balluz LS. Psychological distress, comorbidities And health behaviors among U.S. adults with seizures: results from the 2002 National Health Interview Survey. Epilepsia 2005;46(7):1133-9.
2. Shorvon SD.The epidemiology and treatment of chronic and Refractory epilepsy. Epilepsia 1996;37(2):1-3.
3. Jallon P. The problem of intractability: the continuing need for new medical therapies in epilepsy. Epilepsia 1997;38(9):37-42.
4. McHugh JC, Delanty N. Epidemiology and classification of epilepsy. International Review of Neurobiology 2008; 83: 11-26.
5. de Araujo Furtado M[1], Lumley LA, Robison C, Tong LC, Lichtenstein S, Yourick DL. Spontaneous recurrent seizures after status epilepticus induced by soman in Sprague-Dawley rats. Epilepsia 2010;51(8):1503-10.
6. Ben-Ari,Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentylentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. Neuroscience 1981;6(7):1361-91.
7. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroenc ephalographic and neuropathological study. Behavioural Brain Research 1983;9(3):315-35.
8. Jefferys JG. Advances in understanding basic mechanisms of epilepsy and seizures. Seizure 2010; 19 (10): 638-46.
9. Dichter MA. Emerging concepts in the pathogenesis of epilepsy and epileptogenesis. Archives of Neurology 2009; 66 (4): 443-7.
10. Carrasco J, Penk owa M, Hadberg H, Molinero A, Hidalgo J. Enhanced seizures and hippocampal neurodegeneration following kainic acid induced seizures in metallothionein-I + II-deficient mice.

Europe Journal Neuroscience 2000;12(7):2311-22.

11. Lehtimäki KA, Peltola J, Koskikallio E, Keränen T, Honkaniemi J. Expression of cytokines and cytokine receptors in the rat brain after kainic acid-induced seizures. Molecular Brain Research 2003;110(2):253-60.
12. Theodore WH, Fisher R. Brain stimulation for epilepsy. Acta neurochirurgica. Supplement 2007; 97(Pt 2):261-272.
13. Kim HJ, Jee EH, Ahn KS, Choi HS, Jang YP. Identification of marker compounds in herbal drugs on TLC with DART-MS. Archives of Pharmacal Research 2010; 33(9): 1355-9.
14. Heidari A, Ramati B, Khalili M, Roghani M, Zaeri F. Exacerbation of seizures caused by intravenous infusion of pentylenetetrazole by hydro-alcoholic extract of nepetamentoides in mice. Tehran. Daneshvar Medicine 2015;23(119)
15. Rahmati B, Khalili M, Roghani M, Ahghari P. Anti- convulsant effect of hydro-alcoholic extract of *Lavandula officinalis* on seizures in pentyle netetrazol -induced kindling model in male mice. Daneshvar Medicine 2012; 19(98):1-8.
16. Gilani AH, Aziz N, Khan MA. Ethnopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of Lavandula stoechas L. Journal of Ethnopharmacology 2000; 71(1): 161-7.
17. Dichter MA. Emerging concepts in the pathogenesis of epilepsy and epileptogenesis. Archives of Neurology 2009;66(4):443-447.
18. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. Methods in Enzymology 1990; 186: 1-85.
19. Mehrabani M, Modirian A, Haghir ebrahim A, Vafazade J, Shahnavaz Sh, Heidari M. The effect of lavender hydro-methanolic and eftimon on pentylenetetrazole induced seizure in mice. Journal of Kerman University of Medical Sciences 2006;14(1):25-32.
20. Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Coenzyme q10 ameliorates neurodegeneration, mossy fiber sprouting, and oxidative stress in intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy in rat. Journal of Molecular Neuroscience 2013; 49 (1): 194-201.
21. Wu Z, Xu Q, Zhang L, Kong D, Ma R, Wang L. Protective effect of resveratrol against kainate-induced temporal lobe epilepsy in rats. Neurochemical Research 2009; 34 (8): 1393-400.
22. Shi X, Yao BZ, Liu D. Lipoprotein lipase expression in the hippocampus and its effects on vitamin E levels in rats with epilepsy. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi 2010; 12 (5): 377-81.
23. Aziroglu M, Kutluhan S, Uuz AC, Celik O, Bal R, Butterworth PJ. Topiramate and vitamin e modulate the electroencephalographic records, brain microsomal and blood antioxidant redox system in pentylentetrazol-induced seizure of rats. The Journal of Membrane Biology 2009; 229 (3): 131-40.

24. Shin EJ, Ko KH, Kim WK, Chae JS, Yen TP, Kim HJ, et al. Role of glutathione peroxidase in the ontogeny of hippocampal oxidative stress and kainite seizure sensitivity in the genetically epilepsy prone-rats. Neurochemical Interview 2008;52(6):1134-47.

25. Sebai H, Selmi S, Rtibi K, Gharbi N, Sakly M. Protective effect of *Lavandula Stoechas* and *Rosmarinus Officinalis* essential oils against reproductive damage and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. Journal of Medicinal Food 2015 Feb; 18(2): 241-9.

26. Sajadi E, Naderi GA, Ziaee R. Antioxidant Effects of Some Medicinal Plants. Journal of Kermanshah University of Medical Sciences 2004; 2(8).

27. Kaiping Xu and Janet L. Stringer Baylor College of Medicine. Epilepsy Behavior 2008;13(1):77-82.

28. Gluck MR, Jayatilleke E, Shaw S, Rowan AJ, Haroutunian v. CNS oxidative stress associated with the kainic acid rodent model of experimental epilepsy. Epilepsy Research 2000;39(1):63-71.