بررسی اثرات ضدهیپوکسی و ضدایسکمی عصاره‌های آبی و الکلی ریشه گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) در موش سفید کوچک و بزرگ

حسین حسین‌زاده[1*]، علیرضا خویی[2]، محمودرضا جعفری[3]، جواد قسامی‌پور[4]

۱- دانشیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی و دانشکده داروسازی مشهد
۲- استادیار آسیب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۳- استادیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی و دانشکده داروسازی مشهد
٤- داروساز

*آدرس مکاتبه: مشهد، میدان آزادی، بلوار وکیل‌آباد، مجتمع دانشگاهی، ص.پ: ۱۳٦۵-۹۱۷۷۵
تلفن ۸٤۳۸۷۲۲-۰۵۱۱ نمابر: ۸٤۳۷۰۷۵-۰۵۱۱ پست الکترونیک: hosseinzadehh@yahoo.com

چکیده

با توجه به اثرات ضدهیپوکسی برگ و دانه گیاه نوروزک و وجود گزارش‌هایی مبنی بر اثر ریشه بعضی از گونه‌های سالویا، در این مطالعه اثرات ضدهیپوکسی و ضدایسکمی عصاره‌های آبی و الکلی ریشه گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia*) به روش ایجاد هیپوکسی در محفظه بسته و در حضور ماده جاذب CO_2 بر روی موش کوچک و ایجاد ایسکمی به روش انسداد چهار رگ در موش بزرگ توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. جهت تهیه عصاره از روش خیسانده الکلی و جوشانده آبی استفاده شد. پس از تزریق به روش داخل صفاقی، LD_{50} عصاره آبی (۱/۷۰-۱/۲۲) ۱/۴۵ g/kg و عصاره الکلی (۱/۸۷-۱/۲۸) ۱/۵۵ g/kg به دست آمد و این عصاره‌ها در محدوده مواد نسبتاً سمی قرار گرفتند.

در بررسی فیتوشیمی، دو ترکیب ساپونین و تانن به مقدار فراوان در هر دو عصاره وجود داشت. آلکالویید فقط به مقدار کمی در عصاره الکلی موجود بود و فلاونویید در هیچکدام وجود نداشت.

در این مطالعه عصاره آبی، عصاره الکلی، فنی‌توین به عنوان کنترل مثبت، نرمال سالین به عنوان کنترل منفی به ترتیب با دوزهای ۰/۹ g/kg، ۱ g/kg، ۵۰ mg/kg و ۲۰ ml/kg به روش داخل صفاقی تزریق گردیدند و زمان زنده ماندن موش‌هایی که در معرض هیپوکسی قرار می‌گرفتند به عنوان اثرات ضدهیپوکسی در نظر گرفته شدند که این زمان‌ها در عصاره آبی، الکلی، فنی‌توین و نرمال سالین به ترتیب ۳/۳ ± ۵۲/۹۱ (خطای معیار ± میانگین)، ۱/۹ ± ۵۰/۰۰، ۲/۲ ± ۵۵/۸۳ و ۱/۱ ± ۲۵/۰۰ دقیقه بود. همچنین اثرات ضدایسکمی بر اساس درصد شدت آسیب‌های ایسکمیک سلول‌های عصبی هیپوکامپ مورد مطالعه قرار گرفت که در گروه عصاره آبی با دوز ۰/۹ g/kg حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد نورون‌ها و در عصاره الکلی با دوز ۰/۹ g/kg کمتر از ۲۰ درصد نورون‌های CA1 دچار آسیب ایسکمیک شدند. نتایج این مطالعه نشان دهنده اثرات ضدهیپوکسی و ضدایسکمی قابل ملاحظه عصاره‌های الکلی و آبی ریشه گیاه نوروزک بوده و از آنجایی که در ریشه این گیاه ساپونین و تانن وجود داشت احتمالاً اثرات محافظتی نورون‌ها در اثر این دو ترکیب بوده است.

گل واژگان: نوروزک، هیپوکسی، ایسکمی، هیپوکامپ

مقدمه

تیره نعناع حاوی بیش از ٤٠٠٠ گونه می باشد که تعداد زیادی از آنها دارای اثرات مفید بوده و در درمان بیماری‌ها کاربرد دارند. نوروزک با نام علمی *Salvia leriifolia* گیاهی است پایا از خانواده نعناعیان که بومی مناطقی از جنوب خراسان و قسمتی از افغانستان می‌باشد. اثرات مختلف فارماکولوژیکی دانه و یا برگ این گیاه از جمله ضدتشنج [٦]، ضددرد و ضدالتهاب [١ و ١١]، ضدهیپرگلیسمی [٤ و٨]، ضدزخم معده [٧]، اثر بر روی سندرم محرومیت مرفین [٩] و اثرات ضدمیکروبی [٢] بر روی موش کوچک و بزرگ بررسی شده است.

اختلال در خون رسانی به مغز سبب کاهش رسیدن اکسیژن و گلوکز به این بافت می‌گردد. این امر باعث اختلالات عصبی نظیر فراموشی، هذیان، اختلال تکلم و غیره می‌شود. داروهایی که سبب کاهش آسیب‌های فوق گردند در بهبود اختلالات ایسکمیک ایجاد شده متعاقب سکته مغزی نیز موثر خواهند بود. تلاشهای زیادی برای شناسایی و تهیه چنین داروهایی صورت گرفته است ولی با این وجود داروهای کمی در این خانواده وجود دارند. در بعضی گونه‌های سالویا مانند *S. miltiorrhiza* اثرات ضدایسکمی در ریشه گیاه مشاهده شده است [١٦]. اخیراً نیز تحقیقات ما نشان داده است که برگ و دانه گیاه *S. leriifolia* باعث کاهش مرگ و میر حاصل از هیپوکسی می‌شود [٣]. از این جهت در این مطالعه اثرات ضدهیپوکسی و ضدایسکمی ریشه گیاه نوروزک در موش بزرگ و کوچک مورد مطالعه قرار گرفت.

روش کار

حیوان

موش سفید کوچک ٢٥ تا ٣٠ گرمی و موش سفید بزرگ ٢٥٠ تا ٣٠٠ گرمی نر استفاده شد.

تهیه گیاه

گیاه نوروزک در خردادماه سال ١٣٧٩ از منطقه بجستان جمع‌آوری شد و سپس توسط مهندس جوهرچی، کارشناس بخش گیاه شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی، مورد تایید قرار گرفت (شماره هرباریوم: ٠٥-١٩١٢-١٥٣). ریشه گیاه نوروزک پس از تمیز کردن توسط آسیاب پودر و در شرایط مناسب نگهداری شد.

روش عصاره‌گیری

عصاره‌گیری به دو روش جوشانده آبی و خیسانده الکلی انجام شد.

عصاره‌گیری به روش جوشانده آبی

ریشه گیاه نوروزک تمیز، در سایه خشک و توسط آسیاب خرد گردید. به ازای هر گرم پودر، ١٠ میلی‌لیتر آب مقطر درون بشر ریخته شد و توسط چراغ بونزن به جوش آمد. مقدار مناسب از پودر داخل بشر ریخته شد. به مدت ١٥ دقیقه آن را جوشانده، پس از سرد شدن آن را از پارچه تمیزی گذرانده و سپس توسط کاغذ صافی و قیف بوخنر صاف گردید. مایع صاف شده به چند پلیت منتقل شد و روی بن‌ماری با حرارت ٣٥ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت که حدوداً ١٢ ساعت بعد کاملاً خشک شده بود.

عصاره‌گیری به روش خیساندن در الکل

بعد از محاسبه وزن مورد نیاز برای تهیه دوز مورد نیاز، پودر ریشه را درون ظرف مناسبی ریخته سپس به ازای هر گرم پودر، ١٠ میلی‌لیتر الکل اتیلیک به آن افزوده شد و ظرف هر چند ساعت به آرامی تکان داده شد. پس از ٧٢ ساعت، محتویات ظرف از پارچه تمیز و سپس توسط قیف بوخنر صاف گردید.

محلول صاف شده در چند پلیت ریخته شد و بر روی بن‌ماری در درجه حرارت ٣٥ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک گردید.

ارزیابی حداکثر دوز قابل تحمل و تعیین LD_{50}

دوزهای مختلف عصاره‌ها از راه داخل صفاقی به گروههای ٦ تایی موش تجویز شد و مرگ و میر حیوانات در طی ٤٨ ساعت کنترل گردید. بیشترین دوزی که در آن مرگ و میر مشاهده نگردید به عنوان حداکثر دوز قابل تحمل در نظر گرفته شد. جهت تعیین LD_{50} عصاره آبی و الکلی ریشه گیاه نوروزک ازبرنامه کامپیوتری PCS و از روش Litchfield and Wilcoxon استفاده شد و نتایج سمیت حاد به صورت LD_{50} و محدوده اطمینان (Confident Limit=CL) گزارش گردید.

مطالعه اثر ضدهیپوکسی عصاره‌های خیسانده الکلی و جوشانده آبی ریشه گیاه نوروزک در موش سفید کوچک

روش ایجاد هیپوکسی در محفظه بسته و در موش سفید کوچک

اساس ایجاد هیپوکسی در این روش، کمبود اکسیژن در اثر تنفس حیوان در محفظه شیشه‌ای مهر و موم شده بود. به این صورت که هر حیوان در محفظه شیشه‌ای با حجم ۳۵۰ میلی‌لیتری قرار داده شد. با آویزان کردن جاذب CO_2 در بالای محفظه، فاکتور ایجاد کننده اسیدوز را از بین برده و سپس درب محفظه توسط وازلین مهر و موم و توسط وزنه سنگینی در ته آکواریوم حاوی آب °C ۲۵ قرار گرفت. نگهداری در زیر آب به خاطر اطمینان از عدم ورود هوا می‌باشد. اثر ضدهیپوکسی عصاره به صورت زمان زنده ماندن موش‌ها بررسی شد[۱۴].

بررسی اثر ضدهیپوکسی عصاره آبی ریشه گیاه نوروزک به روش ایجاد هیپوکسی در محفظه بسته و در حضور جاذب CO_2

٤ دوز عصاره آبی ریشه شامل ۱ g/kg، ۰/۷۵ g/kg، ۰/٥٦ g/kg و ۰/٤۲ g/kg تهیه گردید. همچنین نرمال سالین ۲۰ ml/kg به عنوان کنترل منفی و فنی‌توپین ۵۰ mg/kg به عنوان کنترل مثبت تهیه شد. به هر گروه ٦ تایی از موش‌ها از غلظت‌های فوق به روش داخل صفاقی تزریق گردید. بعد از ۳۰ دقیقه هر حیوان در یک محفظه شیشه‌ای مهر و موم شده توسط وازلین قرار داده شد. ۲۰ گرم آهک سده توسط پارچه توری آویزان شد. آهک سده در صورت استفاده مجدد باید در معرض جریان هوا و نور مستقیم آفتاب قرار گیرد و حداکثر دوبار می‌توان از آن استفاده کرد. به دلیل اینکه زمان زنده ماندن در غلظت های ۰/۱ g/kg و ۰/۷ g/kg تقریباً مساوی بود لذا برای از بین بردن فاکتورهایی همچون کاهش جذب در اثر غلظت زیاد و ایجاد خواب‌آلودگی در دوز بالا، غلظت ۰/۹ g/kg نیز استفاده شد.

بررسی اثر ضدهیپوکسی عصاره الکلی ریشه خرد شده نوروزک پس از تزریق داخل صفاقی به روش ایجاد هیپوکسی در محفظه بسته و در حضور جاذب CO_2

شرایط و غلظت‌های تزریق شده مانند عصاره آبی بود. در اینجا هم به علت برابر بودن اثر دو دوز ۰/۷ g/kg و ۱ g/kg، غلظت ۰/۹ g/kg تزریق گردید.

مطالعه اثر ضدایسکمی عصاره‌های خیسانده آبی و الکلی
ریشه گیاه نوروزک در موش بزرگ

روش ایجاد ایسکمی با انسداد چهار رگ

پس از بیهوش کردن موش بزرگ (گزیلازین ٦ mg/kg، کتامین ٦۰ mg/kg، داخل صفاقی) با ایجاد شکاف در پشت سر و گردن و پیدا کردن سوراخ‌های آلار بر روی استخوان مهره اول با کوتر الکتریکی، دو شریان مهره‌ای سوزانده و مسدود شد. سپس پشت حیوان بخیه زده شد.

پس از گذشت ٢٤ ساعت دوباره حیوان بیهوش و با عمل جراحی دو شریان کاروتید از جلو با گیره به مدت ۲۰ دقیقه مسدود و دوباره باز شد.

در یک گروه اعمال جراحی صورت پذیرفت. با این تفاوت که رگ‌ها را بدون مسدود کردن نمایان کرده و دوباره پوست بخیه زده شد. مواد مذکور ۱۵ دقیقه بعد از انسداد شریان‌های کاروتید تزریق گردید.

پس از نگهداری حیوانات در شرایط مناسب به مدت ۷۲ ساعت، حیوانات را بیهوش و کل مغز از داخل جمجمه خارج و به محلول تثبیت شده شامل فرمالدیید ۱ درصد جهت بررسی با میکروسکوپ نوری توسط رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین منتقل شد.

جهت بررسی با میکروسکوپ الکترونی، نمونه مورد نظر در گلوتارآلدیید ۲/۵ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH= ۷/٤) به مدت نیم ساعت در درجه حرارت اتاق و یک شبانه روز در یخچال جهت ثابت شدن نگهداری شد. سپس ۳ بار طی ۲٤ ساعت با بافر فسفات شستشو و دوباره در محلول اسمیوم تتراکساید ۱ درصد در بافر فسفات به مدت یک ساعت در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. بعد از این مرحله نمونه ۳ مرتبه با آب در طی یک ساعت شستشو داده شد و سپس با الکل با درجه های ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ سه مرتبه آبگیری صورت گرفت. پس از مرحله آبگیری انفیلتراسیون با رزین اپون آرالدایت انجام شد. تهیه بلوک با قرار دادن نمونه در کپسول ژلاتینی و افزودن رزین تازه در درجه حرارت °C ۵۵ به مدت ٤۸ ساعت صورت گرفت و برش‌های نازک (۷۰-۹۰ nm) با اولترامایکروتوم تهیه و روی گریدز (Grids) قرار داده و سپس رنگ آمیزی با اورانیل‌استات و سیترات سرب انجام شد. سپس مقاطع به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذرا مدل LEO 910 مورد مشاهده و عکسبرداری قرار گرفتند [۱۷].

درجه بندی ضایعات ایسکمی با میکروسکوپ نوری

نتایج تغییرات ایسکمیک به صورت زیر در نظر گرفته شد:

۰ = تغییرات ایسکمیک نرونی پراکنده و کمتر از ۲ درصد
۱ = تغییرات ایسکمیک نرونی ۱۰ درصد و کمتر از آن
۲ = تغییرات ایسکمیک بین ۱۰ تا ۵۰ درصد
۳ = تغییرات ایسکمیک بیشتر از ۵۰ درصد

بررسی فیتوشیمی عصاره‌های آبی و الکلی

غربالگری فیتوشیمیایی عصاره‌ها توسط مواد و واکنش‌گرهای زیر انجام پذیرفت:

آلکالویید توسط واکنش‌گر دراژندروف (dragendorff)، فلاونویید توسط منیزیم، اسید کلریدریک و تانن توسط معرف بوشاردا و ساپونین بر مبنای ایجاد کف [۱۹].

محاسبات آماری

ابتدا با استفاده از برنامه کامپیوتری Instat، داده‌های خام مربوط به هر گروه به صورت ستونی وارد گردید. برای مشخص کردن انحراف استانداردها و همگن بودن آنها از آزمون ANOVA استفاده شد. برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون Tukey-Kramer استفاده و در صورت معنی‌دار بودن اختلاف بین انحراف استانداردها از آزمون غیر پارامتریک Dunn استفاده شد. مقایسه شدت ایسکمی نیز به روش آزمون غیر پارامتریک Dunn صورت گرفت. برای رسم نمودارها هم از برنامه نرم افزاری Sigma Plot 5.0 استفاده شد.

نتایج

عصاره‌گیری

برای عصاره‌گیری ریشه گیاه نوروزک از دو روش خیسانده الکلی و جوشانده آبی استفاده شد.

بازده عصاره جوشانده آبی ریشه گیاه نوروزک

پس از جوشاندن ریشه گیاه به مدت ۱۵ دقیقه، ۵/۵ درصد عصاره تیره رنگ به دست آمد که به راحتی در نرمال سالین ۰/۹ درصد حل گردید و محلول یکنواختی به دست آمد.

بازده عصاره خیسانده الکلی ریشه گیاه نوروزک

پس از خیساندن ریشه گیاه نوروزک به مدت ۷۲ ساعت، ٦ درصد عصاره الکلی تیره رنگ به دست آمد. این عصاره پس از ساییدن در هاون به راحتی در نرمال سالین ۰/۹ درصد حل شد.

تعیین دوز مورد آزمایش و LD_{50} عصاره آبی ریشه گیاه نوروزک به روش تزریق داخل صفاقی در موش سفید کوچک

بر اساس نتایج مقدماتی، دوز g/kg ۱ که فاقد مرگ و میر بود به عنوان دوز آزمایش انتخاب شد. LD_{50} عصاره آبی ریشه گیاه نوروزک g/kg ۱/٤٥ (CL:۱/۲۲–۱/۷۰) به دست آمد.

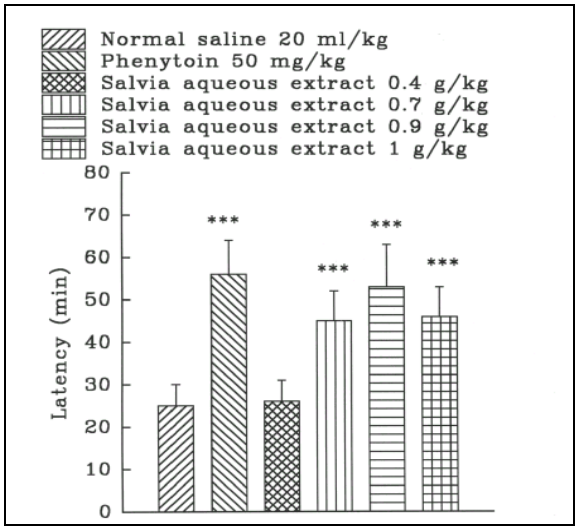
تعیین دوز مورد آزمایش و LD_{50} عصاره الکلی ریشه گیاه نوروزک به روش تزریق داخل صفاقی در موش سفید کوچک

با توجه به نتایج مقدماتی، دوز g/kg ۱/۱۲۵ به علت عدم مرگ و میر به عنوان دوز مورد آزمایش انتخاب شد. LD_{50} عصاره الکلی ریشه گیاه نوروزک g/kg ۱/٥٥ (CL: ۱/۲۸–۱/۸۷) به دست آمد.

بررسی اثر ضدهیپوکسی عصاره آبی ریشه گیاه نوروزک به روش ایجاد هیپوکسی در محفظه بسته و در حضور جاذب CO_2 در موش سفید کوچک

در این آزمایش ٤ گروه از عصاره آبی به ترتیب g/kg ۱، g/kg ۰/۹، g/kg ۰/۷ و g/kg ۰/٤ به همراه فنی‌توین به عنوان کنترل مثبت با دوز mg/kg ٥۰ و نرمال سالین با دوز ml/kg ۲۰ به عنوان کنترل منفی تهیه و مورد بررسی قرار گرفتند.

در این شرایط موش‌ها قبل از توقف تنفسی دچار افزایش سرعت تنفس، لرز و تشنج شدند که نهایتاً منجر به مرگ شد. همچنین در اکثر موش‌ها مدفوع کردن مشاهده شد. در دوز g/kg ۱ عصاره آبی، خواب آلودگی مشابه دوز g/kg ۰/۹ مشاهده شد.



نمودار ۱- بررسی اثر ضدهیپوکسی جوشانده آبی ریشه گیاه نوروزک به روش ایجاد هیپوکسی در محفظه بسته و در حضور جاذب CO_2 در موش سفید کوچک

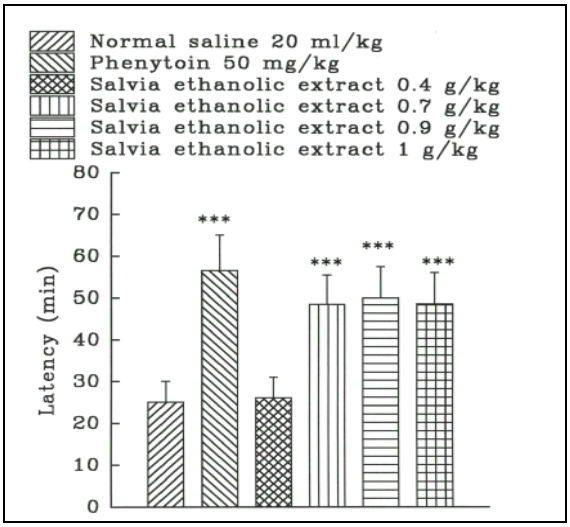
تزریق ۴ سطح دوز عصاره آبی ریشه گیاه نوروزک به همراه یک دوز فنی‌توین به عنوان کنترل مثبت و یک سطح دوز نرمال سالین به عنوان کنترل منفی به طور جداگانه به روش داخل صفاقی به ۶ گروه ۶ تایی موش‌ها به صورت داخل صفاقی تزریق شد و پاسخ ضدهیپوکسی به صورت زمان زنده ماندن ثبت گردید. هر ستون عمودی نشانگر میانگین پاسخ ضدهیپوکسی ۶ حیوان ± خطای معیار بوده است. آنالیز آماری با آزمون *ANOVA* انجام شد (*0.001* >*P*) و جهت مقایسه گروه‌ها آزمون *Tukey-Kramer* انجام شد.**

فاصله تشنج تا مرگ در این روش ۰/٥ ± ۱/٦۰ دقیقه بود.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون ANOVA انجام گرفت و جهت مقایسه بین گروه‌ها آزمون Tukey-Kramer انجام شد. عصاره آبی در محدوده دوز g/kg ۰/۷، کارآیی در حد فنی‌توین نشان داد (نمودار ۱).

بررسی اثر ضدهیپوکسی عصاره الکلی ریشه گیاه نوروزک به روش ایجاد هیپوکسی در محفظه بسته و در حضور جاذب CO_2 در موش سفید کوچک

در این آزمایش ٤ گروه از عصاره خیسانده الکلی به ترتیب g/kg ۱، g/kg ۰/۹، g/kg ۰/۷ و g/kg ۰/٤ به همراه فنی‌توین به عنوان کنترل مثبت با دوز mg/kg ٥۰ و نرمال‌سالین با دوز ml/kg ۲۰ به عنوان کنترل منفی تهیه و مورد بررسی قرار گرفتند.



نمودار ۲- بررسی اثر ضدهیپوکسی عصاره خیسانده الکلی ریشه گیاه نوروزک به روش ایجاد هیپوکسی در محفظه بسته و در حضور جاذب CO_2 در موش سفید کوچک

تزریق ۴ سطح دوز عصاره الکلی ریشه گیاه نوروزک به همراه یک دوز فنی‌توین به عنوان کنترل مثبت و یک سطح دوز نرمال سالین به عنوان کنترل منفی به طور جداگانه به روش داخل صفاقی به ۶ گروه ۶ تایی موش‌ها به صورت داخل صفاقی تزریق شد و پاسخ ضدهیپوکسی به صورت زمان زنده ماندن ثبت گردید. هر ستون عمودی نشانگر میانگین پاسخ ضدهیپوکسی ۶ حیوان ± خطای معیار بوده است. آنالیز آماری با آزمون *ANOVA* انجام شد (*0.001*>*P*) و جهت مقایسه گروه‌ها آزمون *Tukey-Kramer* انجام شد.**

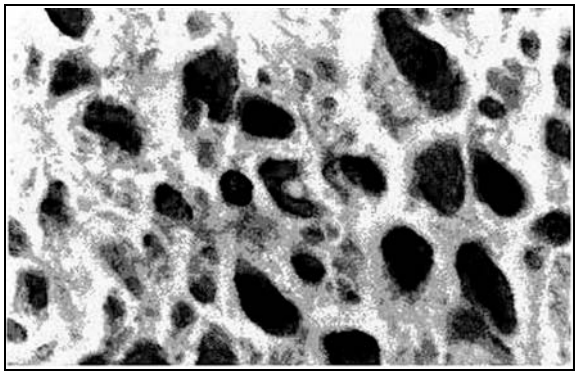
در این شرایط موش‌ها دچار افزایش سرعت تنفس، لرز، تشنج و نهایتاً مرگ شدند. همانند عصاره آبی، خواب‌آلودگی در دوز g/kg ۰/۹ و دوزهای پایین‌تر مشاهده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون ANOVA انجام گرفت و جهت مقایسه بین گروه‌ها آزمون Tukey-Kramer انجام شد. عصاره الکلی در محدوده دوز g/kg۱-۰/۷، کارآیی در حد فنی‌توین نشان داد (نمودار ۲).

بررسی اثرات ضدایسکمی گروههای کنترل و عصاره‌های الکلی و آبی ریشه گیاه نوروزک توسط میکروسکوپ نوری

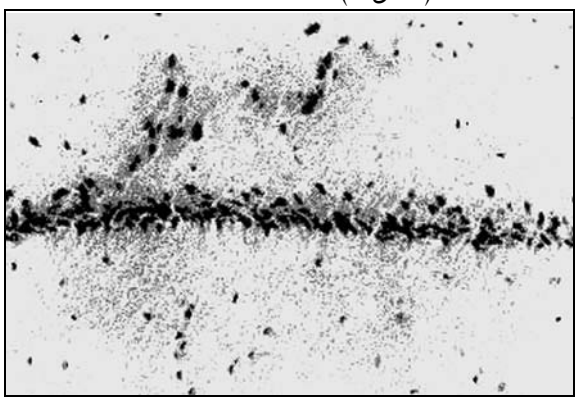
علایم ناشی از ایجاد ایسکمی مثل پر رنگ شدن، چروکیدگی هسته، کنگره‌دار شدن هسته، پیکنوز در نواحی CA1 به وضوح مشاهده شد. این علایم به میزان خفیف‌تر در ناحیه CA2، CA3 و CA4 دیده شد.

در گروه کنترل منفی انواع نورون‌های کامل نکروزه همراه با ادم نوروپیل مشاهده گردید. همچنین در نسج‌های مجاور هیپوکامپ، نکروز نکروتیک و علایم ناشی از ایجاد ایسکمی دیده شد (اشکال ۱ و۲).

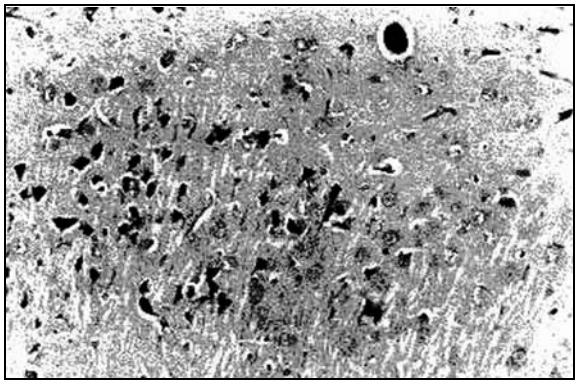


شکل ۱- انواع نورون‌های کامل نکروزه همراه با ادم نوروپیل در ناحیه *CA1*، تزریق نرمال سالین (داخل صفاقی، *ml/kg* ۲۰)، رنگ آمیزی *H-E*، میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰×۱۰۰

در گروه کنترل مثبت (فنی‌توین) علایم ناشی از آسیب ایسکمی در ناحیه CA1 به صورت تغییرات خفیف مثل کروماتولیز خفیف و نکروزهای پراکنده وجود داشت. این علایم در ناحیه CA2، CA3 و CA4 به صورت بسیار خفیف وجود داشت و یا اصلاً مشاهده نشد (شکل ۳).



شکل ۲- نکروز کامل لایه‌ای نورون‌های ناحیه *CA1*، تزریق نرمال سالین (داخل صفاقی، *ml/kg* ۲۰)، رنگ آمیزی *H-E*، میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰×۱۰

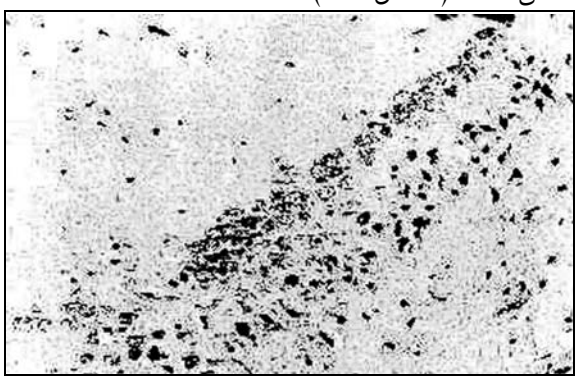


شکل ۳- نکروز پراکنده نورون‌ها در ناحیه *CA1*، در مجاورت و مختلط با نورون‌های سالم، تزریق فنی‌توین (داخل صفاقی، *mg/kg* ۵۰)، رنگ آمیزی *H-E*، میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۲۰×۱۰

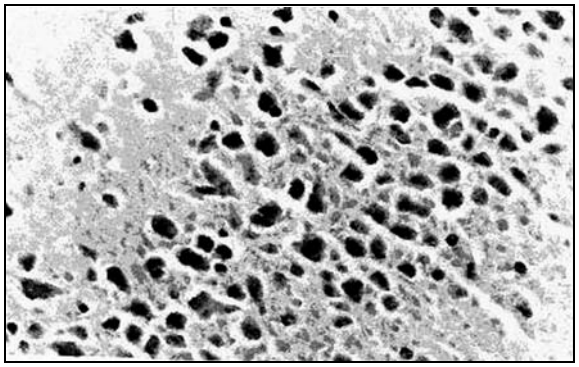
در گروه عصاره آبی در نواحی CA2، CA3 وCA4 تغییرات ایسکمی مشاهده نشد ولی در ناحیه CA1 علایم به صورت کروماتولیز خفیف، نکروزهای
پراکنده و واکوئل‌دار شدن مشاهده گردید (شکل ٤).

در گروه عصاره آبی، علایم به صورت نکروزهای پراکنده و کروماتولیز خفیف و در نواحی CA2، CA3 وCA4 به صورت آرتیفکت‌های پراکنده و یا سلول کاملاً سالم مشاهده شد (شکل ٥).

عصاره‌های آبی و الکلی ریشه این گیاه اثرات ضدایسکمی معنی‌داری در ناحیه CA1، CA3 و CA4 نشان دادند (اشکال ٥-٣).

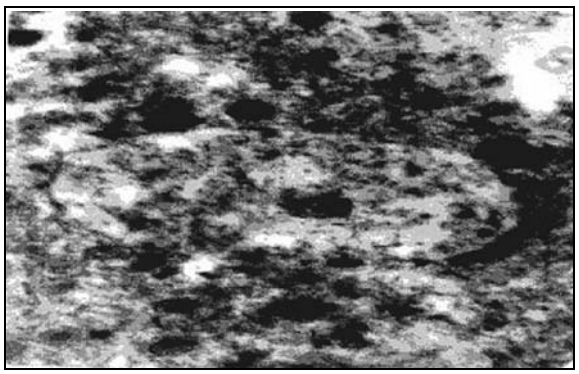


شکل ۴- نکروز نورون‌ها در ناحیه *CA1* در مجاورت نورون‌های غیر نکروزه، تزریق عصاره آبی ریشه گیاه نوروزک (داخل صفاقی، *g/kg* ۰/۹)، رنگ آمیزی *H-E*، میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰×۱۰

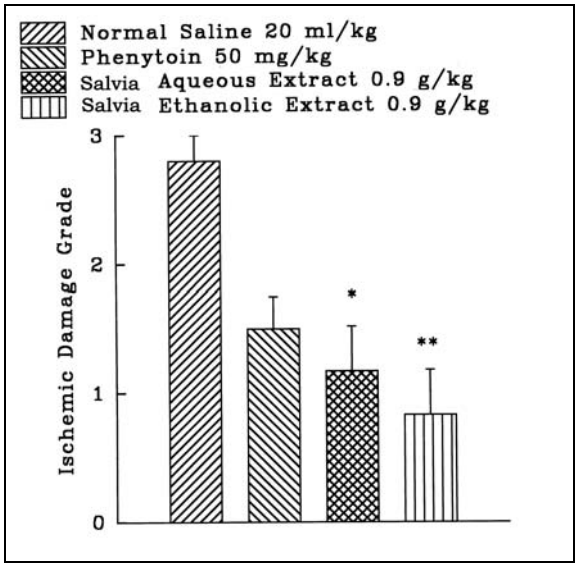


شکل ۵- نکروز لایه‌ای نورون‌های ناحیه *CA1*، تزریق عصاره الکلی ریشه گیاه نوروزک (داخل صفاقی، *g/kg* ۰/۹)، رنگ آمیزی *H-E*، میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰×۱۰

در گروه کنترل منفی، کروماتولیز کامل همراه با محو غشای هسته مشاهده شد (شکل ٦).



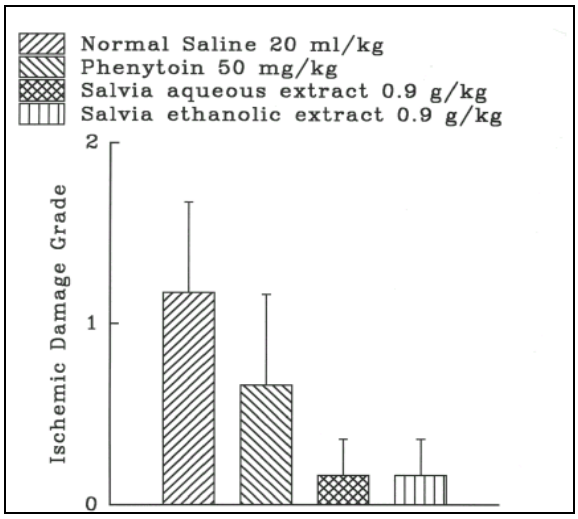
شکل ۶- هسته یک نورون ناحیه هیپوکامپ، کروماتولیز کامل همراه با محو غشای هسته، تزریق نرمال سالین (داخل صفاقی، *ml/kg* ۲۰)، میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی ۱۶۰۰۰



نمودار ۳- بررسی اثرات ضدایسکمی عصاره‌های آبی و

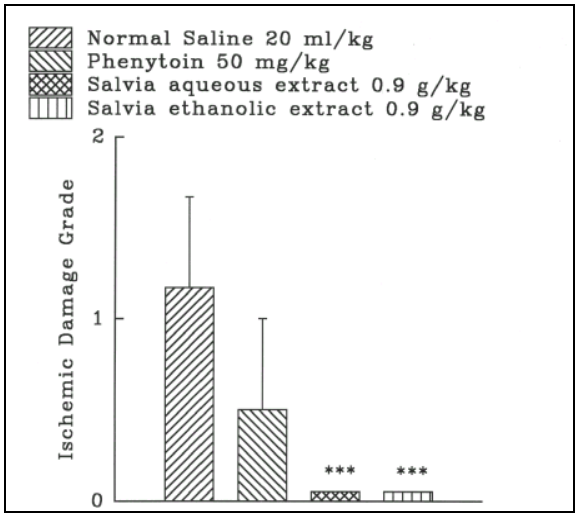
الکلی ریشه گیاه نوروزک پس از تزریق داخل صفاقی در ناحیه *CA1* هیپوکامپ موش بزرگ توسط میکروسکوپ نوری

موش‌ها به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. در یک گروه نرمال سالین به عنوان کنترل منفی، در یک گروه فنی‌توین به عنوان کنترل مثبت و در دو گروه بعدی به طور جداگانه عصاره الکلی و آبی ریشه گیاه نوروزک به روش داخل صفاقی تزریق گردید و اثرات ضدایسکمی به صورت اعداد ثبت شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس آزمون *Dunn* انجام شد *(*P<0.05)* و *(P<0.01)*.**



نمودار ۴- بررسی اثرات ضدایسکمی عصاره‌های آبی و الکلی ریشه گیاه نوروزک پس از تزریق داخل صفاقی در ناحیه *CA2*هیپوکامپ موش بزرگ توسط میکروسکوپ نوری

موش ها به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. در یک گروه نرمال سالین به عنوان کنترل منفی، در یک گروه فنی‌توین به عنوان کنترل مثبت و در دو گروه بعدی به طور جداگانه عصاره الکلی و آبی ریشه گیاه نوروزک به روش داخل صفاقی تزریق گردید و اثرات ضدایسکمی به صورت اعداد ثبت شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس آزمون *Dunn* انجام شد.

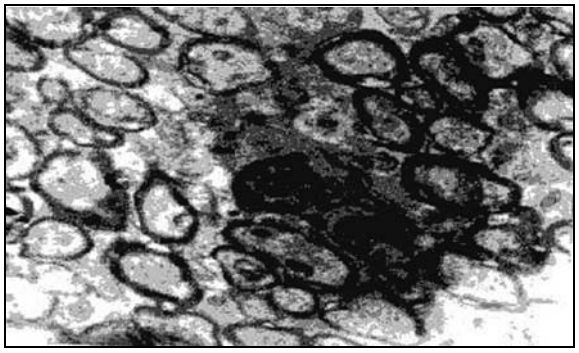


نمودار ۵- بررسی اثرات ضدایسکمی عصاره‌های آبی و الکلی ریشه گیاه نوروزک پس از تزریق داخل صفاقی در ناحیه *CA3* و*CA4* هیپوکامپ موش بزرگ توسط میکروسکوپ نوری

موش‌ها به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. در یک گروه نرمال سالین به عنوان کنترل منفی، در یک گروه فنی‌توین به عنوان کنترل مثبت و در دو گروه بعدی به طور جداگانه عصاره الکلی و آبی ریشه گیاه نوروزک به روش داخل صفاقی تزریق گردید و اثرات ضدایسکمی به صورت اعداد ثبت شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس آزمون *Dunn* انجام شد (*(*P< 0.001)*.**

بررسی اثرات ضدایسکمی گروه‌های کنترل و عصاره الکلی و آبی ریشه گیاه نوروزک توسط میکروسکوپ الکترونی

در گروه عصاره آبی ریشه گیاه نوروزک، تخریب ناقص غشای هسته همراه با واکوئل‌های متعدد در بعضی از نمونه‌ها مشاهده شد (شکل ۷).

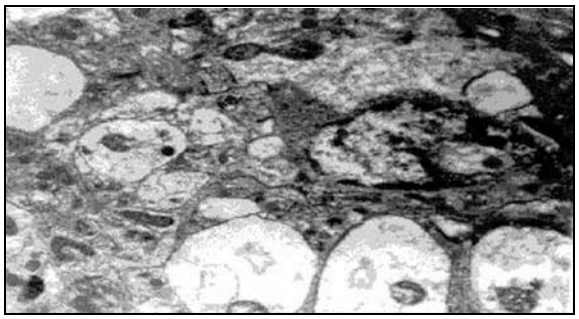


شکل ۷- زواید سلول‌های عصبی با تغییرات ناشی از ایسکمی،

تزریق عصاره آبی ریشه گیاه نوروزک(داخل صفاقی، *ml/kg* ۰/۹)،

رنگ‌آمیزی با استات یورانیل و سیترات سرب، میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی ۱۰۰۰۰

در گروه عصاره الکلی تغییرات ایسکمی به صورت ایجاد واکوئل‌های جذبی متعدد دیده شد (شکل ۸). در گروه فنی‌توین تغییرات به صورت تخریب ناقص غشای هسته و کروماتولی ناقص مشاهده گردید.



شکل ۸- واکوئل‌های جذبی متعدد در یک نورون ناحیه هیپوکامپ، تزریق عصاره الکلی ریشه گیاه نوروزک (داخل صفاقی، *g/kg* ۰/۹)، رنگ‌آمیزی با استات یورانیل و سیترات سرب، میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی ۸۰۰۰

بررسی فیتوشیمی

تانن و ساپونین در هر دو عصاره به مقدار فراوان ردیابی شد. در عصاره الکلی رسوب اندک قهوه‌ای رنگ مبنی بر وجود آلکالویید مشاهده گردید (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج بررسی فیتوشیمی عصاره‌های آبی و الکلی ریشه گیاه نوروزک

ترکیب	آلکالویید	فلاونویید	تانن	ساپونین
عصاره آبی	–	–	++	+++
عصاره الکلی	+	–	++	+++

بحث

این مطالعه نشان داد که عصاره آبی و الکلی ریشه گیاه نوروزک دارای اثرات ضدهیپوکسی و ضدایسکمی بوده و ریشه این گیاه به طور عمده شامل تانن و ساپونین می‌باشد.

نتایج سمیت حاد نشان می‌دهد که هر دو عصاره آبی و الکلی تقریباً به یک اندازه ایجاد سمیت نموده و طبق جداول طبقه‌بندی سمیت، در محدوده مواد نسبتاً سمی قرار می‌گیرند [۱۳].

نتایج فیتوشیمی نشان داد که عصاره‌های این گیاه به طور عمده حاوی ساپونین و تانن می‌باشند. فعالیت ضدایسکمی و ضدهیپوکسی تعدادی از این ترکیبات گزارش شده است [۵، ۱۸ و ۲۰]. در آزمایش‌های فیتوشیمی وجود دی‌ترپن‌ها بررسی نگردید ولی احتمال اثر این ترکیبات بر روی ایسکمی مانند گیاه *S. miltiorrhiza* وجود دارد.

آدنوزین به عنوان نورومدولاتور در سیستم اعصاب مرکزی شناخته شده است [۱۰] و در مدل‌های مختلف دارای اثرات ضدهیپوکسی و ضدایسکمی است [۱۲، ۱۴ و ۱۵].

گیاه *S. miltiorrhiza* باعث افزایش غلظت ATP در مغز شده است [۲۱]. از آنجایی که ATP به آدنوزین تبدیل می‌شود، احتمال دارد عصاره گیاه نوروزک از این طریق نیز باعث اثرات محافظتی خود شده باشد.

اثرات ضدایسکمی عصاره آبی و الکلی ریشه گیاه نوروزک در میکروسکوپ نوری و الکترونی

از آنجایی که میکروسکوپ الکترونی میدان کوچکی از سلول را بزرگ می‌کند، برای مطالعه دقیق و جز به جز سلول مناسب است و برای تکمیل و تایید نتایج حاصل از میکروسکوپ نوری مناسب می‌باشد. از طرفی چون اجزای سلول را بسیار بزرگ می‌کند، تغییرات ایسکمیک به راحتی قابل بررسی است. ولی به علت اینکه در یک زمان معین نمی‌توان کل سلول را مورد مطالعه قرار داد و از طرفی تهیه نمونه‌های زیاد، متحمل هزینه و وقت زیادی می‌شود نمی‌توان در محاسبات آماری به کار برد. اما در میکروسکوپ نوری کل یک سلول را در یک زمان معین می‌توان بررسی و همچنین تعداد زیادی نمونه تهیه کرد. ولی در مطالعه تغییرات ایسکمیک، تجربه و تخصص فرد بسیار مهم است و بایستی از توانایی بالایی برخوردار باشد تا بتواند تغییرات ایجاد شده را مشاهده و با دیگر نمونه‌ها مقایسه و ثبت کند.

به هر حال در این مطالعه نتایج به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی صحت نتایج حاصل از میکروسکوپ نوری را تایید می‌کند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به جهت تأمین هزینه این پژوهش تشکر می‌شود.

منابع

۱. آرش علیرضا. *بررسی سمیت حاد، اثرات ضددردی و ضدالتهابی عصاره دانه نوروزک بر موش سفید کوچک و بزرگ*. دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی. پایان نامه برای دریافت درجه دکترای داروسازی.۱۳۷۵، صفحات ۸-۱۶۷.

۲. باغی نرگس. *بررسی اثرات ضدمیکروبی گیاه نوروزک*. دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی مشهد. پایان نامه برای دریافت درجه دکترای داروسازی. ۱۳۷٤، صفحه ۹۱.

۳. حسین‌زاده حسین و ایمن شهیدی محسن. اثرات عصاره های آبی و الکلی دانه و برگ گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia*) بر مدت زمان زنده ماندن موش‌های در معرض هیپوکسی. *مجله علوم پایه پزشکی ایران*. ۱۳۷۸، جلد ۲، صفحات ۸۲-۷۵.

۴. حسین زاده حسین، خزاعی محمد حسن و منتظمی شهره. کارآزمایی بالینی اثر ضددیابت برگ گیاه نوروزک. *مجله علوم پایه پزشکی ایران*. ۱۳۸۰، جلد ٤، صفحات ۷٤-٦۲.

5. Dou DQ, Zhang YW, Zhang L, Chen YJ and Yao X-S. The inhibitory effects of ginsenosides on protein tyrosine kinase activated by hypoxia/reoxygenation in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Planta Med.* 2001; 67: 19-23.

6. Hosseinzadeh H and Arabsanavi J. Anticonvulsant effect of *Salvia leriifolia* Benth. leaf and seed extracts in mice. *Irn. J. Basic Med. Sci.* 2001; 3:166-70.

7. Hosseinzadeh H, Haddad Khodaparest MH and Hosseini E. Anti-ulcer effect of *Salvia leriifolia* Benth. leaf and seed extracts in mice. *Pharm. Pharmacol. Lett*. 2000; 2: 63-4.

8. Hosseinzadeh H, Haddad Khodaparest MH and Shokoohizadeh H. Antihyper-glycemic effect of *Salvia leriifolia* Benth. Leaf and seed extracts in mice. *Irn. J. Med. Sci.* 1998; 23: 74-80.

9. Hosseinzadeh H and Lari P. Effect of *Salvia leriifolia* extract on morphine dependence in mice. *Phytother. Res*. 2000; 14: 384-7.

10. Hosseinzadeh H and Stone TW. Adenosine in the central nervous system. *Med. J. Isl. Rep. Iran.* 1996; 9: 361-8.

11. Hosseinzadeh H and Yavari M. Anti-inflammatory effects of *Salvia leriifolia* Benth. leaf extract in mice and rats. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 1999; 9: 60-1.

12. Laghi PF, Guideri F, Picano E, Parenti G, Varga A and Di Perri T. Increase in plasma adenosine during brain ischemia in man: a study during transient ischemic attacks, and stroke. *Brain Res. Bull*. 2000; 51: 327-30.

13. Loomis TA. *Essential of Toxicology*. Lea and Febiger, Philladelphia, PA. 1968; pp: 67-78.

14. Mori M, Nishizaki T and Okada Y. Protective effect of adenosine on the anoxic damage of hippocampal slice. *Neurosci*. 1992; 46: 301-7.

15. Nieber K, Eschke D and Brand A. Brain hypoxia: effects of ATP and adenosine. *Prog. Brain Res.* 1999; 120: 287-97.

16. Peigen K, Xinfu Z, Bo X and Fengying Z. The protective effect of Radix *Salvia miltiorrhiza* composita in cerebral ischemia. *J. Trad. Chin. Med.* 1983; 1983: 193-8.

17. Pulsinelli WA and Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: comments, opnions, and reviews. *Strok.* 1988; 19: 913-4.

18. Sui DY, Lu ZZ and Ma LN. Effects of the leaves of *Acanthopanax senticosus* on myocardial infarct size were studied in acute ischemic dogs. *Chung. Kuo. Chung. Xao. Tsa. Chin.* 1994; 19:746-7.

19. Trease GE and Evans WC. *Pharmacognosy*. Bailliere Tindall Press, London. 1983, pp: 309-706.

20. Wen TC, Yoshimura H, Matsuda S, Lim JH and Sakanaka M. Ginseng root prevents learning disability and neuronal loss in gerbils with minute forebrain ischemia. *Acta. Neuropathol.* 1996: 91: 15-22.

21. Wang SX and Xie SH. Effect of ATP quantity of myocardium and brain in mice by extract from *Rubia yunnanensis*, *Rubia corliifolia* and *Salvia miltiorrhiza*. *Chin. Trad. Herbal Drugs*, 1986; 17: 451-3.