

Research Paper

Improving Effect of Ethyl Acetate Fraction of Tanacetum Parthenium Against Brain Oxidative Damage in Pentylene-tetrazole-Induced Seizure Model in Mice



Fereshteh Asgharzadeh¹ , Mahmoud Hosseini² , Farimah Beheshti^{3,4} , Hassan Rakhshandeh¹ , Somaieh Mansouri⁵, *Akbar Anaeigoudari⁶

1. Medicinal Plants Pharmacology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
2. Psychiatric and Behavioral Sciences Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
3. Applied Biomedical Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
4. Department of Physiology, School of Medicine, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran.
5. Department of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
6. Department of Physiology, School of Medicine, Jiroft University of Medical Sciences, Jiroft, Iran.



Citation Asgharzadeh F, Hosseini M, Beheshti F, Rakhshandeh H, Mansouri S, Anaeigoudari A. [Improving Effect of Ethyl Acetate Fraction of Tanacetum Parthenium Against Brain Oxidative Damage in Pentylene-tetrazole-Induced Seizure Model in Mice (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2021; 27(4):486-501. <https://doi.org/10.32598/hms.27.4.3491.1>

doi <https://doi.org/10.32598/hms.27.4.3491.1>



Received: 29 Oct 2020
Accepted: 02 Feb 2021
Available Online: 01 Oct 2021

Key words:

Cortex, Hippocampus, Tanacetum parthenium, Oxidative stress, Pentylene-tetrazole

ABSTRACT

Aims Oxidative stress plays an essential role in the pathogenesis of seizures. In this study, we investigated the effect of ethyl acetate fraction of Tanacetum parthenium against oxidative brain damage in a pentylene-tetrazole (PTZ)-induced seizure model in mice.

Methods & Materials In this experimental study, mice were divided into 6 groups: control, PTZ, and 4 other groups that, besides PTZ, received 25, 50, 100, and 200 mg/kg of the fraction. PTZ (100 mg/kg) and a fraction (30 min before PTZ) were administered intraperitoneally for 3 weeks. Delay in the onset of the minimal clonic seizure (MCS), generalized tonic-clonic seizure (GTCS), and the level of oxidative stress indexes in cortical and hippocampal tissues were measured.

Findings Pretreatment with fraction resulted in postponing the onset seizures in the Fraction+PTZ groups compared to the PTZ group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$). In addition, all doses of ethyl acetate fraction decreased the concentration of malondialdehyde (MDA) and increased the level of total thiol groups and the activity of superoxide dismutase and catalase enzymes in the brain tissues compared to the PTZ group.

Conclusion Ethyl acetate fraction of Tanacetum parthenium attenuated PTZ-stimulated seizures through improving brain tissue oxidative stress.

English Version

1. Introduction

E

pilepsy is one of the most common neurological disorders that affect many people worldwide [1]. Epilepsy is characterized by reversible spontaneous seizures

caused by an imbalance between irritability and inhibition of the brain with a tendency toward uncontrolled irritability [2]. Epilepsy can be divided into two main types: 1) epilepsy of the middle part of the temporal lobe, which affects the hippocampus, parahippocampus, and amygdala, 2) lateral lobe epilepsy, which affects the neocortex [3]. Experimental models of epilepsy induction were used to study the pathophysiology of epileptic seizures and

* Corresponding Author:

Akbar Anaeigoudari, PhD.

Address: Department of Physiology, School of Medicine, Jiroft University of Medical Sciences, Jiroft, Iran.

Tel: +98 (34) 43317902

E-mail: anaeiga317@gmail.com

play an essential role in our better understanding of the molecular mechanisms associated with seizure progression [4]. One of the animal models for studying epileptic seizures is the model in which Pentylentetrazole (PTZ) is used [5]. Increased production of free radicals plays an important role in the pathogenesis of a wide range of neurological disorders, including epilepsy [6]. The hypersensitivity of the brain to oxidative damage highlights the importance of knowing the role of oxidative stress in the pathogenesis of seizures and epilepsy [7]. Scientific evidence also suggests an association between long-term seizures and oxidative damage to lipids, DNA, and proteins [8]. In addition, neurotoxicity induced by some neurotransmitters, including glutamate, is one of the main mechanisms of neurological seizure disorder [9]. For example, researchers have reported that neurotoxicity due to glutamate overactivity leads to overproduction of nitric oxide by the enzyme nitric oxide synthase, resulting in neuronal damage induced by oxidative stress [10]. Scientific evidence also shows that oxidative damage to biomolecules plays an essential role in neuronal hyperstimulation, neuronal damage, and induction of seizures [11]. The results of recent studies confirm that dysfunction of mitochondria as organs affecting oxidative phosphorylation and acute oxidative stress can predispose the brain to epileptic seizures [12]. Scientific reports also indicate the role of oxidative stress in neuronal damage in a model of epilepsy induced by PTZ [13].

Previous experimental studies show that natural compounds in plant extracts are good sources for relieving seizures and reducing their effects in epileptic patients [14]. *Tanacetum parthenium* belongs to the Cassian family and is widely grown worldwide [15]. Parthenolide is one of the most important compounds in the extract of this plant with anti-migraine properties [16]. In addition, the extract of this plant is used in traditional medicine to reduce fever, relieve asthma, and reduce inflammation [17]. Scientific results show that the polyphenolic compounds and flavonoids in the extract of *Tanacetum parthenium* have anti-oxidant properties [18]. The researchers reported that the alcoholic extract of this plant has anti-oxidant activity against diphenyl-2-picrylhydrazyl by neutralizing free radicals [19]. The protective effects of this plant extract against kidney damage caused by carbon tetrachloride by improving the state of oxidative stress have also been documented [15]. Also, the anti-oxidant effects of this plant extract against liver damage caused by excessive production of free radicals along with lowering cholesterol and triglycerides have been shown [20]. The results of our previous study showed that the moderate dose (100 mg/kg) of hydroalcoholic extract of *Tanacetum parthenium* had the best effect against PTZ-induced seizures in mice

by decreasing malondialdehyde levels and increasing levels of total thiols and the anti-oxidant enzymes superoxide dismutase and catalase. In contrast, the n-butanol and aqueous fractions could not improve the oxidative brain damage caused by PTZ-induced seizures [21]. Therefore, compounds other than soluble compounds in n-butanol and aqueous solvents of this plant may have a role in reducing oxidative brain damage caused by pentylentetrazole-induced seizures. Therefore, to clarify the issue in this study, the effects of ethyl acetate fraction of *Tanacetum parthenium* plant against oxidative brain damage in a model of PTZ-induced seizures in rats were investigated.

2. Materials and Methods

Preparation of Ethyl Acetate Fraction

To prepare the ethyl acetate fraction, 50 g of plant powder was dissolved in 300 mL of ethanol and extracted using an extractor. Next, 10 g of dried ethanolic extract was dissolved in 50 mL of distilled water and poured into a decanter. Then 50 mL of n-butanol solvent was added to it. In this stage, two phases are formed; the upper phase contains soluble compounds in butanol. After separating the two phases from each other, to prepare the ethyl acetate fraction, the lower phase of the previous step was poured into the decanter, and 50 mL of ethyl acetate solvent was added to it. Two phases are formed again, the upper phase containing ethyl acetate-soluble compounds. After separation, the resulting solution was dried by an incubator and stored for use [21].

Animals and Groups

This study is an experimental study in which 60 male mice weighing 30 ± 5 g were randomly divided into 6 groups of 10 as follows: 1) control group, 2) pentylentetrazole (PTZ) group, 3) PTZ + fraction with a dose of 25 mg/kg (Fraction25 + PTZ), 4) PTZ + fraction with a dose of 50 mg/kg (Fraction50 + PTZ), 5) PTZ + fraction with a dose of 100 mg/kg (Fraction100 + PTZ), and 6) PTZ + fraction at a dose of 200 mg/kg (Fraction200 + PTZ). The ethyl acetate fraction was injected intraperitoneally for three weeks 30 minutes before pentylentetrazole. Animals in the control group also received saline. The animals were kept under standard conditions (temperature 22°C-24°C, light period 12 hours of light and 12 hours of darkness, humidity 50%, and adequate access to water and food). The dose of drugs in this study was selected based on previous studies [21]. Before the beginning of the experiments, the proposal of this plan was presented in the Ethics Committee of Mashhad University of Medical Sciences. The ethical code (IR.MUMS.

fm.REC.1397.134) belongs to the Ethics Committee of Mashhad University of Medical Sciences.

Induction of seizures by pentylenetetrazole

To induce seizures in mice, pentylenetetrazole (100 mg/kg body weight) was injected intraperitoneally [22, 23]. The animals were then placed in a Plexiglas box, and their convulsive behaviors were assessed for 60 min based on the Becker 5-point method: stage 0, no response; stage 1, face and ear muscle impulses; stage 2, myoclonic impulses without standing on two legs; stage 3, myoclonic impulses with standing on two legs; stage 4, falling to one side and tonic-clonic seizures; and stage 5, falling on the back and generalized tonic-clonic seizures. If stages 4 and 5 were observed, the animal was considered convulsive [24]. Acceleration of the onset of clonic seizures (minimal clonic seizure [MCS]) and generalized tonic-clonic seizures (GTCS) were considered the criteria of seizure severity. After behavioral experiments, the animals were killed, their brains were removed, and the hippocampal and cortical tissues were isolated. Brain tissues were homogenized in 1 mL of phosphate buffer. The homogenized tissue was then centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes [25]. Finally, the supernatant was transferred to the microtube and stored in a freezer at -80°C to measure biochemical indicators of oxidative stress.

Measurement of malondialdehyde (MDA) concentration

To measure malondialdehyde (MDA), 1 mL of the sample was added to 2 mL of a solution containing thiobarbituric acid, trichloroacetic acid, and hydrochloric acid. The mixture was boiled in a warm water bath for 40 min. After reaching room temperature, the solution was centrifuged at 1000 rpm for 10 min. The absorbance of the samples was then read at 532 nm [25].

Measuring the amount of total thiol groups

Reagent 2-nitrobenzoic acid (DTNB) was used to measure the concentration of total thiol groups in brain tissues. About 25 μL of this reagent was mixed with 50 μL of Tris, 420 μL of water, and 5 μL of samples. The sufficient volume of the mixture was then poured into the cuvette, and the absorption rate was read at wavelengths of 412 nm. Also, 495 μL of water was used as Blank [26].

Measurement of Superoxide Dismutase (SOD) enzyme activity

Superoxide Dismutase (SOD) activity was measured in brain tissues using a calorimetric method. In this method, the autooxidation of pyrogallol leads to superoxide production. The reduction of tetrazolium molecules by superoxide produces the red substance formazan with an absorption of 560 nm. In the presence of the enzyme SOD, superoxide decomposes into hydrogen peroxide and oxygen, and a decrease in the production of the red formazan complex occurs [27].

Measurement of Catalase (CAT) enzyme activity

The activity of the enzyme catalase in brain tissues was based on the method in which hydrogen peroxide is broken down into water and oxygen by this enzyme. Briefly, a mixture of potassium phosphate, hydrogen peroxide, and samples was prepared. The absorbance was then read at 240 nm. The decrease in absorption indicates a high level of enzyme catalase activity [27].

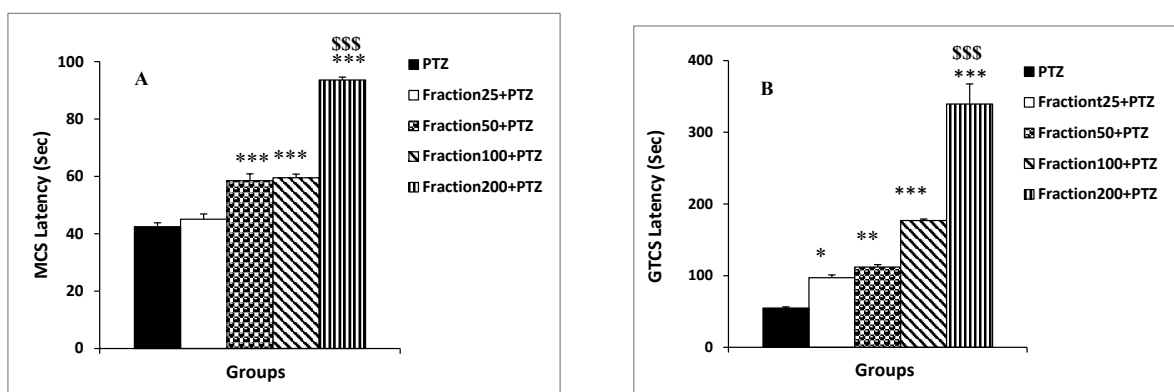
Statistical analysis

The obtained data were analyzed by SPSSv. 20. After ensuring the normality of behavioral and biochemical data by the Kolmogorov-Smirnov test, 1-way analysis of variance, and Tukey post hoc test was used to analyze and compare groups. $P < 0.05$ was considered to determine the significance and comparison between groups.

3. Results

The effect of ethyl acetate fraction of tanacetum parthenium on seizures induced by PTZ

According to the results, intraperitoneal injection of PTZ-induced generalized clonic and tonic-clonic seizures in mice. Pretreatment with ethyl acetate fraction of Tanacetum parthenium at doses of 50, 100, and 200 mg/kg significantly delayed the onset of clonic seizures in Fraction50 + PTZ, Fraction100 + PTZ, and Fraction200 + PTZ groups compared to the PTZ group ($P < 0.001$). In addition, the delay in the onset of clonic seizures was significantly higher in the group treated with 200 mg/kg compared to the groups treated with doses of 25, 50, and 100 mg ($P < 0.001$) (Figure 1A). The results also showed that injection of all four doses of ethyl acetate fraction caused a significant delay in the onset of generalized tonic-clonic seizures in the groups treated with the fraction compared to the group injected with PTZ alone ($P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$). Also, the delay in the onset of generalized



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 1. Effect of different doses of ethyl acetate fraction of tanacetum parthenium on delayed onset of clonic (A) and generalized tonic-clonic (B) PTZ injection

Data are presented as Mean±Standard Deviation. The number of mice in each group was 10. **P<0.05, *P<0.01, and ***P<0.001 compared with pentylenetetrazole group. \$\$\$P<0.001 compared to Fraction25 + PTZ, Fraction + PTZ50 and Fraction + PTZ100 groups.

tonic-clonic seizures in the Fraction200 + PTZ group was significantly higher compared to other groups treated with the fraction (P<0.001) (Figure 1B).

Effect of ethyl acetate fraction of tanacetum parthenium on oxidative stress parameters

As shown in Figures 2-A and 3-A, the amount of malondialdehyde as an indicator of oxidative stress due to lipid peroxidation in hippocampal and cortical tissues in animals treated with PTZ was significantly higher than in the control group (P<0.001). Injection of all four doses of ethyl acetate fraction of Tanacetum parthenium significantly reduced the concentration of this oxidative stress index in Fraction25 + PTZ, Fraction 50 + PTZ, Fraction100 + PTZ, and Fraction200 + PTZ groups compared to PTZ group (P<0.05 to P<0.001).

The results also showed that the level of total thiol groups in brain tissues in animals of the PTZ group was significantly lower than the control group (P<0.001). Fraction injection resulted in a significant increase in the content of total thiol groups in hippocampal and cortical tissues in Fraction25 + PTZ, Fraction50 + PTZ, Fraction100 + PTZ, and Fraction200 + PTZ groups compared to the PTZ group (P<0.05 and P<0.01) (Figures 2B and 3B).

Evaluation of the activity of SOD and catalase enzymes in brain tissues also showed that the activity of these anti-oxidant enzymes in the PTZ group was significantly lower than in the control group (P<0.05 and P<0.01). According to the results, injection of plant ethyl acetate fraction significantly increased the activity of these enzymes in hippocampal and cortical tissues in Fraction50 + PTZ,

Fraction100 + PTZ, and Fraction200 + PTZ groups compared to the PTZ group (P<0.05 and P<0.01) (Figures 2C & D; 3C and 3D).

4. Discussion

In the current study, intraperitoneal injection of Pentylentetrazole (PTZ) resulted in severe neuronal depletion with accelerated onset of colonized seizures and generalized tonic-clonic seizures. According to scientific reports, oxidative and nitrous stress plays a significant role in the pathophysiology of seizures [28]. Oxidative and nitrous stress is caused by an imbalance between the production of reactive oxygen and nitrogen species and the reduction of the capacity of the endogenous anti-oxidant system to eliminate free radicals [29]. The brain is very sensitive to oxidative stress and nitrous stress due to its high metabolic activity [30]. Overproduction of reactive oxygen and nitrogen species can increase neuronal excitability and neuronal death through various mechanisms, including damage to neurotransmitter receptors and ion channels [31]. In animal models, seizures induced by kainic acid [32] and PTZ [33] also increase oxidative stress and neuronal death. The current study results also show high concentrations of malondialdehyde, low levels of total thiol groups, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase activity in hippocampal and cortical tissues in the PTZ-treated group compared with the control group. Based on these results, it appears that the high neuronal excitability observed in the PTZ group compared to the control group was due to the induction of oxidative brain damage by PTZ.

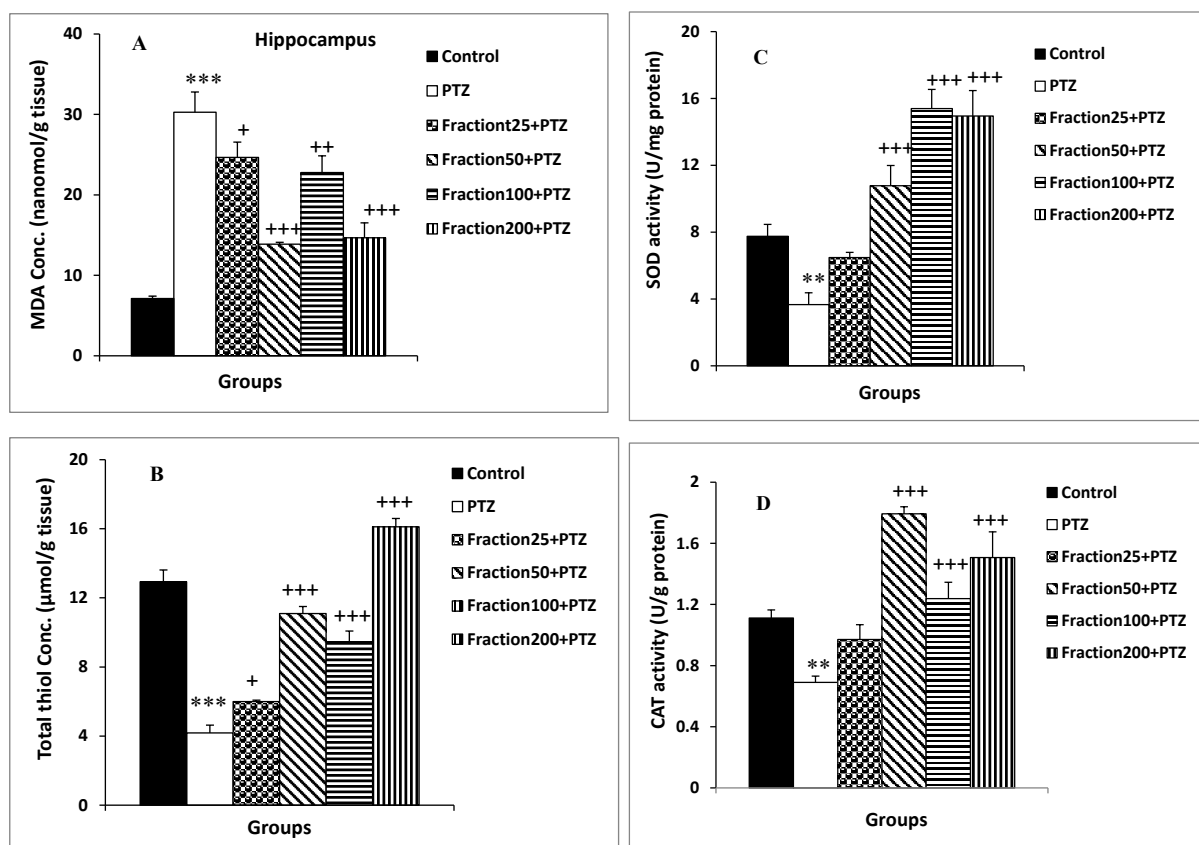


Figure 2. Effect of different doses of ethyl acetate fraction of tanacetum parthenium on malondialdehyde concentration (A), total thiol groups (B), superoxide dismutase (SOD), (C) and catalase (CAT) (D) in the hippocampal tissue of the brain

Data are presented as mean \pm standard deviation. The number of mice in each group was 10. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to the control group. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, + $P < 0.01$, and +++ $P < 0.001$ compared to the pentylenetetrazole (PTZ) group.

Tanacetum parthenium is one of the plants used in traditional medicine that its anti-asthmatic, anti-fever, anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-migraine effects have been studied and approved [15, 20]. Scientific evidence has shown that the use of this plant improves the frequency and severity of migraine headaches in children. This effect has been attributed to its reducing serotonin release and attenuating inflammatory responses [34]. In the PTZ-induced epileptic model, delay in the onset of clonic seizures and generalized tonic-clonic seizures are considered important indicators of seizure severity [22]. According to the current study results, pretreatment with ethyl acetate fraction of Tanacetum parthenium reduced the severity of seizures caused by PTZ injection. Delay in the onset of clonic and tonic-clonic seizures in the groups treated with fractions of this plant compared to the group treated with PTZ confirms this finding.

Scientific evidence indicates the critical role of anti-oxidant compounds in cell defense against reactive oxygen

and nitrogen species [35, 36]. Researchers have reported that anti-oxidant compounds, including vitamin E, can reduce the production of oxidative stress indicators and weaken seizure frequency [37]. In addition, recent studies have shown that compounds that increase glutathione levels protect the brain against oxidative stress, reduce epileptic seizures, prevent neuronal death, and improve cognitive impairment [31]. Lipid peroxidation is one of the important indicators of oxidative stress, and free radical scavenging is also an important anti-oxidant mechanism in inhibiting lipid peroxidation and malondialdehyde production [38]. The results of studies show that the methanolic extract of Tanacetum parthenium could improve kidney damage caused by carbon tetrachloride by reducing oxidative stress. This effect was accompanied by a decrease in the level of malondialdehyde and an increase in the level of anti-oxidant enzymes from superoxide dismutase and glutathione peroxidase in kidney tissue [15]. Also, the hepatoprotective effect of methanolic extract of this plant has been documented by increasing

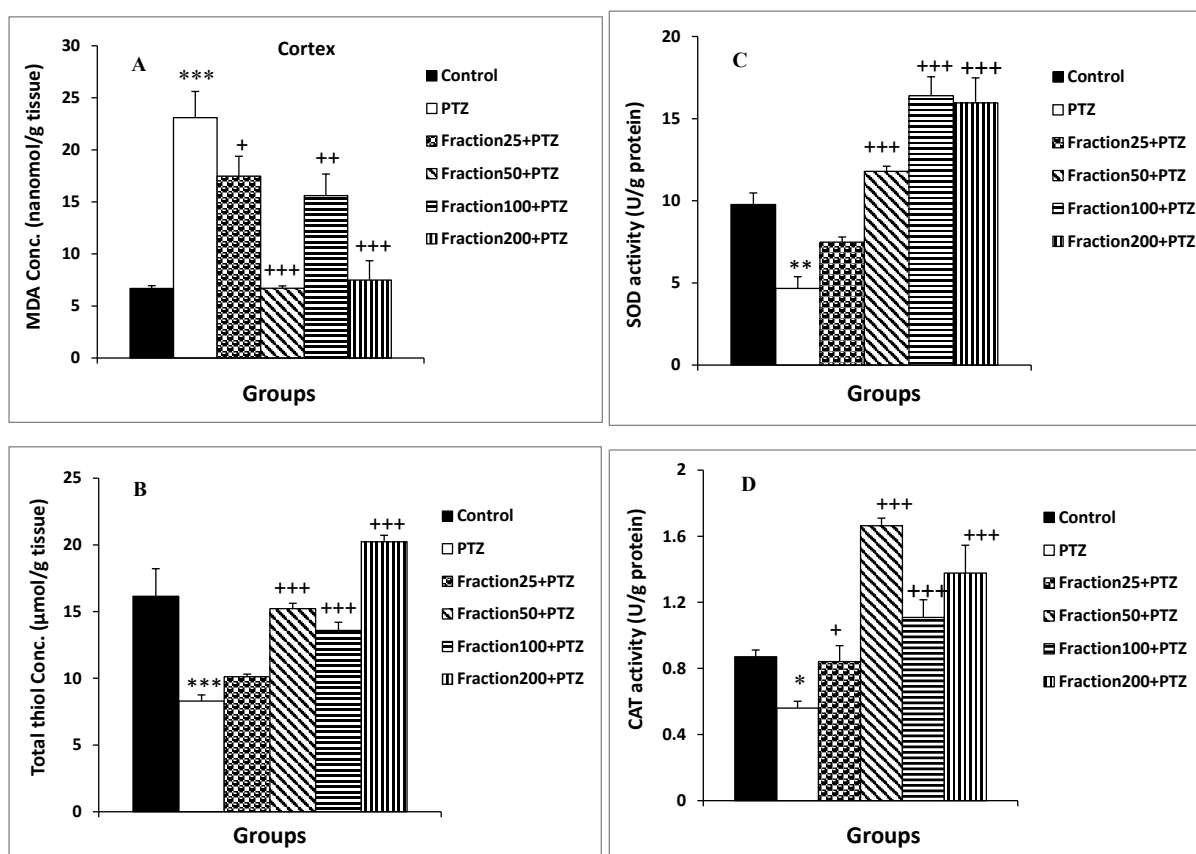


Figure 3. Effect of different doses of ethyl acetate fraction of tanacetum parthenium on malondialdehyde concentration (A), total thiol groups (B), Superoxide Dismutase (SOD) (C) and Catalase (CAT) (D) in the cortical tissue of the brain

Data are presented as Mean±Standard Deviation. The number of mice in each group was 10. ** $P<0.05$, * $P<0.01$ and *** $P<0.001$ compared with the control group. ++ $P<0.05$, + $P<0.01$, and +++ $P<0.001$ compared to the Pentylene tetrazole (PTZ) group.

the levels of glutathione peroxidase and superoxide dismutase enzymes [38]. In addition, in our previous study, the effect of n-butanol and aqueous fractions of *Tanacetum parthenium* on oxidative damage caused by PTZ-induced seizures was studied. Based on the behavioral results, both fractions could delay the onset of tonic and tonic-clonic seizures. However, based on biochemical results, these two fractions could not improve the oxidative damage caused by an injection of pentylene tetrazole in brain tissue [21]. In the current study, the effect of the ethyl acetate fraction of this plant was investigated. The results showed that, in addition to increasing the delay in the onset of seizures, the ethyl acetate fraction of the plant could also improve the oxidative stress situation caused by PTZ in brain tissue.

According to the results, the level of malondialdehyde in brain tissue decreased while the level of total thiol groups and the activity of catalase and superoxide dismutase increased. Flavonoids are among the plant com-

pounds that can be separated by ethyl acetate, which have anti-inflammatory and anti-oxidant properties [39]. The researchers reported that the flavonoid-rich ethyl acetate fraction of *Acacia hydaspica* could protect kidney tissue from oxidative damage caused by the anti-cancer compound doxorubicin [40]. According to these reports, it is possible that in the current study, flavonoid compounds in the ethyl acetate fraction of *Tanacetum parthenium* plant against oxidative brain damage in PTZ-induced seizures were involved. Still, this issue needs further study in the future. Finally, it is suggested that the effect of the ethyl acetate fraction of *Tanacetum parthenium* on neuronal death due to seizures induced by PTZ be investigated in future studies. In addition, it is suggested that the effects of parthenolide extracted from the *Tanacetum parthenium* plant on seizures be studied.

In summary, the ethyl acetate fraction of *Tanacetum parthenium*, like its n-butanol and aqueous fractions, reduced PTZ-stimulated seizures. According to the results,

the ethyl acetate fraction, unlike the other two fractions, improved the state of oxidative stress caused by seizures stimulated by pentylenetetrazole in brain tissue.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The current research has ethically approved the ethical committee of the Vice Chancellor for Research and Technology of Mashhad University of Medical Sciences (License number: IR.MUMS.fm.REC.1397.134)

Funding

The research was funded by the Vice-Chancellor for Research and Technology of Mashhad University of Medical Sciences.

Authors' contributions

All authors equally contributed to preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors sincerely thank the Vice Chancellor for Research of Mashhad University of Medical Sciences for providing financial facilities for this project.

مقاله پژوهشی

اثر بهبوددهنده فراکسیون ایتیل استات گیاه بابونه چشم‌گاو بر آسیب اکسیداتیو مغز در مدل تشنج ناشی از پنتیلین تترازول در موش

فرشته اصغرزاده^۱، محمود حسینی^۲، فریماه بهشتی^{۳،۴}، حسن رخشنده^{۱،۵}، سمیه منصور^{۱،۵}، اکبر آنائی گودری^{۱،۵}

۱. مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۲. مرکز تحقیقات روان پزشکی و علوم رفتاری، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۳. مرکز تحقیقات کاربردی زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۴. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران.
۵. گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۶. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جیرفت، جیرفت، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۰۸ آبان ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۱۴ بهمن ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۰۱ مهر ۱۴۰۰

اهداف: استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز تشنج دارد. در این پژوهش اثر فراکسیون ایتیل استات گیاه بابونه چشم‌گاو بر آسیب اکسیداتیو مغز در مدل تشنج ناشی از پنتیلین تترازول در موش بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، موش‌های سوری در ۶ گروه توزیع شدند: ۱. گروه کنترل، ۲. گروه پنتیلین تترازول، ۳-۶. گروه‌های پنتیلین تترازول + فراکسیون که حیوانات چهار گروه اخیر علاوه بر پنتیلین تترازول، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم از فراکسیون را دریافت کردند. پنتیلین تترازول (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و فراکسیون (۳۰ دقیقه قبل از پنتیلین تترازول) به مدت ۳ هفته و داخل صفاقی تزریق شدند. تأخیر در شروع تشنج‌های کلونیک، تونیک کلونیک ژنرالیزه و سطح شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت‌های قشر مغز و هیپوکامپ اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: پیش‌درمانی با فراکسیون ایتیل استات باعث تأخیر در شروع تشنج‌ها در گروه‌های فراکسیون + پنتیلین تترازول در مقایسه با گروه پنتیلین تترازول شد ($P < 0/05$ ، $P < 0/01$ و $P < 0/001$). همه دُزهای فراکسیون ایتیل استات باعث کاهش غلظت مالون دی‌آلدهید و افزایش سطح گروه‌های تام تیول و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بافت‌های مغز در گروه‌های فراکسیون + پنتیلین تترازول در مقایسه با گروه پنتیلین تترازول شد ($P < 0/05$ ، $P < 0/01$ و $P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: فراکسیون ایتیل استات گیاه بابونه چشم‌گاو باعث تضعیف تشنج‌های تحریک‌شده به وسیله پنتیلین تترازول از طریق بهبود استرس اکسیداتیو در بافت مغز شد.

کلیدواژه‌ها:

قشر مغز، هیپوکامپ، بابونه چشم‌گاو، استرس اکسیداتیو، پنتیلین تترازول

مقدمه

جانبی، نئوکورتکس را درگیر می‌کند [۳]. مدل‌های تجربی القا صرع که برای بررسی پاتوفیزیولوژی تشنج‌های صرعی استفاده می‌شوند، نقش مهمی در درک بهتر از مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با پیشرفت تشنج دارند [۴]. یکی از مدل‌های حیوانی برای مطالعه تشنج‌های صرعی، مدلی است که در آن از پنتیلین تترازول^۱ استفاده می‌شود [۵]. افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، نقش مهمی در بیماری‌زایی^۲ طیف وسیعی از اختلالات نورونی،

صرع یکی از رایج‌ترین اختلالات نورولوژیک است که تعداد زیادی از مردم را در سراسر دنیا متأثر می‌کند [۱]. مشخصه صرع، حملات تشنجی ناخواسته و برگشت‌پذیر ناشی از عدم تعادل میان تحریک‌پذیری و مهار مغزی با تمایل به سمت تحریک‌پذیری کنترل‌نشده است [۲]. صرع به دو نوع عمده تقسیم می‌شود: ۱. صرع بخش میانی لوب تمپورال، نواحی هیپوکامپ، شکنج پاره‌هیپوکامپ و آمیگدال را درگیر می‌کند، ۲. صرع لوب

1. PTZ

2. Pathogenesis

* نویسنده مسئول:

اکبر آنائی گودری

نشانی: گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جیرفت، جیرفت، ایران.

تلفن: ۳۴۳۱۷۹۰۲ (۳۴) ۹۸+

پست الکترونیکی: Anaega317@gmail.com

با تشنج‌های القاشده به وسیله پنتیلین تترازول در موش‌های سوری از طریق کاهش سطح مالون دی‌آلدئید^۷ و افزایش سطح گروه‌های تام تیول و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکساید دیسموتاز و کاتالاز بود، در حالی که فراکسیون‌های ان- بوتانول و آبی آن، نتوانستند باعث بهبود آسیب اکسیداتیو مغزی ناشی از تشنج‌های القاشده به وسیله پنتیلین تترازول شوند [۲۱]. احتمال داده می‌شود در کاهش آسیب اکسیداتیو مغزی ناشی از تشنج‌های القاشده به وسیله پنتیلین تترازول، ترکیبات غیر از ترکیبات قابل حل در حلال‌های ان بوتانول و آبی این گیاه نقش داشته باشند. بنابراین برای روشن شدن موضوع، در مدل تشنج القاشده به وسیله پنتیلین تترازول در موش، اثرات فراکسیون اتیل استات گیاه بابونه چشم‌گاوی بر ضد آسیب اکسیداتیو مغز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه فراکسیون اتیل استات

برای تهیه فراکسیون اتیل استات، ابتدا ۵۰ گرم پودر گیاه در ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانول حل و عصاره‌گیری آن با استفاده از دستگاه عصاره‌گیر، انجام شد. در مرحله بعدی، ۱۰ گرم از عصاره اتانولی خشک‌شده در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و داخل دستگاه دکانتور ریخته شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر حلال ان بوتانول به آن اضافه شد. در این مرحله، دو فاز تشکیل می‌شود که فاز بالایی شامل ترکیبات قابل حل در ان بوتانول است. بعد از جدا کردن دو فاز از یکدیگر، برای تهیه فراکسیون اتیل استات، فاز زیرین حاصل از مرحله قبل را داخل دکانتور ریخته و به آن ۵۰ میلی‌لیتر حلال اتیل استات اضافه شد. بار دیگر دو فاز تشکیل می‌شود که فاز بالایی شامل ترکیبات محلول در اتیل استات است. بعد از جداسازی، محلول حاصل توسط دستگاه انکوباتور خشک شده و برای استفاده نگه‌داری می‌شود [۲۱].

حیوانات و گروه‌ها

این مطالعه، یک مطالعه تجربی است که در آن ۶۰ سر موش سوری نر در محدوده وزنی 30 ± 5 گرم به طور تصادفی در ۶ گروه ۱۰ تایی به شرح زیر گروه‌بندی شدند: ۱. گروه کنترل، ۲. گروه پنتیلین تترازول^۸، ۳. گروه پنتیلین تترازول + فراکسیون با دوز ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم^۹، ۴. گروه پنتیلین تترازول + فراکسیون با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم^{۱۰}، ۵. گروه پنتیلین تترازول + فراکسیون با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم^{۱۱}، ۶. گروه پنتیلین تترازول +

از جمله صرع دارد [۶]. حساسیت زیاد مغز به آسیب اکسیداتیو و اهمیت دانستن نقش استرس اکسیداتیو در پاتوژنز، تشنج‌های مغزی و صرع را برجسته می‌کند [۷]. شواهد علمی نیز بیانگر ارتباط بین تشنج‌های طولانی‌مدت و آسیب اکسیداتیو لیبیداها، دی‌ان‌ای^۳ و پروتئین‌ها هستند [۸]. همچنین، سمی بودن نورونی القاشده به وسیله بعضی از نوروترانسمیترها از جمله گلوتامات، یکی از تأثیرات اصلی اختلال نورونی ناشی از تشنج است [۹]. برای مثال، محققین گزارش داده‌اند سمی بودن نورونی ناشی از فعالیت بیش از حد گلوتامات، منجر به تولید بیش از حد نیتریک اکساید توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز نورونی و در نتیجه آسیب نورونی القاشده به وسیله استرس اکسیداتیو می‌شود [۱۰]. شواهد علمی نشان می‌دهند آسیب اکسیداتیو مولکول‌های زیستی در تحریک‌پذیری بیش از حد نورون‌ها، تخریب نورونی و القای حملات تشنجی، نقش بسزایی دارد [۱۱]. نتایج مطالعات اخیر تأیید می‌کند اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها به عنوان ارگان‌های مؤثر بر فسفریلاسیون اکسیداتیو و استرس اکسیداتیو حاد، می‌تواند مغز را مستعد تشنج‌های صرعی کند [۱۲]. همچنین گزارشات علمی بیانگر نقش استرس اکسیداتیو در آسیب نورونی در مدل صرعی القاشده به وسیله پنتیلین تترازول هستند [۱۳].

مطابق مطالعات تجربی قبلی، ترکیبات طبیعی موجود در عصاره گیاهان، منابع خوبی برای تسکین حملات تشنجی و کاهش اثرات آن‌ها در بیماران صرعی هستند [۱۴]. گیاه بابونه^۴ چشم‌گاوی متعلق به خانواده کاسنیان است که به طور وسیع در سراسر جهان رشد می‌کند [۱۵]. یکی از مهم‌ترین ترکیبات موجود در عصاره این گیاه با خاصیت ضد‌میگرنی، پارتنولید است [۱۶]. از عصاره این گیاه در طب سنتی برای پایین آوردن تب، تسکین عوارض آسم و کاهش التهاب استفاده می‌شود [۱۷]. ترکیبات پلی فنلی و فلاونوئیدهای موجود در عصاره گیاه بابونه چشم‌گاوی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند [۱۸]. بنا بر گزارش محققین، عصاره الکلی این گیاه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر ضد دی فنیل ۲ پیکریل هیدرازیل^۵ است که از طریق خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد انجام می‌شود [۱۹].

اثرات حفاظتی عصاره این گیاه برای آسیب کلیوی با تتراکلرید کربن که از طریق بهبود وضعیت استرس اکسیداتیو است، مستندسازی شده است [۱۵]. اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره این گیاه برای آسیب کبدی با تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد که همراه با کاهش سطح کلسترول و تری گلیسریدهاست، نشان داده شده است [۲۰]. نتایج مطالعه قبلی ما نشان داد، دُز متوسط^۶ از عصاره هیدروالکلی بابونه چشم‌گاوی دارای بهترین اثر در مقابله

7. MDA

8. PTZ

9. Fraction25+PTZ

10. Fraction50+PTZ

11. Fraction100+PTZ

3. DNA

4. Tanacetum parthenium

5. Diphenyl-2-picrylhydrazyl

6. 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم

اندازه‌گیری میزان گروه‌های تام تیول

برای اندازه‌گیری غلظت گروه‌های تام تیول در بافت‌های مغز از معرف ۲ نیتروبنزوئیک اسید^{۱۵} استفاده شد. ۲۵ میکرولیتر از این معرف با ۵۰ میکرولیتر از تریس، ۴۲۰ میکرولیتر آب و ۵ میکرولیتر از نمونه‌ها مخلوط شد. حجم کافی از مخلوط درون کوت ریخته شد و جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. ۴۹۵ میکرولیتر از آب نیز به عنوان بلانک^{۱۶} استفاده شد [۲۶].

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز^{۱۷}

با استفاده از یک روش کالریمتری، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت‌های مغز اندازه‌گیری شد. در این روش، اتواکسیداسیون پیروگالول منجر به تولید سوپراکساید می‌شود. احیای مولکول‌های تترازولیوم توسط سوپراکساید باعث تولید ماده قرمز رنگ فورمازان با جذب ۵۶۰ نانومتر می‌شود. در حضور آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، سوپراکساید به هیدروژن پراکسید و اکسیژن تجزیه می‌شود و یک کاهش در تولید کمپلکس قرمز رنگ فورمازان اتفاق می‌افتد [۲۷].

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز^{۱۸}

بر اساس روشی که در آن پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن توسط این آنزیم شکسته می‌شود، فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت‌های مغز انجام شد. در واقع، مخلوطی از فسفات پتاسیم، پراکسید هیدروژن و نمونه‌ها تهیه شد. سپس جذب در ۲۴۰ نانومتر خوانده شد. کاهش در جذب، بیانگر سطح بالایی از فعالیت آنزیم کاتالاز است [۲۷].

آنالیز آماری

داده‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ تجزیه و تحلیل شدند. بعد از اطمینان از نرمال بودن داده‌های رفتاری و بیوشیمیایی توسط آزمون کولموگروف اسمیرنوف، از آزمون واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی برای آنالیز و مقایسه گروه‌ها استفاده شد. $P < 0/05$ برای تعیین معنادار بودن و مقایسه بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر فراکسیون اتیل استات بابونه چشم‌گاو بر تشنج‌های ناشی از پنتیلین تترازول

بر اساس نتایج، تزریق پنتیلین تترازول داخل صفاقی باعث برانگیخته شدن تشنج‌های کلونیک و تونیک کلونیک ژنرالیزه در موش‌ها شد. پیش‌درمانی با فراکسیون اتیل استات گیاه بابونه

فراکسیون با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم^{۱۲} فراکسیون اتیل استات، ۳۰ دقیقه قبل از پنتیلین تترازول به صورت داخل صفاقی به مدت ۳ هفته تزریق شد. حیوانات در گروه کنترل نیز سالین دریافت کردند. حیوانات تحت شرایط استاندارد (دمای ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی، رطوبت ۵۰ درصد و دسترسی کافی به آب و غذا) نگهداری می‌شدند. دوز داروها در این مطالعه بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شد [۲۱].

القا تشنج به وسیله پنتیلین تترازول

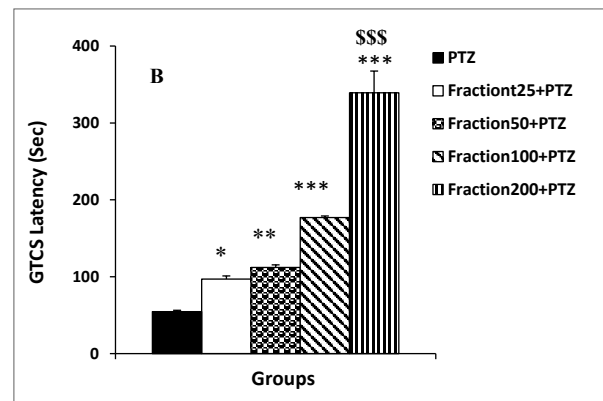
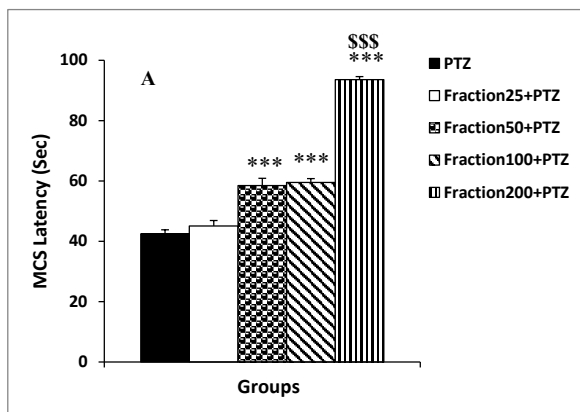
برای القای تشنج در موش‌ها، پنتیلین تترازول به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تزریق شد [۲۲]، [۲۳]. سپس حیوانات در یک جعبه از جنس پلکسی گلاس قرار داده شدند. رفتارهای تشنجی آن‌ها برای ۶۰ دقیقه بر اساس روش ۵ نمره‌ای بکر بررسی شد. مرحله صفر: بدون پاسخ، مرحله ۱: تکان‌های عضلات صورت و گوش، مرحله ۲: تکان‌های میوکلونیک بدون بلند شدن روی دو پا، مرحله ۳: تکان‌های میوکلونیک با بلند شدن روی دو پا، مرحله ۴: افتادن به یک پهلو و تشنج‌های تونیک کلونیک، مرحله ۵: افتادن به پشت و تشنج‌های تونیک کلونیک ژنرالیزه. با مشاهده مرحله ۴ و ۵، حیوان به عنوان تشنجی شده، در نظر گرفته می‌شد [۲۴]. تسریع در شروع تشنج‌های کلونیک^{۱۳} و تشنج‌های تونیک کلونیک ژنرالیزه^{۱۴} به عنوان یک معیار برای شدت تشنج‌ها در نظر گرفته شد. بعد از آزمایش‌های رفتاری، حیوانات کشته شدند و مغز آن‌ها خارج و بافت هیپوکامپ و قشر مغز جدا شد. بافت‌های مغز در یک میلی‌لیتر از بافر فسفات هموزن شدند. سپس بافت هموزن شده توسط دستگاه سانتریفیوژ با دور آرپی‌ام ۳ هزار به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد [۲۵]. در نهایت، محلول رویی به میکروتیوب منتقل و در فریزر با دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی مربوط به استرس اکسیداتیو نگهداری شد.

اندازه‌گیری غلظت مالون دی‌آلدئید

برای اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید، یک میلی‌لیتر از نمونه‌ها به ۲ میلی‌لیتر از محلولی که شامل تیوباربیتوریک اسید، تری کلرواستیک اسید و اسید هیدروکلریک است، اضافه شد. این محلول در حمام آب گرم به مدت ۴۰ دقیقه جوشانده شد. پس از رساندن به دمای اتاق، محلول با دور آرپی‌ام هزار به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد [۲۵].

15. DTNB
16. Blank
17. SOD
18. CAT

12. Fraction200+PTZ
13. MCS=Minimal Clonic Seizur
14. GTCS=Generalized Tonic-Clonic Seizur



افتخار دانش

تصویر ۱. اثر دُزهای متفاوت فراکسیون اتیل استات گیاه بابونه چشم‌گاو بر تأخیر زمانی در شروع تشنج‌های کلونیک A و تونیک کلونیک ژنرالیزه B ناشی از تزریق پنتیلین تترازول

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند. تعداد موش در هر گروه ۱۰ سر بود. $*P < 0.05$ ، $**P < 0.01$ و $***P < 0.001$ در مقایسه با گروه پنتیلین تترازول است. $SSSP < 0.001$ در مقایسه با گروه‌های Fraction100+PTZ، Fraction25+PTZ، Fraction50+PTZ است.

در مقایسه با گروه پنتیلین تترازول شد ($P < 0.05$ تا $P < 0.001$).

نتایج نشان داد، در بافت‌های مغز حیوانات گروه پنتیلین تترازول، سطح گروه‌های تام تیول به طور معناداری کمتر از گروه کنترل بود ($P < 0.001$). تزریق فراکسیون منجر به افزایش معناداری در محتوای گروه‌های تام تیول در بافت‌های هیپوکمپ و قشر مغز در گروه‌های فراکسیون ۲۵+پنتیلین تترازول، فراکسیون ۵۰+پنتیلین تترازول، فراکسیون ۱۰۰+پنتیلین تترازول و فراکسیون ۲۰۰+پنتیلین تترازول در مقایسه با گروه پنتیلین تترازول شد ($P < 0.05$ و $P < 0.01$) (تصاویر شماره ب-۲؛ ب-۳).

ارزیابی فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بافت‌های مغز نیز نشان داد میزان فعالیت این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گروه پنتیلین تترازول به طور معناداری پایین‌تر از گروه کنترل بود ($P < 0.05$ و $P < 0.01$). تزریق فراکسیون اتیل استات گیاه، باعث افزایش معناداری در فعالیت این آنزیم‌ها در بافت‌های هیپوکمپ و قشر مغز در گروه‌های فراکسیون ۵۰+پنتیلین تترازول، فراکسیون ۱۰۰+پنتیلین تترازول و فراکسیون ۲۰۰+پنتیلین تترازول در مقایسه با گروه پنتیلین تترازول شد ($P < 0.05$ و $P < 0.01$) (تصاویر شماره ج-۲؛ ج-۳، د).

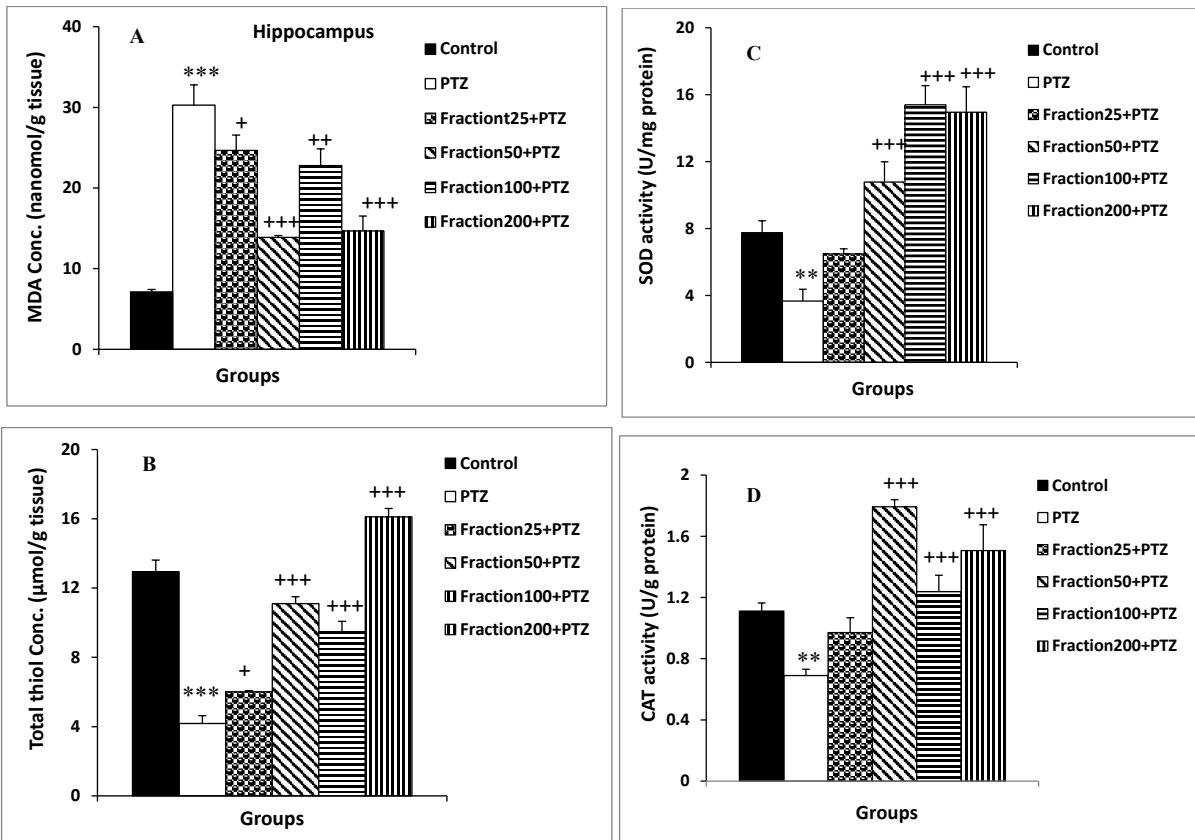
بحث

در مطالعه مذکور، تزریق پنتیلین تترازول داخل صفاقی منجر به تخلیه شدید نورونی با تسریع در آغاز تشنج‌های کولونیک و تشنج‌های تونیک کلونیک ژنرالیزه شد. بر اساس گزارشات علمی، استرس اکسیداتیو و نیتروژاتیو، نقشی اساسی را در پاتوفیزیولوژی حملات تشنجی بازی می‌کند [۲۸]. استرس اکسیداتیو و نیتروژاتیو از عدم تعادل میان تولید گونه‌های اکسیژنی و نیتروژنی واکنش‌دهنده و کاهش ظرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانی درون‌زاد

چشم‌گاو با دُزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معناداری باعث تأخیر در شروع تشنج‌های کلونیک در گروه‌های فراکسیون ۲۵+پنتیلین تترازول، فراکسیون ۵۰+پنتیلین تترازول، فراکسیون ۱۰۰+پنتیلین تترازول و فراکسیون ۲۰۰+پنتیلین تترازول در مقایسه با گروه پنتیلین تترازول شد ($P < 0.001$). در مقایسه با گروه‌های درمان‌شده با دُزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم، تأخیر در شروع تشنج‌های کلونیک در گروه درمان‌شده با دُز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معناداری بیشتر بود ($P < 0.001$) (تصویر شماره ۱-الف). نتایج نشان داد، در مقایسه با گروه تزریق شده به وسیله پنتیلین تترازول، تزریق هر ۴ دُز از فراکسیون اتیل استات باعث تأخیر معناداری در شروع تشنج‌های تونیک کلونیک ژنرالیزه در گروه‌های درمان‌شده با فراکسیون شد ($P < 0.05$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.001$). تأخیر در شروع تشنج‌های تونیک کلونیک ژنرالیزه در گروه فراکسیون ۲۰۰+پنتیلین تترازول در مقایسه با سایر گروه‌های درمان‌شده با فراکسیون به طور معناداری بالاتر بود ($P < 0.001$) (تصویر شماره ب-۱).

اثر فراکسیون اتیل استات بابونه چشم‌گاو بر پارامترهای استرس اکسیداتیو

همان‌طور که در قسمت الف تصاویر شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است، میزان مالون دی‌آلدئید به عنوان یک شاخص استرس اکسیداتیو ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها در بافت‌های هیپوکمپ و قشر مغز در حیوانات درمان‌شده با پنتیلین تترازول، به طور معناداری بالاتر از گروه کنترل است ($P < 0.001$). تزریق هر ۴ دُز از فراکسیون اتیل استات گیاه بابونه چشم‌گاو به طور معناداری باعث کاهش غلظت این شاخص استرس اکسیداتیو در گروه‌های فراکسیون ۲۵+پنتیلین تترازول، فراکسیون ۵۰+پنتیلین تترازول، فراکسیون ۱۰۰+پنتیلین تترازول و فراکسیون ۲۰۰+پنتیلین تترازول



فوق دانش

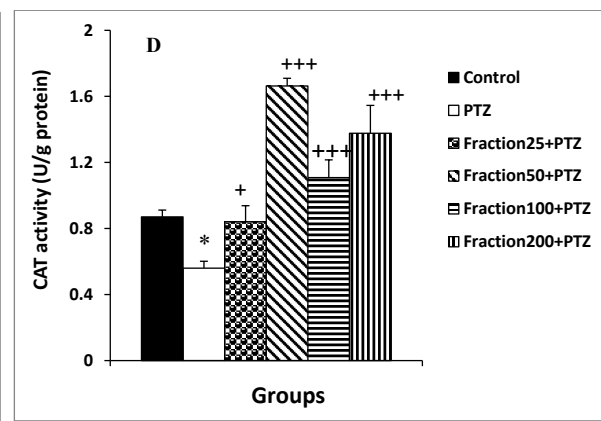
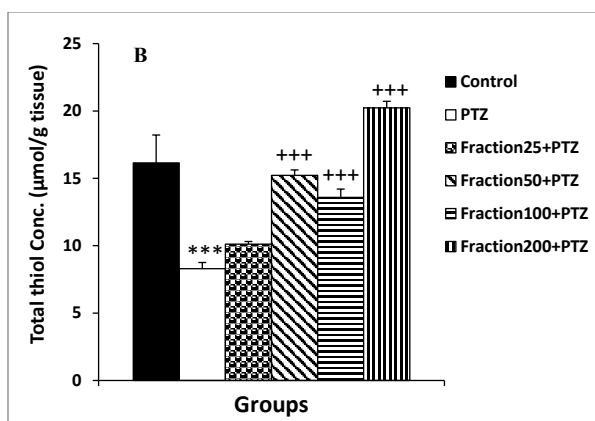
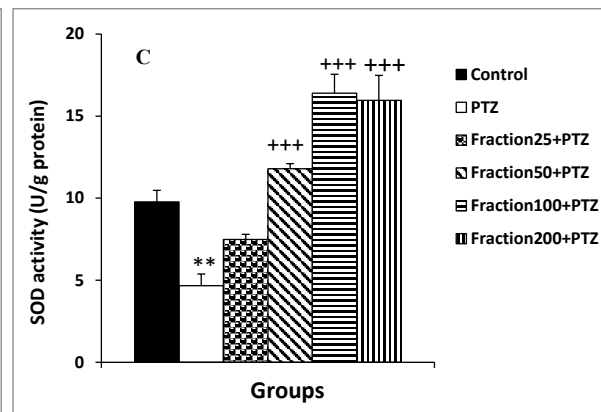
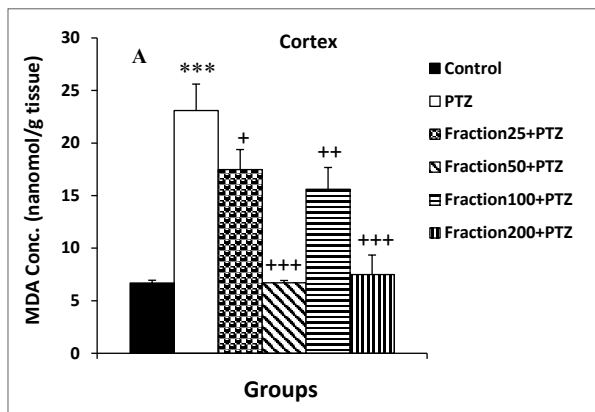
تصویر ۲. اثر دزهای متفاوت فراکسیون اتیل استات گیاه بابونه چشم گاوی بر غلظت مالون دی آلدئید A، گروه‌های تام تیول B، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز C و آنزیم کاتالاز D در بافت هیپوکامپ مغز

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند. تعداد موش در هر گروه ۱۰ سر بود. $P < 0.01$ و $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل است. $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.001$ در مقایسه به گروه پنتیلین تترازول (PTZ) است.

گیاه بابونه چشم گاوی یکی از گیاهان استفاده شده در طب سنتی است که اثرات ضدآسمی، ضدتب، ضدالتهابی، ضددیابتی و ضدمیگرنی آن بررسی و تأیید شده است [۲۰، ۱۵]. شواهد علمی نشان داده‌اند استفاده از این گیاه باعث بهبود فرکانس و شدت سردردهای میگرنی در کودکان می‌شود. این بهبودی به اثرات این گیاه در کاهش رهائش سروتونین و تضعیف پاسخ‌های التهابی نسبت داده شده است [۳۴]. در مدل صرعی القا شده به وسیله پنتیلین تترازول، تأخیر در شروع تشنج‌های کولونیک و تشنج‌های تونیک کلونیک ژنرالیزه به عنوان شاخص مهمی از شدت تشنج‌ها در نظر گرفته می‌شود [۲۲]. بر اساس نتایج مطالعه موردنظر، پیش‌درمانی با فراکسیون اتیل استات گیاه بابونه چشم گاوی منجر به کاهش شدت تشنج‌های ناشی از تزریق پنتیلین تترازول شد. تأخیر در شروع تشنج‌های کلونیک و تونیک کلونیک در گروه‌های درمان شده با فراکسیون این گیاه در مقایسه با گروه درمان شده با پنتیلین تترازول، تأییدی بر این یافته است.

شواهد علمی بیانگر نقش مهم ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در دفاع

در حذف رادیکال‌های آزاد ناشی می‌شود [۲۹]. مغز به علت فعالیت متابولیکی بالا، بسیار حساس به استرس اکسیداتیو و استرس نیتروژن‌آتیو است [۳۰]. تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژنی و نیتروژنی واکنش‌دهنده می‌تواند باعث افزایش تحریک‌پذیری نورونی و مرگ نورونی از طریق مکانیسم‌های متعدد از جمله آسیب به گیرنده‌های نوروترانسمیترها و کانال‌های یونی شود [۳۱]. در مدل‌های حیوانی، تشنج القا شده به وسیله کاینیک اسید [۳۲] و پنتیلین تترازول [۳۳]، باعث افزایش استرس اکسیداتیو و مرگ نورونی می‌شود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد، در مقایسه با گروه کنترل، غلظت بالای مالون دی آلدئید، سطح پایینی از گروه‌های تام تیول و سطح کاهش یافته‌ای از فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بافت‌های هیپوکامپ و قشر مغز در گروه درمان شده با پنتیلین تترازول بود. به نظر می‌رسد، تحریک‌پذیری بالای نورونی مشاهده شده در گروه پنتیلین تترازول در مقایسه با گروه کنترل، ناشی از القای آسیب اکسیداتیو مغز توسط پنتیلین تترازول باشد.



افتخار دانش

تصویر ۳. اثر دُزهای متفاوت فراکسیون اتیل استات گیاه بابونه چشم گاوی بر غلظت مالون دی‌آلدئید A، گروه‌های تام تیول B، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز C و آنزیم کاتالاز D در بافت کورتکس مغز

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند. تعداد موش در هر گروه ۱۰ سر بود. $*P < 0.05$ ، $**P < 0.01$ و $***P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل است. $*P < 0.05$ ، $**P < 0.01$ و $***P < 0.001$ در مقایسه به گروه پنتیلین تترازول (PTZ) است.

دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در بافت کلیه بود [۱۵]. اثر حفاظت کبدی عصاره متانولیک این گیاه از طریق افزایش سطح آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز بررسی شده است [۳۸]. در مطالعه قبلی، اثر فراکسیون‌های این بوتانول و آبی گیاه بابونه چشم گاوی بر ضد آسیب اکسیداتیو ناشی از تشنج‌های تحریک‌شده به وسیله پنتیلین تترازول مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج رفتاری، هر دو فراکسیون توانستند باعث تأخیر در شروع تشنج‌های تونیک و تونیک کلونیک شوند، اما بر اساس نتایج بیوشیمیایی، این دو فراکسیون نتوانستند باعث بهبود آسیب اکسیداتیو ناشی از تزریق پنتیلین تترازول در بافت مغز شوند [۲۱]. در مطالعه موردنظر، اثر فراکسیون اتیل استات این گیاه مورد بررسی قرار گرفت که فراکسیون اتیل استات علاوه بر افزایش تأخیر در شروع تشنج‌ها، توانست باعث بهبود وضعیت استرس اکسیداتیو ناشی از پنتیلین تترازول در بافت مغز نیز شود. بر اساس نتایج، سطح مالون دی‌آلدئید در بافت مغز کاهش یافت، در حالی که سطح گروه‌های تام تیول و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت. فلاونوئیدها

سلولی بر ضد گونه‌های اکسیژنی و نیتروژنی واکنش‌دهنده هستند [۳۵، ۳۶]. محققین گزارش کردند، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جمله ویتامین ای^۱ می‌تواند باعث کاهش تولید شاخص‌های استرس اکسیداتیو و تضعیف فرکانس تشنج شود [۳۷]. علاوه بر این نتایج، مطالعات اخیر مشخص می‌کند، ترکیبات افزایش‌دهنده سطح گلوتاتیون باعث حفاظت مغز در مقابل استرس اکسیداتیو، کاهش تشنج‌های صرعی، جلوگیری از مرگ نورونی و بهبود نقایص شناختی می‌شوند [۳۱]. پراکسیداسیون لیپیدها یکی از شاخص‌های مهم استرس اکسیداتیو است و پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد نیز یک مکانیسم آنتی‌اکسیدانی مهم در مهار پراکسیداسیون لیپیدها و تولید مالون دی‌آلدئید است [۳۸]. عصاره متانولیک گیاه بابونه چشم گاوی توانست باعث بهبود آسیب کلیوی ناشی از تتراکلرید کربن از طریق کاهش استرس اکسیداتیو شود. این اثر همراه با کاهش سطح مالون دی‌آلدئید و افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید

19. E

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد برای تأمین تسهیلات مالی این پروژه، صمیمانه تشکر می‌کنند.

از ترکیبات گیاهی قابل جداسازی توسط اتیل استات هستند که دارای خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی هستند [۳۹]. طبق گزارش محققین، فراکسیون اتیل استات غنی از فلاونوئیدهای گیاه آکاسیا^{۲۰}، توانست از بافت کلیه در مقابل آسیب اکسیداتیو ناشی از ترکیب ضدسرطان دوکسوروبیسین^{۲۱} محافظت کند [۴۰]. در این مطالعه نیز احتمال داده می‌شود، ترکیبات فلاونوئیدی موجود در فراکسیون اتیل استات گیاه بابونه چشم‌گاو بر ضد آسیب اکسیداتیو مغز در تشنج‌های القا شده به وسیله پنتیلین تترازول نقش داشته باشد، اما این موضوع نیاز به مطالعه بیشتر در آینده دارد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی، اثر فراکسیون اتیل استات گیاه بابونه چشم‌گاو بر مرگ نورونی ناشی از تشنج‌های ایجاد شده به وسیله پنتیلین تترازول مورد بررسی قرار بگیرد. همچنین، اثرات پارتنولید استخراج شده از گیاه بانونه چشم‌گاو بر تشنج، مورد مطالعه قرار بگیرد.

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه، فراکسیون اتیل استات گیاه بابونه چشم‌گاو همانند فراکسیون‌های این بوتانول و آبی آن، باعث کاهش تشنج‌های تحریک شده به وسیله پنتیلین تترازول شد. برخلاف دو فراکسیون دیگر، فراکسیون اتیل استات باعث بهبود وضعیت استرس اکسیداتیو ناشی از تشنج‌های تحریک شده به وسیله پنتیلین تترازول در بافت مغز شد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

رعایت اصول اخلاقی بر اساس مجوز شماره IR.MUMS. fm.REC.1397.134 معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد و با نظارت کمیته اخلاق دانشگاه صورت گرفت.

حامی مالی

هزینه مالی این تحقیق توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد تأمین شد.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان به یک اندازه در نگارش مقاله مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافی از سوی نویسندگان بیان نشده است.

20. Acacia hydaspica

21. Doxorubicin

References

- [1] Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen Hauser W, Mathern G, et al. Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc task force of the ILAE commission on therapeutic strategies. *Epilepsia*. 2010; 51(6):1069-77. [DOI:10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x] [PMID]
- [2] Juhász C, Mittal S. Molecular imaging of brain tumor-associated epilepsy. *Diagnostics*. 2020; 10(12):1049. [DOI:10.3390/diagnostics10121049] [PMID] [PMCID]
- [3] Waldbaum S, Patel M. Mitochondria, oxidative stress, and temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*. 2010; 88(1):23-45. [DOI:10.1016/j.epilepsyres.2009.09.020] [PMID] [PMCID]
- [4] Cardenas-Rodriguez N, Huerta-Gertrudis B, Rivera-Espinosa L, Montesinos-Correa H, Bandala C, Carmona-Aparicio L, et al. Role of oxidative stress in refractory epilepsy: Evidence in patients and experimental models. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14(1):1455-76. [DOI:10.3390/ijms14011455] [PMID] [PMCID]
- [5] Homayoun M, Shafieian R, Seghatoleslam M, Hosseini M, Ebrahimzadeh-Bideskan A. [Protective impact of rosa damascena against neural damage in a rat model of Pentylentetrazole (PTZ)-induced seizure (Persian)]. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2020; 10(6):574-83. [PMID] [PMCID]
- [6] Devi PU, Manocha A, Vohora D. Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: An insight for researchers. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2008; 9(18):3169-77. [DOI:10.1517/14656560802568230] [PMID]
- [7] Mahmoudi T, Lorigooini Z, Rafieian-Kopaei M, Arabi M, Rabiei Z, Bijad E, et al. [Effect of curcuma zedoaria hydro-alcoholic extract on learning, memory deficits and oxidative damage of brain tissue following seizures induced by pentylentetrazole in rat (Persian)]. *Behavioral and Brain Functions*. 2020; 16(1):1-12. [DOI:10.1186/s12993-020-00169-3] [PMID] [PMCID]
- [8] Kudin AP, Kudina TA, Seyfried J, Vielhaber S, Beck H, Elger CE, et al. Seizure-dependent modulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*. 2002; 15(7):1105-14. [DOI:10.1046/j.1460-9568.2002.01947.x] [PMID]
- [9] Lee SJ. Effects of preconditioning exercise on nitric oxide and antioxidants in hippocampus of epileptic seizure. *Journal of Exercise Rehabilitation*. 2019; 15(6):757. [DOI:10.12965/jer.1938698.349] [PMID] [PMCID]
- [10] Chen HJ, Spiers JG, Sernia C, Anderson ST, Lavidis NA. Reactive nitrogen species contribute to the rapid onset of redox changes induced by acute immobilization stress in rats. *Stress*. 2014; 17(6):520-7. [DOI:10.3109/10253890.2014.966264] [PMID]
- [11] Kunz WS, Kudin AP, Vielhaber S, Blümcke I, Zuschratter W, Schramm J, et al. Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*. 2000; 48(5):766-73. [PMID]
- [12] Chuang YC. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in seizure-induced neuronal cell death. *Acta Neurologica Taiwanica*. 2010; 19(1):3-15. [PMID]
- [13] Obay BD, Taşdemir E, Tümer C, Bilgin H, Atmaca M. Dose dependent effects of ghrelin on pentylentetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides*. 2008; 29(3):448-55. [DOI:10.1016/j.peptides.2007.11.020] [PMID]
- [14] Sahranavard S, Ghafari S, Mosaddegh M. [Medicinal plants used in Iranian traditional medicine to treat epilepsy (Persian)]. *Seizure*. 2014; 23(5):328-32. [DOI:10.1016/j.seizure.2014.01.013] [PMID]
- [15] Mazani M, Mahmoodzadeh Y, Chinifroush Asl MM, Banaei S, Rezagholizadeh L, Mohammadnia A. [Renoprotective effects of the methanolic extract of tanacetum parthenium against carbon tetrachloride-induced renal injury in rats (Persian)]. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2018; 8(4):370-79. [PMID] [PMCID]
- [16] Williams CA, Harborne JB, Geiger H, Hoult JR. The flavonoids of tanacetum parthenium and T. Vulgare and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry*. 1999; 51(3):417-23. [DOI:10.1016/S0031-9422(99)00021-7] [PMID]
- [17] Sharopov FS, Setzer WN, Isupov SJ, Wink M. Composition and bioactivity of the essential oil of tanacetum parthenium from a wild population growing in Tajikistan. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*. 2015; 2(4):32-4. <https://www.essencejournal.com/archives/2015/2/4/A/2-4-9>
- [18] Pedrielli P, Skibsted LH. Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)-catechin on alpha-tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50(24):7138-44. [DOI:10.1021/jf020437j] [PMID]
- [19] Wu C, Chen F, Wang X, Kim HJ, He GQ, Haley-Zitlin V, et al. Antioxidant constituents in feverfew (tanacetum parthenium) extract and their chromatographic quantification. *Food Chemistry*. 2006; 96(2):220-7. [DOI:10.1016/j.foodchem.2005.02.024]
- [20] Mahmoodzadeh Y, Mazani M, Rezagholizadeh L. [Hepatoprotective effect of methanolic tanacetum parthenium extract on CCl4-induced liver damage in rats (Persian)]. *Toxicology Reports*. 2017; 4:455-62. [DOI:10.1016/j.toxrep.2017.08.003] [PMID] [PMCID]
- [21] Asgharzadeh F, Hosseini M, Bargi R, Beheshti F, Rakhshandeh H, Mansouri S, et al. [Effects of hydro-ethanolic extract of tanacetum parthenium and its N-Butanol and aqueous fractions on brain oxidative damage in pentylentetrazole-induced seizures in mice (Persian)]. *Pharmaceutical Sciences*. 2020; 26(3):252-60. [DOI:10.34172/PS.2020.32]
- [22] Asgharzadeh F, Hosseini M, Bargi R, Soukhtanloo M, Beheshti F, Mohammady Z, et al. [Effect of captopril on brain oxidative damage in pentylentetrazole-induced seizures in mice (Persian)]. *Pharmaceutical Sciences*. 2019; 25(3):221-6. [DOI:10.15171/PS.2019.38]
- [23] Pourzaki M, Homayoun M, Sadeghi S, Seghatoleslam M, Hosseini M, Ebrahimzadeh Bideskan A. [Preventive effect of coriandrum sativum on neuronal damages in pentylentetrazole-induced seizure in rats (Persian)]. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2017; 7(2):116-28. [PMID] [PMCID]
- [24] Pourmotabbed A, Nedaei SE, Cheraghi M, Moradian S, Touhidi A, Aeinfar M, et al. [Effect of prenatal pentylentetrazol-induced kindling on learning and memory of male offspring (Persian)]. *Neuroscience*. 2011; 172:205-11. [DOI:10.1016/j.neuroscience.2010.11.001] [PMID]
- [25] Asgharzadeh F, Bargi R, Hosseini M, Farzadnia M, Khazaei M. [Cardiac and renal fibrosis and oxidative stress balance in lipopolysaccharide-induced inflammation in male rats (Persian)]. *ARYA Atheroscler*. 2018; 14(2):71-77. [DOI:10.22122/arya.v14i2.1550] [PMID] [PMCID]
- [26] Asgharzadeh F, Bargi R, Beheshti F, Hosseini M, Farzadnia M, Khazaei M. [Thymoquinone prevents myocardial and perivascular fibrosis induced by chronic lipopolysaccharide exposure in male rats: Thymoquinone and cardiac fibrosis (Persian)]. *Journal of Pharmacopuncture*. 2018; 21(4):284-93. [DOI:10.3831/KPI.2018.21.032] [PMID] [PMCID]
- [27] Beheshti F, Hosseini M, Hashemzahi M, Soukhtanloo M, Khazaei M, Shafei MN. [The effects of PPAR-γ agonist pioglitazone on hippocampal cytokines, brain-derived neurotrophic factor, memory impairment, and oxidative stress status in lipopolysaccharide-treated rats (Persian)]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2019; 22(8):940-48. [DOI:10.22038/ijbms.2019.36165.8616] [PMID] [PMCID]

- [28] Aguiar CC, Almeida AB, Araújo PV, de Abreu RN, Chaves EM, do Vale OC, et al. Oxidative stress and epilepsy: literature review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012; 2012:795259. [DOI:10.1155/2012/795259] [PMID] [PMCID]
- [29] Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*. 2006; 141(2):312-22. [DOI:10.1104/pp.106.077073] [PMID] [PMCID]
- [30] Salim S. Oxidative stress and the central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2017; 360(1):201-5. [DOI:10.1124/jpet.116.237503] [PMID] [PMCID]
- [31] Pearson-Smith JN, Patel M. Metabolic dysfunction and oxidative stress in epilepsy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(11):2365. [DOI:10.3390/ijms18112365] [PMID] [PMCID]
- [32] Gupta YK, Briyal S, Chaudhary G. Protective effect of trans-resveratrol against kainic acid-induced seizures and oxidative stress in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2002; 71(1-2):245-9. [DOI:10.1016/s0091-3057(01)00663-3] [PMID]
- [33] Erbas O, Yilmaz M, Korkmaz HA, Bora S, Evren V, Peker G. Oxytocin inhibits pentylenetetrazol-induced seizures in the rat. *Peptides*. 2013; 40:141-4. [DOI:10.1016/j.peptides.2012.12.003] [PMID]
- [34] Moscano F, Guiducci M, Maltoni L, Striano P, Ledda MG, Zoroddu F, et al. An observational study of fixed-dose tanacetum parthenium nutraceutical preparation for prophylaxis of pediatric headache. *Italian Journal of Pediatrics*. 2019; 45(1):36. [DOI:10.1186/s13052-019-0624-z] [PMID] [PMCID]
- [35] Urquiaga I, Leighton F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*. 2000; 33(2):55-64. [DOI:10.4067/s0716-9760200000200004] [PMID]
- [36] Yuan X, Fu Z, Ji P, Guo L, Al-Ghamdy AO, Alkandiri A, et al. Selenium nanoparticles pre-treatment reverse behavioral, oxidative damage, neuronal loss and neurochemical alterations in pentylenetetrazole-induced epileptic seizures in mice. *International Journal of Nanomedicine*. 2020; 15:6339-353. [DOI:10.2147/IJN.S259134] [PMID] [PMCID]
- [37] Mehvari J, Motlagh FG, Najafi M, Ghazvini MR, Naeini AA, Zare M. [Effects of vitamin E on seizure frequency, electroencephalogram findings, and oxidative stress status of refractory epileptic patients (Persian)]. *Advanced Biomedical Research*. 2016; 5:36. [DOI:10.4103/2277-9175.178780] [PMID] [PMCID]
- [38] Vuda M, D'Souza R, Upadhyaya S, Kumar V, Rao N, Kumar V, et al. Hepatoprotective and antioxidant activity of aqueous extract of *hybanthus enneaspermus* against CCl4-induced liver injury in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2012; 64(7-8):855-9. [DOI:10.1016/j.etp.2011.03.006] [PMID]
- [39] Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001; 74(4):418-25. [DOI:10.1093/ajcn/74.4.418] [PMID]
- [40] Afsar T, Razak S, Almajwal A, Al-Disi D. [Doxorubicin-induced alterations in kidney functioning, oxidative stress, DNA damage, and renal tissue morphology; Improvement by *acacia hydaspica* tannin-rich ethyl acetate fraction (Persian)]. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020; 27(9):2251-2260. [DOI:10.1016/j.sjbs.2020.07.011] [PMID] [PMCID]