

Research Paper

The Effects of Hydro-alcoholic Extract of Ocimum Basilicum Green Leaf on Pentylentetrazole-induced Seizure in Male Mice



Atena Rahimpour¹, *Mohammad Rostampour^{2,3}

1. Student Research Committee, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
2. Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
3. Department of Physiology, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.



Citation Rahimpour A, Rostampour M. The Effects of Hydro-alcoholic Extract of Ocimum Basilicum Green Leaf on Pentylentetrazole-induced Seizure in Male Mice. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2021; 30(2):156-167. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.30.2.1765.1>

doi <https://doi.org/10.32598/JGUMS.30.2.1765.1>



Received: 17 Apr 2021
Accepted: 31 May 2021
Available Online: 01 Jul 2021

Keywords:
Ocimum basilicum,
Pentylentetrazol,
Seizure, Mice

ABSTRACT

Background Regarding the chronic nature of epilepsy, and drug resistance in many cases, herbal medicine has received remarkable interest.

Objective The present study aimed to determine the anticonvulsant effects of hydro-alcoholic extract of Ocimum basilicum green leaf on Pentylentetrazole (PTZ)-induced seizure in male mice.

Methods In this experimental study, 48 albino male mice, weighing 20-25 g were randomly divided into 6 groups. All study groups were injected intraperitoneally (IP). The negative and positive control groups received saline (10 mL/kg) and phenobarbital (40 mg/kg) respectively. The treatment groups received 100, 300, 500, and 1000 mg/kg doses of hydro-alcoholic extract Ocimum basilicum green leaf. To provoke convulsion, after 45 minutes, PTZ was injected (80 mg/kg) to all research groups; accordingly, the d initiation time of myoclonic and tonic-clonic seizures and the frequency of 24h death were measured.

Results The obtained results indicated that the extract delayed the initiation time of myoclonic and tonic-clonic seizures, compared with the controls. The delay was significant at doses of 1000 (P<0.001), 500, and 300 mg/kg (P<0.01) for myoclonic seizure as well as 1000, 500, and 300 mg/kg (P<0.001) and 100 mg/kg (P<0.05) for tonic-clonic seizure. Furthermore, the extract decreased the 24h death. This was significant at doses of 1000, 500, and 300 mg/kg (P<0.001).

Conclusion It seems that the hydro-alcoholic extract of Ocimum basilicum green leaf presented decremental effects on PTZ-induced seizure and death in male mice.

Extended Abstract

1. Introduction

Seizure is caused by the abnormal discharge of brain neurons that originate from one area and spread to other areas. Epilepsy is called the occurrence of unpredictable periodic and recurrent seizures [1]. Besides, it has approximately

involved 0.5%-1% of the world's population [2]. Medicinal plants have been the primary source of medicines and rich sources of secondary metabolites with biological activities [3].

Ocimum basilicum is a medicinal plant with flavonoids and flavone compounds as well as antioxidant and anti-inflammatory properties. Considering the anticonvulsant role of antioxidant and anti-inflammatory agents [4], this

* Corresponding Author:

Mohammad Rostampour, PhD.

Address: Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

Tel: +98 (133) 33690099

E-Mail: rost_v@yahoo.com

study aimed to evaluate the anticonvulsant effects of hydro-alcoholic extract of *Ocimum basilicum* green leaf on Pentylentetrazol (PTZ)-induced seizure in male mice.

2. Methods

In this experimental study, 48 albino male mice, weighing 20-25 g were randomly divided into 6 groups. All study groups were injected Intraperitoneally (IP). The negative and positive control groups received saline (10 ml/kg) and phenobarbital (40 mg/kg), respectively. The treatment groups received doses of 100, 300, 500, and 1000 mg/kg of hydro-alcoholic extract of *Ocimum basilicum* green leaf. To provoke convulsion, after 45 minutes, PTZ was injected (80 mg/kg) to all study groups; accordingly, the initiation time of myoclonic and tonic-clonic seizures and frequency of 24h death was measured.

3. Results

The current research results indicated that the extract delayed the initiation time of myoclonic and tonic-clonic seizures, compared to the control group. The delay was significant at doses of 1000 ($P < 0.001$), 500, and 300 mg/kg ($P < 0.01$) for myoclonic seizure (Figure 1) as well as 1000, 500, and 300 mg/kg ($P < 0.001$) and 100 mg/kg ($P < 0.05$) for tonic-clonic seizure. Additionally, the extract decreased the 24h death rate. This was significant at doses of 1000, 500, and 300 mg/kg ($P < 0.001$).

4. Discussion and Conclusion

The present study data indicated that the hydro-alcoholic extract of *Ocimum basilicum* green leaf effectively reduced

PTZ-induced seizures. The extract increased the latency of myoclonic and tonic-clonic seizures and decreased the frequency of mortality 24h after PTZ injection. Substances that inhibit convulsions or increase the latency of PTZ-induced seizures are suggested as having anticonvulsant activity [5]. Therefore, the demonstration of *Ocimum basilicum* activity on the seizure model suggests that this herb possesses anticonvulsant potential.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

In this study, all steps of working with laboratory animals were performed according to the ethics guidelines of working with laboratory animals of Guilan University of Medical Sciences (Code: IR.GUMS.REC.1394.608).

Funding

This project was financially supported by the Vice-Chancellor Research and Technology of Guilan University of Medical Sciences.

Authors' contributions

Conducting experiments, collecting data and writing: Athena Rahimpour; Experimental design, data analysis and review, editing and finalization: Mohammad Rostampour.

Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors greatly appreciate the Vice-Chancellor Research and Technology of Guilan University of Medical Sciences for support and the Department of Medicinal Plants of Shahid Beheshti University and Ali Sonboli for preparing the extract of the plant.

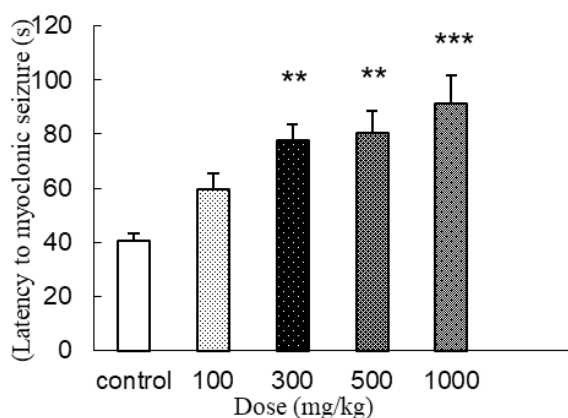


Figure1. The effects of different doses of hydro-alcoholic extract of *Ocimum basilicum* leaf on the latency of myoclonic seizure. Values present the Mean+SEM of 8 mice in each group. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, compared to the control group.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

اثر عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز بر تشنجات القاشده با پنتیلین تترازول در موش سوری نر

آتنا رحیمی پور^۱، محمد رستم پور^{۲،۳}

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۲. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.
۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۲۸ فروردین ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: ۱۰ خرداد ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۱۰ تیر ۱۴۰۰

زمینه: با توجه به مزمن بودن بیماری صرع و در موارد زیادی مقاومت دارویی، کشف داروهای جدید توجه زیادی را به خود جلب کرده است.
هدف: در این مطالعه اثر ضد تشنجی عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز بر تشنج ناشی از پنتیلین تترازول (PTZ) در موش سوری نر بررسی شد.

روش ها: در این مطالعه تجربی، ۴۸ سر موش سوری نر سفید در محدوده وزنی ۲۰ تا ۲۵ گرم به طور تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند. همه تزریقات به شکل داخل صفاقی انجام شد. گروه‌های کنترل منفی، سالین (۱۰ میلی لیتر) و کنترل مثبت، فنوباریتال (۴۰ میلی گرم) بر کیلوگرم دریافت کردند و به چهار گروه دیگر دوزهای ۱۰۰، ۵۰۰، ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز تزریق شد. برای ایجاد تشنج، بعد از ۴۵ دقیقه به حیوانات تمام گروه‌ها PTZ (۸۰ میلی گرم در هر کیلوگرم) تزریق شد و زمان شروع تشنجات میوکلونیک، تونیک - کلونیک و میزان مرگومیر ۲۴ ساعته اندازه گیری شدند.

یافته‌ها: عصاره به طور معنی داری موجب تأخیر در شروع تشنجات میوکلونیک در دوزهای ۱۰۰۰ با (P<۰/۰۰۱) و ۵۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم با (P<۰/۰۰۱) و تونیک - کلونیک در دوزهای ۱۰۰۰ و ۵۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم با (P<۰/۰۰۱) و در دوز ۱۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم با (P<۰/۰۰۵) شد. همچنین عصاره، مرگومیر ۲۴ ساعته را به طور معنی داری در دوزهای ۱۰۰۰ و ۵۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم با (P<۰/۰۰۱) کاهش داد.

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد که عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز اثر کاهشی بر تشنج ناشی از PTZ در موش سوری نر دارد و میزان مرگومیر ناشی از تشنج را کاهش می‌دهد.

کلیدواژه‌ها:

ریحان، پنتیلین تترازول، تشنج، موش سوری

مقدمه

زندگی آن‌ها آسیب رسانده و خطر مرگ زودرس زندگی آن‌ها را تهدید می‌کند [۳]. گرچه صرع در سنین گوناگون بر بیماران تأثیر می‌گذارد ولی بر زندگی کودکان، سالمندان و افراد با وضع اقتصادی اجتماعی پایین تر اثرات شدیدتری خواهد داشت. در ایالات متحده سالیانه حدود ۱۵/۵ میلیارد دلار به صورت مستقیم و غیرمستقیم صرف مقابله با بیماری صرع می‌شود [۴].

درمان‌های استاندارد تشنجات را در تعداد زیادی از بیماران کنترل می‌کند ولی درصد بالایی از بیماران علی‌رغم گرفتن دارو دچار صرع کنترل نشده هستند [۲]. داروهای ضد صرع را به علت عوارض تراژوژنیستی، نمی‌توان به صورت طولانی مصرف کرد ولی

تشنج^۱ ناشی از تخلیه غیرطبیعی نورون‌های مغزی است که از یک ناحیه شروع می‌شود و به سایر نواحی گسترش می‌یابد و صرع به بروز تشنجات دوره‌ای و تکراری غیرقابل پیش‌بینی گفته می‌شود [۱] که حدود ۰/۵ تا ۱ درصد مردم دنیا را درگیر کرده است [۲].

افراد مبتلا به صرع دچار اختلالات حسی - حرکتی، شناختی، روان‌شناختی و آسیب‌های اجتماعی هستند که به کیفیت

1. Seizure

* نویسنده مسئول:

دکتر محمد رستم پور

نشانی: رشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی.

تلفن: +۹۸ ۳۳۶۹۰۰۹۹ (۱۳)

رایانامه: rost_v@yahoo.com

مخصوص دستگاه تقطیر در خلأ (Rotary evaporator) منتقل شد و پس از تبخیر الکل و آب آن، محلول حاصل درون آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کاملاً خشک شود و برای تهیه غلظت‌های مختلف، پودر خشک عصاره توزین و با سرم فیزیولوژی به فرم سوسپانسیون رقیق شد. ضمناً حجم تزریق ۱۰ میلی‌لیتر در هر کیلوگرم وزن بدن موش بود [۱۳].

حیوانات: در این مطالعه تجربی، از ۴۸ سر موش سوری نر نژاد NMRI با وزن تقریبی ۲۰ تا ۲۵ گرم که از حیوان‌خانه دانشکده پزشکی رشت تهیه شد، استفاده کردیم. موش‌ها به طور تصادفی به ۶ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. حیوانات به جز در زمان آزمایش، در مدت نگهداری به طور آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. رژیم غذایی موش‌ها، شامل غذای آماده (ساخت کارخانه خوراک دام پارس) و آب تصفیه‌شده شهری بود. موش‌ها سیکل ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی داشتند. حیوانات به طور دسته‌جمعی نگهداری می‌شدند و فقط در روز آزمایش (حداقل یک ساعت قبل از شروع آزمایش)، در قفس انفرادی نگهداری شدند. درجه حرارت آزمایشگاه در حد 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد و از هر موش فقط در یک آزمایش استفاده گردید. همه اصول کار روی حیوانات، مطابق دستورالعمل اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی گیلان رعایت شد.

ایجاد تشنج: در این مطالعه ۴۵ دقیقه قبل از تزریق PTZ (ساخت شرکت سیگما آمریکا، ۸۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی)، به گروه‌های آزمایش غلظت‌های ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی ریحان [۱۵، ۱۴] و به گروه کنترل منفی، سرم فیزیولوژی (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) و به گروه کنترل مثبت، فنوباریتال (ساخت شرکت Desitin آلمان، ۴۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم) به طریق داخل صفاقی تزریق شد و زمان شروع تشنجات میوکلونیک، تونیک - کلونیک و میزان مرگ‌ومیر ۲۴ ساعته بررسی شد. حمله میوکلونیک به حالتی اطلاق می‌شود که در آن پرش ناگهانی اندام‌ها (کنده شدن از زمین توسط ۴ دست و پا) رخ می‌دهد. حمله تونیک - کلونیک نیز حالتی است که اندام‌ها در یک وضعیت کشیده^۱ و سخت قرار می‌گیرند و موش دچار حرکات لرزشی پی در پی و غیرارادی منظم می‌شود. لازم به ذکر است که وضعیت تشنجی حیوان به مدت ۳۰ دقیقه پایش شد.

آنالیز آماری: برای بررسی آماری کمیت‌های اندازه‌گیری، از روش آنالیز واریانس یک طرفه و برای تشخیص اختلاف بین گروه‌های گوناگون از آزمون توکی^۵ استفاده و $P < 0.05$ معنی‌دار تلقی شد. برای مقایسه درصد مرگ‌ومیر حیوانات نیز از آزمون χ^2 -square و سپس تست فیشر استفاده شد.

از طرف دیگر چنانچه تشنج بیماران صرعی درمان نشود به دلیل ایجاد محدودیت‌های فراوان، بر بسیاری از توانایی‌های فرد تأثیر می‌گذارد. بنابراین، کشف داروهای جدید با محدودیت‌های کمتر می‌تواند گام بزرگی در این زمینه محسوب شود. امروزه گیاهان دارویی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. علت توجه زیاد به گیاهان دارویی این است که طی سالیان متمادی مدنظر بوده و اثرات درمانی آن‌ها به اثبات رسیده است. با توجه به اینکه گیاهان دارویی دارای مواد فعال بیولوژیکی هستند [۵]، منطقی است که درباره گیاهانی که در بعضی منابع سنتی اثرات ضد تشنجی آن‌ها گزارش شده است اقدام تحقیقی انجام شود [۶].

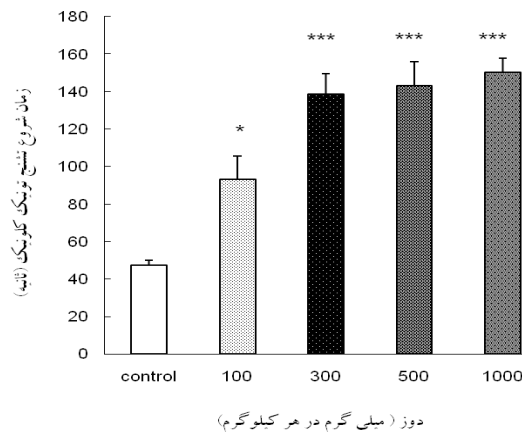
ریحان^۲ از خانواده نعنائیان^۳ است که در نواحی مختلف جهان شامل مناطق استوایی و زیر خط استوای آسیا، آفریقا، آمریکای جنوبی و مرکزی وجود دارد [۷] و در طب سنتی از آن برای درمان تب، گلودرد، احتقان و درد معده استفاده می‌کرده‌اند [۸]. اجزای پلی فنلی و آنتی‌اکسیدانی جداشده از ریحان شامل رزمارینیک اسید، P هیدروکسی بنزوئیک اسید، فرولیک اسید، گالیک اسید، P کوماریک اسید، کامپفرول، کاتچین، کوئرستین، کلوروژنیک اسید، کافیک اسید، سینامیک اسید و الازیک اسید است [۹]. نشان داده شده است که تشنج ممکن است منجر به آسیب‌های اکسیداتیو بافت مغزی شود [۱۰]. همچنین گزارش‌هایی اشاره می‌کند که در تشنجات و سمیت عصبی ناشی از PTZ، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد وجود دارد [۱۱] و تشنجات و صرع منجر به آسیب اکسیداتیو نواحی قشری و هیپوکمپ می‌گردد که به دنبال آن با اختلال یادگیری و حافظه همراه است [۱۰]. بنابراین با توجه به ترکیبات گوناگون موجود در برگ ریحان از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فلاونوئیدها و با توجه به اثرات ضد تشنجی گزارش شده از آنتی‌اکسیدان‌ها و فلاونوئیدها، در این مطالعه متفاوت از برخی مطالعات قبلی [۱۲] با دوزهای متفاوت عصاره، تفاوت زمانی بین تزریق عصاره و پنتیلن تترازول و دوز متفاوت پنتیلن تترازول به عنوان ماده تشنج‌زا به بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز بر تشنجات ناشی از PTZ پرداخته شد.

روش‌ها

عصاره‌گیری: برای تهیه عصاره از روش خیساندن استفاده شد. در این روش ابتدا ۵۰ گرم پودر برگ ریحان سبز را درون ظرف مناسب ریخته و ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد (۷۰ درصد اتانول و ۳۰ درصد آب مقطر) به آن اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در دستگاه shaker incubator قرار داده شد. سپس محتویات ظرف با استفاده از کیف بوخنر صاف و در ظرفی جمع‌آوری شد؛ محلول حاوی مواد مؤثر به بالون حجمی

4. Extension
5. Tukey

2. Ocimum Basilicum
3. Lamiaceae



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۱. نمودار دوز - پاسخ تزریق دوزهای گوناگون عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز بر شروع تشنجات میوکلونیک ناشی از تزریق داخل صفاقی PTZ از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)؛ برای تشخیص اختلاف بین گروه‌های گوناگون از آزمون توکی (Tukey) استفاده شد. $P < 0.05$ و $P < 0.001$ ***، مقایسه بین گروه‌های تزریق عصاره هیدروالکلی برگ سبز ریحان با گروه کنترل (سالین) $n=8$ Mean±SEM.

نتایج

الف: بررسی اثر عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز بر شروع تشنجات میوکلونیک ناشی از PTZ

در هر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز زمان شروع تشنجات تونیک - کلونیک را نسبت به گروه کنترل افزایش دادند که این افزایش در دوزهای ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم با $P < 0.001$ و در دوز ۱۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم با $P < 0.05$ معنی دار بود (تصویر شماره ۲).

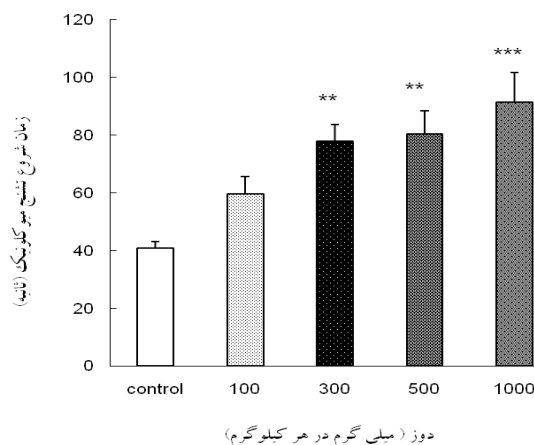
نتایج نشان داد که دوزهای ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز نسبت به گروه کنترل، زمان شروع تشنجات میوکلونیک را افزایش دادند که این افزایش در دوزهای ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم با $P < 0.001$ معنی دار بود (تصویر شماره ۱).

ج: بررسی اثر عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز بر میزان مرگومیر ۲۴ ساعته ناشی از PTZ

ب: بررسی اثر عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز بر شروع تشنجات تونیک - کلونیک ناشی از PTZ

بررسی‌ها کاهش میزان مرگومیر ۲۴ ساعته را در دوزهای ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز نسبت به گروه کنترل نشان داد. کاهش مرگومیر ۲۴ ساعته موش‌ها در ۱۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم ۳۷/۵ درصد، در دوزهای ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم ۸۷/۵ درصد و در دوز ۱۰۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم،

نتایج نشان داد که دوزهای ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۲. نمودار دوز - پاسخ تزریق دوزهای گوناگون عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز بر شروع تشنجات تونیک - کلونیک ناشی از تزریق داخل صفاقی PTZ از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)؛ برای تشخیص اختلاف بین گروه‌های گوناگون از آزمون توکی (Tukey) استفاده شد. $P < 0.01$ ** و $P < 0.001$ ***، مقایسه بین گروه‌های تزریق عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز با گروه کنترل (سالین) $n=8$ Mean±SEM.

جدول ۱. اثر سالیان، فنوباریتال و دوزهای گوناگون عصاره هیدروالکلی برگ سبز ریحان بر درصد مرگومیر ۲۴ ساعته موش؛ با استفاده از آزمون chi-square و سپس تست فیشر

گروه‌ها	دوز	مرگومیر ۲۴ ساعته (درصد)
کنترل منفی (سالیان)	۱۰ میلی‌لیتر در کیلوگرم	۱۰۰
کنترل مثبت (فنوباریتال)	۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	۰.۰۰۰
ریحان	۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	۶۳/۵
ریحان	۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	۱۲/۵***
ریحان	۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	۱۲/۵***
ریحان	۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم	۰.۰۰۰

*** $P < 0.001$ ، مقایسه بین گروه‌های تزریق فنوباریتال و عصاره هیدروالکلی برگ سبز ریحان با گروه کنترل (سالیان $n=8$) (Mean \pm SEM)

مجله دانشگاه علوم پزشکی کیلان

سرکوب تشنج می‌شوند. همچنین برخی از داروهای ضد تشنج مانند بنزودیازپین‌ها و والپروئیک اسید با افزایش GABA در داخل مغز موجب اثر ضد تشنجی می‌شوند [۱۷].

ترکیباتی که در مدل آزمایشگاهی تشنجات تونیک - کلونیک اثرگذار هستند، در کنترل تشنجات میوکلونیک و آپسنس انسانی نیز مؤثرند [۱۸]. در واقع، موادی که تشنجات ناشی از PTZ را مهار می‌کنند یا زمان نهفته ناشی از آن را طولانی می‌کنند به نوعی عوامل ضد تشنجی پیشنهاد می‌شوند [۱۹].

در این مطالعه، ما به جای استفاده از عصاره آبی گیاه از عصاره آبی - الکی آن استفاده کردیم تا بر اساس مطالعه جانا و همکاران مقادیر بیشتری از اجزای فعال را داشته باشیم [۲۰]. برای جذب بهتر داخل صفاقی، عصاره ۴۵ دقیقه قبل از تجویز ماده تشنج‌زای شیمیایی تزریق شد [۲۱]. بر اساس مطالعه ما، برگ ریحان سبز به صورت وابسته به دوز با افزایش زمان نهفته بروز تشنجات میوکلونیک و تونیک - کلونیک در مقایسه با گروه کنترل با اثر PTZ، مقابله کرد که در راستای نتایج به دست آمده از مطالعه مدرسی و پوریان زاده است [۱۲].

مطالعات نشان داده‌اند که بعضی از عوارض تشنج‌ها ممکن است ناشی از آسیب‌های اکسیداتیو وارده به بافت مغزی باشد [۱۰]. همچنین گزارش شده است که استرس اکسیداتیو نقش عمده‌ای در آسیب مغزی ناشی از صرع دارد. نشان داده شده است که در تشنجات ناشی از PTZ افزایش تولید (reactive oxygen species, ROS) وجود دارد [۱۱]. ROS تولید شده نقش مهمی در سمیت عصبی تشنجات ناشی از PTZ اعمال می‌کند [۲۲].

نشان داده شده است که تشنج‌های ناشی از PTZ موجب افزایش غلظت MDA و کاهش thiol کل در مغز حیوانات می‌شود. همچنین به دنبال تشنجات ناشی از PTZ افزایش میزان

۱۰۰ درصد بود. این کاهش مرگومیر در دوزهای ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم با $P < 0.001$ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (جدول شماره ۱).

فنوباریتال به طور کامل تشنجات میوکلونیک و تونیک کلونیک ناشی از PTZ را مهار کرد و مقدار کاهش مرگومیر در گروه کنترل مثبت در طی ۲۴ ساعت ۱۰۰ درصد بود.

از لحاظ وضعیت توکسیسیته برگ ریحان سبز، گزارش شده است که LD50 آن بالاتر از ۱۰۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم است و مطالعه انجام شده نشان داد که تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم، همه موش‌های بررسی شده زنده ماندند و هیچ وضعیت غیرطبیعی از لحاظ رفتار عمومی هم مشاهده نشد [۱۶].

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر دوزهای متفاوت عصاره هیدروالکلی برگ سبز ریحان به صورت وابسته به دوز موجب تأخیر در شروع تشنجات میوکلونیک و تونیک کلونیک و کاهش میزان مرگومیر ۲۴ ساعته ناشی از تشنج نسبت به گروه کنترل شد. دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از عصاره باعث بیشترین تأخیر در شروع تشنجات میوکلونیک و تونیک کلونیک شد و بیشترین اثر را در جلوگیری از مرگومیر ۲۴ ساعته در گروه‌های تیمار شده داشت.

تشنج القا شده به وسیله PTZ شایع‌ترین مدل برای غربالگری اثرات ضد تشنجی داروهای PTZ به عنوان یک آنتاگونیست گیرنده GABA که در غشای نورونی سیستم عصبی مرکزی قرار دارد، عمل می‌کند. GABA مهم‌ترین نوروترانسمیتر مهاری در تشنج به شمار می‌رود. در واقع PTZ با مهار انتقال پیام از این گیرنده موجب ایجاد تشنج می‌شود و داروهای ضد تشنجی موجود همچون دیاپام و فنوباریتال با اثر آگونیستی که بر این گیرنده دارند منجر به تقویت انتقال پیام از آن شده و موجب

گاما آمینوبوتیریک اسید نوع A در سیستم اعصاب مرکزی مرتبط است [۳۴].

همان طوری که PTZ تشنجات را از طریق مهار گیرنده‌های GABA_A القا می‌کند، فلاونوئیدها نیز به نوبه خود از طریق اثرگذاری بر گیرنده‌های (GABA)_A بر فعالیت سیستم اعصاب مرکزی تأثیر می‌گذارند [۳۵].

از جمله مواد فلاونوئیدی موجود در ریحان، روتین^۶ است. گزارش شده است که روتین اثرات ضد تشنجی را از طریق کمپلکس گیرنده GABA-A بنزودیازپین اعمال می‌کند. بنابراین احتمال داده می‌شود که روتین، لیگاندی برای گیرنده‌های بنزودیازپینی باشد [۳۶]. از طرفی دیگر در مطالعات *In vitro* نشان داده شده است که روتین اثرات مهاری بر گابا ترانس آمیناز (GABA-T) و سوکسینیک سمی آلدئید دهیدروژناز (SSADH) دارد. مهار هر دو آنزیم در بافت مغزی، میزان GABA را افزایش می‌دهد و ممکن است در اختلالات نورولوژیکی کاربردهای درمانی داشته باشد. همچنین GABA-T هدف مهمی برای بعضی داروهای مؤثر بر مغز شناخته شده است. بنابراین، عمل مهاری فلاونوئیدها بر این آنزیم‌ها ممکن است باعث بروز اثرات نوروفارماکولوژی آن‌ها شود [۳۷].

در عین حال نقش فلاونوئیدها برای مقابله با آسیب‌های سلولی ناشی از نوروتوکسین‌ها و عوامل التهاب‌زای مغزی نیز گزارش شده است [۳۸]. بنابراین، بخشی از اثرات ضد تشنجی و مقابله‌کننده با مرگ‌ومیر حیوانات با ریحان توجیه می‌شود.

از طرفی دیگر مطالعات، ارتباطی بین تشنج و میزان سایتوکین‌های التهابی در مغز نشان داده‌اند [۳۹]. به عبارت دیگر در اختلالات صرعی واکنش‌های التهابی در مغز رخ داده و تحریک‌پذیری نورونی و قابلیت نفوذ از سد خونی مغزی را افزایش و بقای سلولی را کاهش می‌دهند. اگرچه IL-1 و IL-6 و TNF α در مغز طبیعی به میزان پایینی بیان می‌شوند اما پس از القای تشنج میزان آن‌ها به سرعت بالا می‌رود [۴۰]. از آنجایی که نشان داده شده است که عوامل پلی فنولی نقش ضدالتهابی دارند [۴۱]، بنابراین احتمال داده می‌شود که بخشی از اثرات ضد تشنجی ریحان به علت عوامل فنولی موجود در آن باشد.

منوترپن‌ها از قبیل کاروون و لیمونن نیز از جمله ترکیباتی هستند که دارای خصوصیات حفاظتی در برابر اثرات تشنج‌زای PTZ هستند [۴۲، ۴۳]. بنابراین، احتمال دارد بخشی از اثرات ضد تشنجی ریحان به علت عوامل ترپن موجود در آن باشد.

در این مطالعه عصاره هیدروالکلی برگ ریحان سبز بر جلوگیری از تشنج ناشی از PTZ مؤثر بود. اصولاً داروهای مؤثر بر صرع کوچک، قادر به جلوگیری از تشنج در مدل PTZ هستند [۴۴]. بنابراین، به نظر می‌رسد که عصاره هیدروالکلی ریحان سبز

رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن در مغز حیوانات دچار تشنج گزارش شده است [۲۲]؛ ولی عصاره ریحان میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل گلوکاتایون، سوپراکساید دیسموتاز و کاتالاز را افزایش می‌دهد [۲۴] و در عین حال مانع افزایش غلظت MDA در بافت مغزی حیوانات دچار تشنج می‌شود [۲۵]. در عین حال نشان داده شده است که آنتی‌اکسیدان‌ها اثرات ضد تشنجی دارند [۲۶].

در مطالعه‌ای تجربی، به دنبال تجویز بخش اتیل استات ریحان، کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از ایسکمی نشان داده شد [۲۷]. در عین حال، در مطالعه انجام‌شده در موش صحرایی، لینالول به عنوان جزئی از اسانس روغن ریحان، مقدار گلوکاتایون را افزایش داد، در حالی که میزان پراکسیداسیون لیپیدی ایجادشده با اکریل آمید را در بافت مغزی کاهش داد [۲۸]. همچنین لینالول دارای اثر مهاری بر اتصال گلوتامات در قشر مغز موش صحرایی است. با توجه به نقش گیرنده ن-متیل - دی آسپاراتات گلوتامات در فعالیت تشنجی آن [۲۹]، انسداد این گیرنده به وسیله لینالول موجود در ریحان، ممکن است فعالیت ضد تشنجی آن را توجیه نماید.

از سویی دیگر، در مطالعه‌ای نشان داده شده است که لینالول اثر تعدیل‌کننده بر فعالیت سیستم گاباژیک دارد. شاید این موضوع نیز اثر ریحان را توجیه کند [۳۰].

مطالعات نشان داده‌اند که ریحان سطح بالایی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که این فعالیت به ترینوئیدها، پلی فنول‌ها و فلاونوئیدهایی مثل کوئرستین، کامپفرول و میریستین، تانین‌هایی مثل کاتچین و روغن اسانس مثل یوژنول و متیل چلویکول نسبت داده می‌شود [۹].

رزمارینیک اسید از جمله ترکیبات فنولی موجود در خانواده نعناعیان از جمله *Ocimum basilicum* است [۹]. اثرات درمانی متعددی از جمله اثرات ضدالتهابی، و تعدیل‌کننده فعالیت ایمنی [۳۱] از آن گزارش شده است. به نظر می‌رسد بخشی از اثرات ضد تشنجی ریحان مربوط به رزمارینیک اسید در آن باشد.

از طرفی نشان داده شده است که اپی ژنین موجود در ریحان به گیرنده‌های بنزودیازپینی متصل می‌شود [۳۲] و احتمالاً از این طریق موجب افزایش ورود کلر از راه کانال‌های کلری می‌گردد که شاید یکی از مکانیسم‌های احتمالی اثر ضد تشنجی ریحان برای مقابله با تشنجات ناشی از PTZ باشد.

فلاونوئیدها رده مهم ترکیبات طبیعی دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی هستند [۳۳]. از آنجایی که آنتی‌اکسیدان‌ها بر تشنجات ناشی از PTZ تأثیر می‌گذارند، ممکن است فلاونوئیدهای موجود در عصاره ریحان در اثر ضد تشنجی آن درگیر باشند [۲۶].

همچنین بخشی از فعالیت فلاونوئیدها با فعالیت گیرنده‌های

6. Rutin

در جلوگیری از علائم صرع کوچک مؤثر باشد.

در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این گیاه اثر بالقوه ضد تشنجی دارد و می‌تواند یک عامل کمک درمانی همراه سایر داروهای مرسوم ضد تشنج آپسنس به کار رود؛ گرچه مطالعات بیشتری برای روشن شدن مکانیسم دقیق اثرات آن مورد نیاز است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

در این مطالعه تمامی مراحل کار مطابق دستورالعمل اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی گیلان انجام شد (کد: IR.GUMS.REC.1394.608).

حامی مالی

این مقاله با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گیلان انجام شد.

مشارکت نویسندگان

انجام آزمایش‌ها، جمع‌آوری داده‌ها و نوشتن مقاله: آتنا رحیمی‌پور؛ طراحی آزمایش، آنالیز و بررسی داده‌ها، ویراستاری و نهایی‌سازی: محمد رستم‌پور.

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان در این مقاله تعارض منافع وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

لازم می‌دانیم از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه و همکاران محترم آن حوزه، صمیمانه تشکر و قدردانی نماییم. همچنین از جناب آقای دکتر علی سنبلی از بخش گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، برای تهیه عصاره گیاهی صمیمانه سپاس‌گزاری می‌شود.

References

- [1] McKeown MJ, McNamara JO. When do epileptic seizures really begin? *Neuron*. 2001; 30(1):1-3. [DOI:10.1016/S0896-6273(01)00253-7]
- [2] Xue-Ping W, Hai-Jiao W, Li-Na Z, Xu D, Ling L. Risk factors for drug-resistant epilepsy. A systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 2019; 98(30):e16402. [DOI:10.1097/MD.00000000000016402] [PMID] [PMCID]
- [3] Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005; 46(4):470-2. [DOI:10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x] [PMID]
- [4] Rosenberg EC, Tsien RW, Whalley BJ, Devinsky O. Cannabinoids and epilepsy. *Neurotherapeutics*. 2015; 12(4):747-68. [DOI:10.1007/s13311-015-0375-5] [PMID] [PMCID]
- [5] Quintans-Júnior LJ, Souza TT, Leite BS, Lessa NM, Bonjardim LR, Santos MR, et al. Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. *Phytomedicine*. 2008; 15(8):619-24. [DOI:10.1016/j.phymed.2007.09.018] [PMID]
- [6] Bienvenu E, Amabeoku GJ, Eagles PK, Scott G, Spring Field EP. Anticonvulsant activity of aqueous extract of *Leonotis Leonurus*. *Phytomedicine*. 2002; 9(3):217-23. [DOI:10.1078/0944-7113-00103] [PMID]
- [7] Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(11):3197-207. [DOI:10.1021/jf021038t] [PMID]
- [8] Omidbeigi R. [Production and processing of medicinal plants (Persian)]. 2th ed. Tehran: Astan'e Qods'e Razavi publication; 2000. <http://opac.nlai.ir/opac-prod/search/briefListSearch.do?command>
- [9] Abd El-Azim MH, Abdelgawad AA, El-Gerby M, Ali S, El-Mesallamy AM. Phenolic compounds and cytotoxic activities of methanol extract of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 2015; 7(4):182-5. [DOI:10.4172/1948-5948.1000202]
- [10] Mehla J, Reeta KH, Gupta P, Gupta YK. Protective effect of curcumin against seizures and cognitive impairment in a pentylenetetrazole-kindled epileptic rat model. *Life Sciences*. 2010; 87(19-22):596-603. [DOI:10.1016/j.lfs.2010.09.006] [PMID]
- [11] Hosseini M, Harandizadeh F, Niazamand S, Soukhtanloo M, Mahmoudabady M. Antioxidant effect of achillea wilhelmsii extract on pentylenetetrazole (seizure model)-induced oxidative brain damage in wistar rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2013; 57(4):418-24. [PMID]
- [12] Modaresi M, Pouriyanzadeh A. [Effect of *Ocimum basilicum* hydro alcoholic extract against pentylenetetrazole-induced seizure in mice (Persian)]. *Armaghane-danesh*. 2013; 18(8):615-21. <http://armaghanj.yums.ac.ir/article-1-457-en.html>
- [13] Keihanian F, Rostampour M, Saeidynia A, Elmieh AR. [Effect of *ruta graveolens* hydro-alcoholic extract on pentylenetetrazole-induced seizure in male mice (Persian)]. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2012; 14(4):30-6. [DOI:10.1055/s-0032-1321336]
- [14] Namvar S, Mirzae R. [Study of anticonvulsant effects of aqueous extract of *Thymus Vulgaris* on chemical kindling in male mice (Persian)]. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2015; 22(5):902-8. http://jsums.medsab.ac.ir/article_769.html?lang=en
- [15] Arzi A, Zahedi Asl S, Falahzadeh D. [Effect of hydro-alcoholic extract of *Thymus Vulgaris* in prevention of nicotine-induced seizure (Persian)]. *Journal of Ahvaz University of Medical Sciences*. 2003; (37):61-72. <https://www.sid.ir/fa/journal/View-Paper.aspx?id=492>
- [16] Pereira A, Carvalho MC, Lima LM, Caputo LRG, Ferreira LR, Fiorini JE, et al. Toxicity of a subchronic treatment with hydroalcoholic crude extract from *Solanum grandiflorum* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 89:97-9. [DOI:10.1016/S0378-8741(03)00266-6]
- [17] Weiss RF, Fintelmann V. *Herbal medicine*. 2th ed. New York: Thieme; 2000. <https://www.worldcat.org/title/herbal-medicine/oclc/44040405>
- [18] Nisar M, Khan I, Simjee SU, Gilani AH, Obaidullah, Perveen H. Anticonvulsant, analgesic and antipyretic activities of *Taxus wallichiana* zuc. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008; 116(3):490-4. [DOI:10.1016/j.jep.2007.12.021] [PMID]
- [19] Haruna AK. Depressant and anticonvulsant properties of the root decoction of *Afromosia taxiflora* (Leguminosae). *Phytotherapy Research*. 2000; 14(1):57-9. [DOI:10.1002/(SICI)1099-1573(200002)14:13.0.CO;2-V]
- [20] Jana S, Shekhawat GS. Phytochemical analysis and antibacterial screening of in vivo and in vitro extracts of Indian medicinal herb: *Anethum graveolens*. *Research Journal of Medicinal Plants*. 2010; 4(4):206-12. [DOI:10.3923/rjmp.2010.206.212]
- [21] Dhir A, Kulkarni SK. Rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor potentiates the anticonvulsant activity of tiagabine against pentylenetetrazol-induced convulsions in mice. *Inflammopharmacology*. 2006; 14(5-6):222-5. [DOI:10.1007/s10787-006-1535-3] [PMID]
- [22] Xie T, Wang WP, Mao ZF, Qu ZZ, Luan SQ, Jia LJ, et al. Effects of epigallocatechin-3-gallate on pentylenetetrazole-induced kindling, cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Neuroscience Letters*. 2012; 516(2):237-41. [DOI:10.1016/j.neulet.2012.04.001] [PMID]
- [23] Rosche J, Uhlmann C, Froscher W. cognitive deficits and psychiatric disorders in patients with new-onset epilepsy. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 2010; 78(1):18-26. [DOI:10.1055/s-0028-1109887] [PMID]
- [24] Muscat R, Willner P. Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: A methodological analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 1992; 16(4):507-17. [DOI:10.1016/S0149-7634(05)80192-7]
- [25] Khodabakhshi T, Beheshti F, Hosseini M, Mousavi SM, Rakhshandeh H, Sadeghnia HR, et al. Effect of *Ocimum basilicum*

- hydro-alcoholic extract on oxidative damage of brain tissue following seizures induced by pentylentetrazole in mice. *Physiol Pharmacol* 2017; 21(4):295-303. <http://eprints.thums.ac.ir/418/>
- [26] Gupta YK, Briyal S. Protective effect of vineatrol against kainic acid induced seizures, oxidative stress and on the expression of heat shock proteins in rats. *European Neuropsychopharmacology*. 2006; 16(2):85-91. [DOI:10.1016/j.euroneuro.2005.07.004] [PMID]
- [27] Bora KS, Arora S, Shri R. Role of *Ocimum basilicum* L. in prevention of ischemia and reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011; 137(3):1360-5. [DOI:10.1016/j.jep.2011.07.066] [PMID]
- [28] Mehri S, Meshki MA, Hosseinzadeh H. Linalool as a neuro-protective agent against acrylamide-induced neurotoxicity in wistar rats. *Drug and Chemical Toxicology*. 2015; 38(2):162-6. [DOI:10.3109/01480545.2014.919585] [PMID]
- [29] Elisabetsky E, Marschner J, Souza DO. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. *Neurochemical Research*. 1995; 20(4):461-5. [DOI:10.1007/BF00973103] [PMID]
- [30] Brum LF, Elisabetsky E, Souza D. Effects of linalool on [(3)H] MK801 and [(3)H] muscimol binding in mouse cortical membranes. *Phytotherapy Research*. 2001; 15(5):422-5. [DOI:10.1002/ptr.973] [PMID]
- [31] Shakeri F, Eftekhar N, Roshan NM, Rezaee R, Moghimi A, Boskabady MH. Rosmarinic acid affects immunological and inflammatory mediator levels and restores lung pathological features in asthmatic rats. *Allergologia et Immunopathologia*. 2019; 47(1):16-23. [DOI:10.1016/j.aller.2018.04.004] [PMID]
- [32] Dirscherl K, Karlstetter M, Ebert S, Kraus D, Hlawatsch J, Walczak Y, et al. Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. *Journal of Neuroinflammation*. 2010; 7:3. [DOI:10.1186/1742-2094-7-3] [PMID] [PMCID]
- [33] Pages N, Maurois P, Delplanque B, Bac P, Stables JP, Tamariz J, et al. Activities of α -asarone in various animal seizure models and in biochemical assays might be essentially accounted for by antioxidant properties. *Neuroscience Research*. 2010; 68(4):337-44. [DOI:10.1016/j.neures.2010.08.011] [PMID]
- [34] Abbasi E, Nassiri-Asl M, Shafeei M, Sheikhi M. Neuroprotective effects of vitexin, a flavonoid, on pentylene-tetrazole-induced seizure in rats. *Chemical Biology & Drug Design*. 2012; 80(2):274-8. [DOI:10.1111/j.1747-0285.2012.01400.x] [PMID]
- [35] Naseer MI, Shupeng L, Kim MO. Maternal epi-leptic seizure induced by pentylentetrazol: Apoptotic neurodegeneration and decreased GABAB1 receptor expression in prenatal rat brain. *Molecular Brain*. 2009; 2:20. [DOI:10.1186/1756-6606-2-20] [PMID] [PMCID]
- [36] Nassiri-Asl M, Shariati-Rad S, Zamansoltani F. Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2008; 32(4):989-93. [DOI:10.1016/j.pnpbp.2008.01.011] [PMID]
- [37] Tao YH, Jiang DY, Xu HB, Yang XL. Inhibitory effect of *Erigeron breviscapus* extract and its flavonoid components on GABA shunt enzymes. *Phytomedicine*. 2008; 15(1-2):92-7. [DOI:10.1016/j.phymed.2007.06.009] [PMID]
- [38] Spencer JPE. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *British Journal of Nutrition*. 2010; 104(S3):S40-7. [DOI:10.1017/S0007114510003934] [PMID]
- [39] Auvin S, Shin D, Mazarati A, Nakagawa J, Miyamoto J, Sankar R. Inflammation exacerbates seizure-induced injury in the immature brain. *Epilepsia*. 2007; 48(S5):27-34. [DOI:10.1111/j.1528-1167.2007.01286.x] [PMID]
- [40] Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: Experimental and clinical evidence. *Epilepsia*. 2005; 46(11):1724-43. [DOI:10.1111/j.1528-1167.2005.00298.x] [PMID]
- [41] Chen BT, Li WX, He RR, Li YF, Tsoi B, Zhai YJ, et al. Anti-inflammatory effects of polyphenols-rich extract from tea (*Camellia sinensis*) flowers in acute and chronic mice models. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012; 2012:537923. [DOI:10.1155/2012/537923] [PMID] [PMCID]
- [42] Sayyah M, Moaied S, Kamalinejad M. Anticonvulsant activity of *Heracleum* seed. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 98(1-2):209-11. [DOI:10.1016/j.jep.2004.12.026] [PMID]
- [43] De Sousa DR, De Faras Nobrega FF, De Almedia RN. Influence of chirality of (R)-(-) and (S)-(+)-carvone in the Central Nervous System: A comparative study. *Chirality*. 2007; 19(4):264-8. [DOI:10.1002/chir.20379] [PMID]
- [44] Vogel HG, Vogel WH. Drug discovery and evaluation: Pharmacological assays. 1st ed. Germany: Springer; 1997. [DOI:10.1007/978-3-662-03333-3]

This Page Intentionally Left Blank