

Original Article

Evaluation of the anticonvulsant effect of carvacrol in Pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures in male mice: N-Methyl-D-Aspartic Acid receptor role

Hossein Amini-Khoei¹, Shakiba Nasiri Boroujeni¹, Zahra Lorigooini¹, Sepideh Yadollahi, Seyyed Kamal Solati Dehkordi¹, Mahmoud Rafieian Koopai^{1*}

Medical Plants Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 13 Feb 2021

Accepted: 14 Jul 2021

ePublished: 12 Jan 2022

Keywords:

Pentylenetetrazole (PTZ),
Carvacrol, Seizure,
NMDA

Abstract

Background. Epilepsy is one of the most common neurological disorders after stroke. Due to the side effects and poor response of conventional anticonvulsant drugs, researchers have turned their attention to find new drugs. Carvacrol is a phenolic compound with neuroprotective, anti-inflammatory, antioxidant and anticonvulsant effects. The aim of the study was to investigate the anticonvulsant effects of carvacrol in PTZ-induced seizures in male mice and to investigate the role of N-Methyl-D-Aspartic Acid (NMDA) receptor.

Methods. In the present experimental study, 90 mice were randomly divided into 9 groups (n=10). Drugs were injected intraperitoneally 30 minutes before PTZ injection. Then, seizure onset time, serum and brain antioxidant capacity (TAC) and malondialdehyde (MDA) and NMDA receptor gene expression in the hippocampus were examined.

Results. Seizure onset time in the group received carvacrol (20 and 40 mg/kg) was significantly longer than the PTZ group ($P<0.05$). Treatment with carvacrol (20 and 40 mg/kg) significantly increased serum and brain antioxidant capacity and reduced serum and brain MDA compared to the PTZ group (at doses of 5, 10, 20 and 40 mg/kg). The expression of NR2A and NR2B subunits of hippocampal NMDA receptors in carvacrol-received mice was significantly lower than the PTZ group ($P<0.05$).

Conclusion. Carvacrol has anticonvulsant effects, possibly by inhibiting oxidative stress and reducing the expression of subunits of NMDA receptors.

How to cite this article: Amini-Khoei H, Nasiri Boroujeni Sh, Lorigooini Z, Yadollahi S, Solati Dehkordi S.K, Rafieian Koopai M. The anticonvulsant effect of carvacrol in Pentylenetetrazole induced seizures in male mice: n-methyl-d-aspartic acid receptor role. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2022;43(6):515-524. doi: 10.34172/mj.2022.004. Persian.

*Corresponding author; Email: rafieian@yahoo.com

© 2022 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

Extended Abstract

Background

Epilepsy is one of the most common neurological disorders after stroke. Many drugs such as phenobarbital are used to treat seizures, but due to the many side effects and low therapeutic effects of these drugs, researchers have turned their attention to find new drugs. Carvacrol is a phenolic compound with neuroprotective, anti-inflammatory, antioxidant and anticonvulsant effects. It has been observed that focal or systemic injection of NMDA receptor agonists can induce seizures in animal models. In addition, all types of NMDA antagonists exhibit extensive anticonvulsant properties in acute and chronic models of animal seizures. Studies have also observed an increase in the expression of NMDA receptor subunits following seizures. The aim of the study was to investigate the anticonvulsant effects of carvacrol in PTZ-induced seizures in male mice and to investigate the role of N-Methyl-D-Aspartic Acid (NMDA) receptor.

Methods

In the present experimental study, 90 mice were randomly divided into 9 groups (n=10). The control group received normal saline by intraperitoneal injection. The group received PTZ at a concentration of 90 mg/kg intravenously and saline intraperitoneally. Mice received phenobarbital as standard anticonvulsant at a dose of 4 mg/kg 30 minutes before PTZ. Intervention groups received carvacrol at doses of 5, 10, 20 and 40 mg/kg 30 minutes before PTZ injection. The group that received the NMDA antagonist (ketamine, 1 mg/kg) and the sub-effective dose of carvacrol 30 minutes before PTZ, and the last group received the NMDA agonist (N-Methyl-D-Aspartic Acid) and the effective dose of carvacrol 30 minutes before PTZ. Then,

seizure onset time, antioxidant capacity (TAC) by FRAP method and malondialdehyde (MDA) levels of serum and brain and NMDA receptor subunits (NR2A and NR2B) gene expression by Real-time PCR in the hippocampus were examined.

Result

Seizure onset time in the group received carvacrol (20 and 40 mg/kg) was significantly longer than the PTZ group ($P<0.05$). Treatment with carvacrol (20 and 40 mg/kg) significantly increased serum and brain antioxidant capacity in compared to the PTZ group ($P<0.05$). Carvacrol at doses of 5, 10, 20 and 40 mg/kg reduced serum and brain MDA levels in compared to the PTZ group ($P<0.05$). The expression of NR2A and NR2B subunits of hippocampal NMDA receptors in carvacrol-received mice was significantly lower than the PTZ group ($P<0.05$). Phenobarbital as an anticonvulsant drug could only significantly increase the onset time of seizures in compared to the PTZ group ($P<0.05$). But in other measured parameters, no statistically significant difference was observed between this group and the PTZ group ($P>0.05$).

Conclusion

According to the results, carvacrol treatment increased the seizure onset time, significantly increased serum and brain antioxidant capacity and significantly decreased serum and brain malondialdehyde levels. Expression of NR2A and NR2B subunits of hippocampal NMDA receptors decreased in carvacrol-receiving mice. These results indicate that carvacrol has anticonvulsant effects, possibly by inhibiting oxidative stress and reducing the expression of subunits of NMDA receptors.

اثر ضد تشنجی کارواکرول (Carvacrol) در تشنج القا شده با پنتیلن تترازول (PTZ) در موش سوری نر: نقش گیرنده N-Methyl-D-Aspartic Acid

حسین امینی خوئی^{۱*}، شکبیا نصیری بروجنی^۲، زهرا لری گوئینی^۳، سپیده یداللهی^۴، سید کمال صولتی دهکردی^۵، محمود رفیعیان کوپائی^{۶*}

مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

زمینه. صرع یکی از شایع‌ترین اختلال نورولوژیک پس از سکته مغزی است. باتوجه به عوارض جانبی و پاسخدهی ضعیف داروهای ضد تشنج معمول، توجه محققان به سوی یافتن داروهای جدید معطوف شده است. کارواکرول یک ترکیب فنلی با اثرات نوروپروتکتیو، ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد تشنج است. هدف مطالعه، بررسی اثرات ضد تشنجی کارواکرول در تشنج القا شده با پنتیلن تترازول (PTZ) در موش سوری نر و بررسی نقش گیرنده (N-Methyl-D-Aspartic Acid (NMDA)) بود.

روش کار. در مطالعه تجربی حاضر ۹۰ موش سوری به صورت تصادفی به ۹ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. داروها به صورت داخل صفاقی و ۳۰ دقیقه قبل از تزریق PTZ تزریق شدند. سپس زمان شروع تشنج، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (TAC) و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) سرم و مغز و بیان ژن گیرنده NMDA در هیپوکامپ بررسی شد.

یافته‌ها. زمان تاخیر شروع تشنج در موش‌های دریافت‌کننده کارواکرول ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه PTZ بود ($P < 0/05$). تیمار موش‌های دریافت‌کننده PTZ توسط کارواکرول در دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم و مغز و در دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب کاهش معنی‌دار مالون‌دی‌آلدئید سرم و مغز در مقایسه با گروه PTZ شد ($P < 0/05$). بیان زیرواحدهای NR2A و NR2B گیرنده‌های NMDA هیپوکامپ در موش‌های دریافت‌کننده کارواکرول به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه دریافت‌کننده PTZ بود ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری. کارواکرول اثرات ضد تشنجی دارد که احتمالاً از طریق مهار استرس اکسیداتیو و کاهش بیان زیر واحدهای گیرنده‌های NMDA اعمال می‌شود.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵

پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۲۳

انتشار برخط: ۱۴۰۰/۱۰/۲۲

کلید واژه‌ها:

پنتیلن تترازول، کارواکرول، تشنج، NMDA

مقدمه

هیچ علت مشخصی ندارد.^۳ محققان معتقدند که صرع اغلب به دلیل مشکلات ژنتیکی و عوامل محیطی ایجاد می‌گردد. برخی از این ژن‌ها بر کانال‌های یونی، آنزیم‌ها، گیرنده‌های گابا و گیرنده متصل به پروتئین جی تاثیر می‌گذارند.^۴ محققین برخی از انواع بیماری صرع را با ژن‌های مشخصی ارتباط داده‌اند. اگر چه تخمین زده شده است که حدود ۵۰۰ ژن می‌تواند در این بیماری نقش داشته باشد. برای بیشتر افراد، ژن‌ها تنها بخشی از علل بیماری صرع هستند. ژن‌های مشخص می‌توانند شخص را نسبت به شرایط محیطی حساس‌تر کرده و تشنج را تحریک می‌کنند.^۳

بیماری صرع یک اختلال سیستم عصبی مرکزی (اختلال نورولوژیک) است که در آن فعالیت سلول‌های عصبی در مغز مختل و منجر به تشنج می‌گردد که طی آن رفتار، علایم و احساسات غیرطبیعی مانند از دست رفتن هوشیاری رخ می‌دهد.^۱ تخمین زده می‌شود که در حال حاضر ۱-۵٪ درصد از جمعیت جهان به صرع مبتلا باشند. بر اساس آمار اعلام شده توسط سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۱۸، حدود ۵۰ میلیون نفر در کل جهان مبتلا به صرع هستند و هر سال ۲/۴ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند.^۲ در بیش از نیمی از موارد، بیماری صرع

* نویسنده مسؤول: ایمیل: rafieian@yahoo.com

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

نکات کاربردی

یکی از مکانیسم‌های دخیل در اثر ضد تشنجی کارواکرول - که از طریق گیرنده NMDA بود- مشخص شد و می‌تواند در مطالعات بعدی مکانیسم‌های دیگر دخیل در این اثر شناسایی شوند تا در صورت تایید مطالعات، به عنوان یک داروی با پتانسیل جهت درمان تشنج استفاده شوند.

(نوروترانسمیترهای تحریکی) ممکن است حمله تشنجی رخ دهد.^۸ به‌طور کلی افزایش غلظت گلوتامات در فضای سیناپس و مایع خارج سلولی از طریق روند تاثیر تحریکی نقش موثری در بروز تشنج دارد. دانشمندان بر این باورند که تجمع Ca داخل سلول‌های عصبی از طریق گیرنده‌های NMDA مرحله کلیدی برای گسترش تشنج و آسیب سلول‌های عصبی است، در حالی که افزایش Ca^{2+} از طریق کانال‌های کلسیم یا کانال‌های وابسته به ولتاژ غیرسمی است. به همین دلیل به گیرنده‌های یونوتروپیک NMDA برای جنبه‌های مکانیسمی و درمانی تشنج و صرع توجه زیادی شده است.^۹ در همین راستا مشاهده شده که تزریق کانونی یا سیستمیک آگونیست‌های گیرنده‌های NMDA می‌تواند سبب القا تشنج در مدل‌های جانوری گردد. همچنین همه انواع آنتاگونیست‌های NMDA (آنتاگونیست رقابتی NMDA، آنتاگونیست سایت گلیسین و آنتاگونیست کانال کلسیم) خواص ضد تشنجی گسترده‌ای در مدل‌های حاد و مزمن تشنج حیوانات نشان می‌دهند.^۹

مطالعات همچنین افزایش بیان زیرواحدهای گیرنده‌های NMDA را به دنبال تشنج گزارش کرده‌اند.^{۱۰} کارواکرول (Carvacrol) یک فنل مونوترپنوئید با خواص آنتی‌اکسیدان، ضدالتهابی، آنتی‌باکتریال، آنتی‌هیپوتوتوکسیک و ضد میکروبی است.^{۱۱} با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی، کارواکرول نقش مهمی در پیشگیری و مهار چندین بیماری دارد.^{۱۲-۱۴} اثرات آنتی‌اکسیدانی کارواکرول به دلیل وجود گروه هیدروکسیل در ساختار آن است.^{۱۱} طبق نتایج مطالعات اخیر، کارواکرول در هر دو مدل *in vitro* و *in vivo* اثرات محافظتی عصبی در برابر ایسکمی مغزی دارد.^{۱۵} پس از القا ایسکمی در مغز، تجویز کارواکرول با رپیرفیوژن مغزی باعث کاهش آپوپتوز نورونی و حجم سخته مغزی می‌گردد. حتی ۶ ساعت پس از القا ایسکمی در مغز موش، اثرات درمانی گسترده‌ای از کارواکرول روی عوارض رفتاری و بافتی دیده شده است که این اثرات درمانی مربوط به خواص آنتی‌اکسیدانی آن است.^{۱۶} همچنین کارواکرول منجر به تاخیر بروز تشنج در مدل‌های موشی که حداکثر شوک و پنتیلین تترازول گرفته بودند، می‌شود.^{۱۷}

اختلالات ساختاری مانند تومورها، مالفورماسیون‌ها و ضربه‌های مغزی که می‌توانند ارثی یا ثانویه ایجاد شوند در ابتلا به صرع موثر هستند.^۵ مننژیت به دنبال ابتلا به برخی بیماری‌ها مانند مالاریا، سفلیس و اسفالیس می‌تواند باعث تشنج موقت یا تکرار آن گردد.^۵ هیپوکسی، افت قندخون، کاهش سدیم از اختلالات متابولیکی هستند که می‌توانند تشنج را ایجاد کنند.^۵ در بیماری صرع تحریک‌پذیری نوروها به طور دائم افزایش پیدا می‌کند. این افزایش به دنبال هرگونه عدم تعادل بین سیستم‌های مهار و تحریکی در سیستم عصبی مرکزی اتفاق می‌افتد. از مهمترین علل ایجاد صرع می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: از بین رفتن مکانیسم‌های مهار به خصوص مهار سیناپسی با واسطه گابا (Gamma-Aminobutyric Acid (GABA)، تقویت مکانیسم‌های تحریک سیناپسی به خصوص تحریک سیناپسی با واسطه گیرنده (N-Methyl-D-Aspartic Acid (NMDA)، اختلال عملکردی کانال‌های یونی مانند کانال‌های پتاسیمی، سدیمی و کلسیمی، افزایش عوامل التهابی شامل IL-6، IL-1 β ، TNF- α ، استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو.^۶ گلوتامات (اسیدگلوتامیک) یک اسید آمینه غیر ضروری دی‌کربوکسیلیک است که در ساختارهای مختلف مغز انسان و حیوانات به عنوان انتقال‌دهنده عصبی تحریکی عمده حضور داشته و در اثرات فیزیولوژیک متعددی مانند تکامل مغز، انعطاف‌پذیری سیناپسی، حافظه و یادگیری مشارکت دارد. توانایی گلوتامات برای مشارکت در وظایف وسیع و متنوع به دلیل در دسترس بودن گیرنده‌های بسیار زیاد برای انتقال سیگنال آن است. یک‌دسته از این گیرنده‌ها به‌صورت کانال‌های یونی با نام گیرنده‌های یونوتروپیک گلوتامات هستند و براساس ویژگی‌های فارماکولوژیکی و الکتروفیزیولوژیکی به سه زیرواحد شامل گیرنده‌های NMDA، α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-(AMPA) و isoxazolepropionic acid و کینات تقسیم می‌شوند. دسته دیگر گیرنده‌های گلوتامات، گیرنده‌های متابوتروپیک هستند که به‌صورت مستقیم کانال‌های یونی را فعال نمی‌کنند، بلکه از طریق پروتئین‌های G سیستم‌های پیک دوم را در نوروها فعال می‌سازند. تاکنون هشت زیرواحد از گیرنده‌های متابوتروپیک گلوتامات شناسایی شده است که براساس توالی اسیدهای آمینه، مکانیسم‌های انتقال سیگنال‌ها و ویژگی‌های فارماکولوژیکی به سه گروه اصلی I، II و III تقسیم می‌شوند. این گیرنده‌ها بر اساس نوع زیرواحد به صورت پیش‌سیناپسی یا پس‌سیناپسی واقع شده‌اند و آزادسازی گلوتامات و سایر انتقال‌دهنده‌های عصبی را تنظیم می‌کنند.^۷ شواهد موجود نشان می‌دهد که تغییرات انتقال سیناپسی گلوتامینرژیک نقش مهمی در آغاز، تشدید و ادامه تشنج دارد و در صورت افزایش فعالیت گلوتامات

روش کار

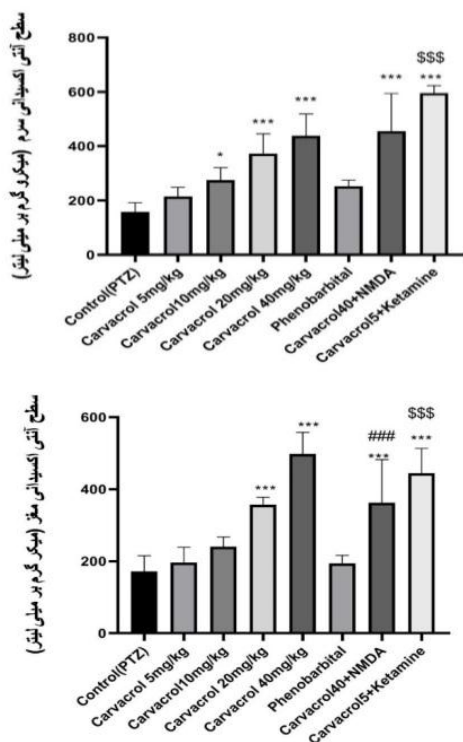
در این مطالعه تجربی (با کد اخلاقی IR.SKUMS.REC.1397.048) ۹۰ سر موش سوری نر نژاد NMRI در محدوده وزنی ۲۵-۳۵ گرم و سن تقریبی ۶-۸ هفته به ۹ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل که نرمال سالین را به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. گروهی که PTZ را با غلظت ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل وریدی و سالین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. موش‌هایی که فنوباریتال را به عنوان داروی استاندارد ضد تشنج با دوز ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم ۳۰ دقیقه قبل از PTZ دریافت کردند. گروه‌های مداخله که کارواکرول را با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ۳۰ دقیقه قبل از تزریق PTZ دریافت کردند.^{۱۸} گروهی که آنتاگونیست NMDA (کتامین، ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و دوز غیر موثر کارواکرول را ۳۰ دقیقه قبل از PTZ دریافت کردند.^{۱۹} و گروه آخر که آنتاگونیست NMDA و دوز موثر کارواکرول را ۳۰ دقیقه قبل از PTZ دریافت کردند.^{۱۹} کارواکرول از شرکت سیگما-آلدریج (Lot #:CRTA6315V APR/2021) خریداری شده و در نرمال سالین حل و رقیق سازی شده و در حجم ۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تزریق شد.^{۱۹} PTZ به صورت داخل وریدی و بقیه داروها به صورت داخل صفاقی تزریق شدند. دوزها بر اساس مطالعات قبل و همچنین مطالعات آزمایشی انتخاب شدند و دوزهای موثر و غیر موثر کارواکرول جهت مطالعه مداخله‌ای (Interventional Study) با آنتاگونیست و آنتاگونیست گیرنده NMDA تعیین شد. برای القا تشنج یک سوزن شماره ۳۰ به ورید دمی موش وارد شده و با چسب تثبیت شد و به وسیله پمپ سیژر PTZ با سرعت یک میلی‌لیتر بر دقیقه تزریق شد. به محض دیدن کلونوس اندام قدامی، تزریق متوقف شد. دوز حداقل PTZ برای ایجاد تشنج به عنوان دوز آستانه تشنج در نظر گرفته شد. در این روش، آستانه تشنج وابسته به دوز PTZ و مرتبط با زمان است.^{۱۹} ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل سرم و بافت هموزنه مغز توسط روش FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) تعیین شد. محلول کار FRAP با افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استات ۲۵/۰ میلی‌مولار با pH=۳، ۲/۵ میلی‌لیتر TPTZ (Tris(2-pyridyl)-s-triazine-۲,۴,۶) ۱۰ میلی‌مولار در هیدروکلریک اسید ۴۰ میلی‌مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن ۶ آبه ۲۰ میلی‌مولار تهیه شد. ۲۵ میکرولیتر از نمونه سرم یا بافت هموزنه با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول کار FRAP مخلوط شده و پس از ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب نوری در ۵۹۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتری ثبت شد.^{۲۰} میکرولیتر از سرم/بافت هموزنه مغز با ۱/۵ میلی‌لیتر اسید Thiobarbituric acid: ۲۰ درصد، ۱/۵ میلی‌لیتر تیوباربتوریک اسید (TBA) و ۰/۸ میلی‌لیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS (Sodium dodecyl sulfate

۸/۱ درصد مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری آب جوش قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها خنک شده و ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵ میلی‌لیتر مخلوط ان-بوتانول-پیریدین به آن‌ها اضافه و مخلوط شد. سپس مخلوط حاضر در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و جذب نوری محلول رویی در طول موج ۵۲۳ نانومتر ثبت شد.^{۲۱} در پایان آزمایش، موش‌ها کشته شدند و هیپوکامپ جدا شده و بیان ژن گیرنده NMDA (NR2A, NR2B) با روش Real-time PCR بررسی شد. واکنش برای هر یک از ژن‌ها به صورت سه تایی بوده و ۲ بار تکرار شد. پرایمرهای اختصاصی مورد نیاز نیز با نرم‌افزار Primer 3 نسخه ۰/۴/۰ (http://frodo.wi.mit.edu) طراحی شده و با استفاده از ژن H2afz به عنوان نرمالایزر، میزان تغییر بیان ژن‌های مورد نظر در مقایسه با گروه کنترل بررسی شد. داده‌ها با فرمول PFAFFL محاسبه شد.^{۲۲} داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل آماری شدند. طبیعی بودن داده‌ها با آزمون کولموگراف-اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها با آزمون لون بررسی شد. سپس جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد ثبت شدند و ($P < 0/05$) از نظر آماری معنی‌دار فرض شد.

یافته‌ها

نتایج مربوط به زمان تاخیر در شروع تشنج در موش‌های سوری در گروه‌های مورد مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به نتایج، زمان تاخیر شروع تشنج در موش‌های دریافت‌کننده کارواکرول ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده PTZ بود ($P < 0/001$) و ($P < 0/05$) ولی در گروه‌های دریافت‌کننده دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کارواکرول تفاوت معنی‌داری با گروه PTZ نداشت ($P > 0/05$). زمان تاخیر شروع تشنج در موش‌های کیندلینگ شده توسط PTZ تحت تیمار فنوباریتال به طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده PTZ بود ($P < 0/001$). زمان تاخیر شروع تشنج در موش‌های تحت تیمار آنتاگونیست NMDA و دوز غیر موثر کارواکرول به طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده PTZ بود ($P < 0/001$). زمان تاخیر شروع تشنج در موش‌های تحت تیمار آنتاگونیست NMDA و دوز موثر کارواکرول به طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده PTZ بود ($P < 0/001$). زمان تاخیر شروع تشنج در موش‌های تحت تیمار آنتاگونیست NMDA و دوز غیر موثر کارواکرول به طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده دوز غیر موثر کارواکرول بود ($P < 0/001$). زمان تاخیر شروع تشنج در

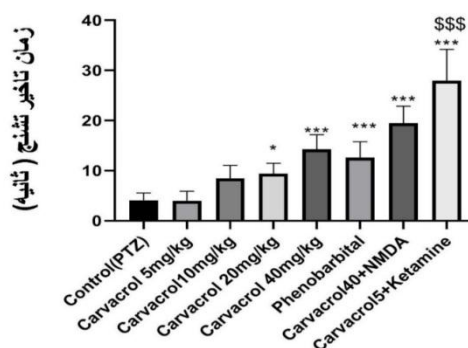
آنتی‌اکسیدانی بافت مغز در موش‌های دریافت‌کننده کارواکرول ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نتایج مربوط به سطح مالون‌دی‌آلدهید سرم در موش‌های سوری در شکل ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج، سطح مالون‌دی‌آلدهید سرم در موش‌های دریافت‌کننده کارواکرول ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه دریافت‌کننده PTZ بود ($P < 0/001$). سطح مالون‌دی‌آلدهید سرم در موش‌های دریافت‌کننده آنتاگونیست NMDA و دوز غیرموثر کارواکرول به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه دریافت‌کننده PTZ و گروه دریافت‌کننده دوز غیرموثر کارواکرول بود ($P < 0/001$). سطح مالون‌دی‌آلدهید سرم در موش‌های تحت تیمار توسط آگونیست NMDA و دوز موثر کارواکرول به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه دریافت‌کننده PTZ ($P < 0/001$) و بیشتر از گروه دریافت‌کننده دوز موثر کارواکرول بود ($P < 0/001$).



شکل ۲. سطح آنتی‌اکسیدان سرم و بافت هموزنه مغز در گروه‌های مورد مطالعه. * ($P < 0/05$) و *** ($P < 0/001$) اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل. \$\$\$ ($P < 0/001$) اختلاف معنادار با گروه دریافت‌کننده دوز غیرموثر کارواکرول (۵ mg/kg). ### ($P < 0/001$) اختلاف معنادار با گروه دریافت‌کننده دوز موثر کارواکرول (۴۰ mg/kg).

طبق شکل ۳، سطح مالون‌دی‌آلدهید بافت مغز در موش‌های دریافت‌کننده کارواکرول ۵ ($P < 0/05$)، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه دریافت‌کننده نرمال سالین بود ($P < 0/001$). سطح مالون‌دی‌آلدهید بافت مغز در موش‌های

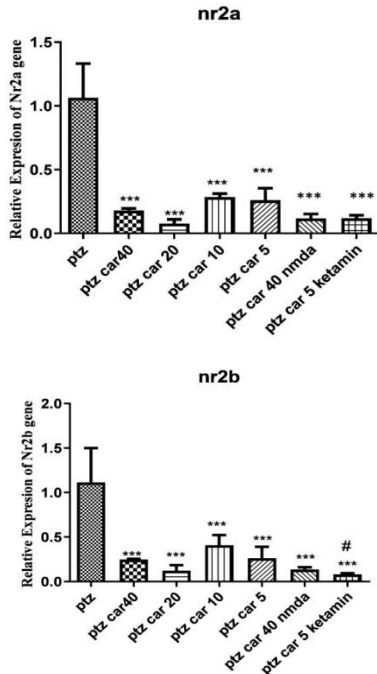
موش‌های تحت تیمار توسط آگونیست NMDA و دوز موثر کارواکرول تفاوت معنی‌داری با گروه دریافت‌کننده دوز موثر کارواکرول نداشت.



شکل ۱. زمان تاخیر تشنج در گروه‌های مورد مطالعه. * ($P < 0/05$) و *** ($P < 0/001$) اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل. \$\$\$ ($P < 0/001$) اختلاف معنادار با گروه دریافت‌کننده دوز غیرموثر کارواکرول (۵ mg/kg).

با توجه به نتایج (شکل ۲) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم در موش‌های دریافت‌کننده کارواکرول با دوز ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده PTZ بود ($P < 0/001$ و $P < 0/05$) ولی در گروه دریافت‌کننده دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کارواکرول تفاوت معنی‌داری با گروه PTZ نداشت ($P > 0/05$). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم در موش‌های تحت تیمار آنتاگونیست NMDA و دوز غیرموثر کارواکرول به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده PTZ بود ($P < 0/001$). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم در موش‌های تحت تیمار آنتاگونیست NMDA و دوز غیرموثر کارواکرول به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده PTZ بود ($P < 0/001$). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم در موش‌های تحت تیمار آنتاگونیست NMDA و دوز غیرموثر کارواکرول به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی‌داری با گروه نرمال سالین نداشت ($P > 0/05$). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مغز در موش‌های تحت تیمار آنتاگونیست NMDA و دوز غیرموثر کارواکرول به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده نرمال سالین و گروه دریافت‌کننده دوز موثر کارواکرول بود ($P < 0/001$). در موش‌های دریافت‌کننده آگونیست NMDA و دوز موثر کارواکرول، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت مغز به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده نرمال سالین و گروه دریافت‌کننده دوز موثر کارواکرول بود ($P < 0/001$). با توجه به نتایج شکل ۲ ظرفیت

تحت تیمار آنتاگونیست NMDA و دوز غیرموثر کارواکرول به طور معنی داری کمتر از گروه دریافت کننده نرمال سالین ($P < 0/001$) و گروه دریافت کننده دوز غیرموثر کارواکرول ($P < 0/01$) بود.

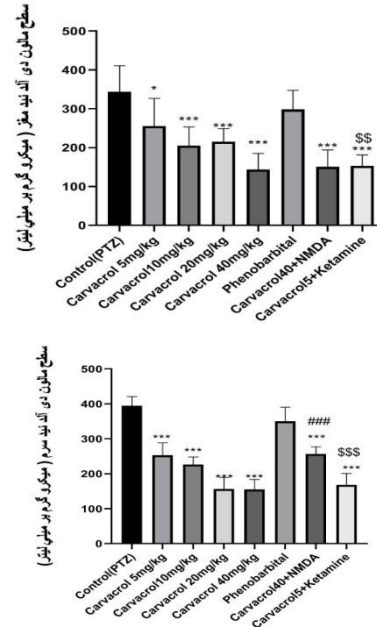


شکل ۴. بیان زیرواحدهای NR2A و NR2B رسپتورهای NMDA هیپوکامپ در گروه‌های مورد مطالعه $*** (P < 0/001)$ اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل. $## (P < 0/05)$ اختلاف معنادار با گروه دریافت کننده دوز غیرموثر کارواکرول (5 mg/kg) ptz. پنتیلین تترازول و car: کارواکرول.

بحث

بر اساس نتایج مطالعه زمان تاخیر شروع تشنج در موش‌های دریافت کننده کارواکرول افزایش یافت. طبق مطالعات پیشین، کارواکرول باعث کاهش نرخ بروز و افزایش زمان تاخیر شروع تشنج می‌شود و اثرات ضد تشنجی آن به دلیل فعالیت نوروپروتکتیو و جلوگیری از مرگ سلول‌های عصبی نواحی هیپوس و CA1 هیپوکامپ است.^{۱۷} مشخص شده که PTZ غلظت Ca درون سلولی را از طریق گیرنده‌های NMDA افزایش می‌دهد.^۶ به دنبال القا تشنج توسط PTZ، افزایش غلظت گلوتامات در فضای سیناپس و مایع خارج سلولی از طریق روند تاثیر تحریکی منجر به آسیب سلول‌های عصبی می‌شود. تجمع داخل سلول‌های عصبی از طریق گیرنده‌های NMDA مرحله کلیدی برای گسترش مرگ سلول‌های عصبی در اثر گلوتامات است.^۶ نشان داده شده که کیندلینگ PTZ باعث افزایش بیان زیرواحدهای NR2b گیرنده NMDA در هیپوکامپ شده و انسداد انتخابی زیرواحدهای NR2b توسط آیفنپروئیل (ifenprodil) سبب

سطح مالون دی‌آلدید مغز (میکروگرم بر میلی‌لیتر)



شکل ۳. سطح مالون دی‌آلدید سرم و بافت هموزنه مغز در گروه‌های مورد مطالعه. * $(P < 0/05)$ و $*** (P < 0/001)$ اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل. \$\$\$ $(P < 0/01)$ و $$$$ (P < 0/001)$ اختلاف معنادار با گروه دریافت کننده دوز غیرموثر کارواکرول (5 mg/kg) $#### (P < 0/001)$ اختلاف معنادار با گروه دریافت کننده دوز موثر کارواکرول (40 mg/kg).

سطح مالون دی‌آلدید بافت مغز در موش‌های تحت تیمار توسط آگونیست NMDA و دوز موثر کارواکرول به طور معنی داری کمتر از گروه دریافت کننده نرمال سالین بود ($P < 0/001$). با توجه به نتایج شکل ۴، بیان زیرواحد NR2A و NR2B گیرنده‌های NMDA هیپوکامپ در تمامی گروه‌های مورد مطالعه به طور معنی داری کمتر از گروه دریافت کننده PTZ بود ($P < 0/001$). بیان زیرواحد NR2A گیرنده‌های NMDA هیپوکامپ در موش‌های تحت تیمار توسط آنتاگونیست NMDA و دوز غیرموثر کارواکرول تفاوت معنی داری با گروه دریافت کننده دوز غیرموثر کارواکرول نداشت ($P > 0/05$). بیان زیرواحد NR2A گیرنده‌های NMDA هیپوکامپ در موش‌های تحت تیمار توسط آگونیست NMDA و دوز موثر کارواکرول تفاوت معنی داری با گروه دریافت کننده دوز غیرموثر کارواکرول نداشت ($P > 0/05$). بیان زیرواحد NR2B گیرنده‌های NMDA هیپوکامپ در موش‌های دریافت کننده آنتاگونیست NMDA و دوز غیرموثر کارواکرول به طور معنی داری کمتر از گروه دریافت کننده دوز غیرموثر کارواکرول بود ($P < 0/05$). بیان زیرواحد

زیرواحدهای NR2A و NR2B گیرنده‌های NMDA هیپوکامپ در موش‌های دریافت‌کننده کارواکرول کاهش یافته است. این نتایج نشان می‌دهد که کارواکرول اثرات ضدتشنجی از طریق مهار استرس اکسیداتیو و کاهش بیان زیرواحدهای NR2A و NR2B گیرنده‌های NMDA دارد.

قدردانی

نویسندگان از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد برای حمایت از این مطالعه سپاس‌گزاری می‌کنند. شماره پایان نامه (۱۴۹۵)

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد استان چهارمحال و بختیاری با شماره مرجع IR.SKUMS.REC.1397.048 تأیید شده است.

منابع مالی

از این طرح تحقیقاتی با شماره گرنت ۲۷۷۱ از طرف دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد حمایت مالی شده است (اگر مقاله طرح تحقیقاتی باشد).

منافع متقابل

مؤلف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از تالیف و یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مؤلفان

حسین امینی خوئی اجرا و تهیه دست نوشته، شکبیا نصیری بروجنی اجرا و تهیه دست نوشته، زهرا لری گوئینی محاسبات تحلیلی و تحلیل نتایج، سپیده یداللهی اجرا و تحلیل، سید کمال صولتی دهکردی تحلیل نتایج، محمود رفیعیان کوپائی طراحی مطالعه را عهده داشتند. همچنین مقاله را تالیف کرده و نسخه نهایی آن را خوانده و تأیید کرده‌اند.

بهبود معنی‌دار حملات تشنجی می‌شود.^{۱۴} مطابق با مطالعات یادشده کارواکرول سبب کاهش معنی‌دار بیان زیرواحدهای NR2a و NR2b گیرنده‌های NMDA هیپوکامپ شد که می‌توان اثرات ضدتشنجی آن را به تغییر بیان گیرنده‌های NMDA نسبت داد. کتامین یک آنتاگونیست غیرانتخابی گیرنده NMDA است که اثرات ضدتشنجی در برابر تشنج ناشی از PTZ از طریق بلوک پیام‌رسانی گلوتامانرژیک القا شده توسط گیرنده‌های NMDA نشان می‌دهد.^{۲۳} در مطالعه حاضر زمان تاخیر شروع تشنج در موش‌های تحت تیمار توسط آنتاگونیست NMDA به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه دریافت‌کننده دوز غیرمؤثر کارواکرول بود که تأییدکننده نقش ضدتشنجی کتامین است. مطالعات حیوانی نشان می‌دهد که القا حملات صرعی توسط PTZ با افزایش معنی‌دار پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز و همچنین سطوح گلوتامین در گلبول‌های قرمز، کبد و مغز همراه است.^{۲۴} مصرف بالای اکسیژن، حضور مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی به‌نسبت ضعیف، مغز را نسبت به استرس اکسیداتیو بسیار حساس ساخته است.^{۲۳} رادیکال‌های آزاد می‌توانند به‌طور مستقیم با غیرفعال کردن گلوتامین سنتتاز و گلوتامات دکربوکسیلاز و در نتیجه اختلال در فرآیند تولید ناقل‌های عصبی تحریکی (گوتامات) و مهار (GABA) تشنج‌های صرعی را تشدید کنند.^{۲۲} مطالعات نشان داده‌اند که کارواکرول سبب کاهش معنی‌دار MDA و افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، GSH-XP، CAT و GR و همچنین کاهش معنی‌دار مارکرهای استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو گردید.^{۱۳،۲۱} بر اساس نتایج مطالعه حاضر تیمار توسط کارواکرول سبب افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش معنی‌دار مالون‌دی‌آلدهید سرم و مغز شد که نشان می‌دهد کارواکرول از طریق کاهش مارکرهای استرس اکسیداتیو سبب تخفیف شدت تشنج و جلوگیری از آسیب سلول‌های عصبی شده است. نتایج نشان می‌دهد که آگونیست NMDA سبب تشدید استرس اکسیداتیو و آنتاگونیست NMDA سبب تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو شده که با مطالعات دیگر هم‌راستا است.^{۱۴}

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج، تیمار با کارواکرول باعث افزایش زمان تاخیر شروع تشنج، افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم و مغز و کاهش معنی‌دار مالون‌دی‌آلدهید سرم و مغز شد. بیان

References

1. Khalil A, Kovac S, Morris G, Walker MC. Carvacrol after status epilepticus (SE) prevents recurrent SE, early seizures, cell death, and cognitive decline. *Epilepsia*. 2017 Feb;58(2):263-73. doi: 10.1111/epi.13645
2. Tanaka A, Hata J, Akamatsu N, Mukai N, Hirakawa Y, Yoshida D, et al. Prevalence of adult epilepsy in a general Japanese population: The Hisayama study. *Epilepsia open*. 2019 Mar;4(1):182-6. doi: 10.1002/epi4.12295
3. Zhang YH, Burgess R, Malone JP, Glubb GC, Helbig KL, Vadlamudi L, et al. Genetic epilepsy with febrile seizures plus: refining the spectrum. *Neurology*. 2017 Sep 19;89(12):1210-9. doi: 10.1212/WNL.00000000000004384
4. Seinfeld SA, Pellock JM, Kjeldsen MJ, Nakken KO, Corey LA. Epilepsy after febrile seizures: twins suggest genetic influence. *J Pediatr Neurol*. 2016;55:14-6. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2015.10.008
5. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet*. 2019;1(2):5-9. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32596-0
6. Shamji MF, Fric-Shamji EC, Benoit BG. Brain tumors and epilepsy: pathophysiology of peritumoral changes. *Neur Rev*. 2009;32(3):275-85. doi: 10.1007/s10143-009-0191-7
7. Kłodzińska A, Bijak M, Chojnacka-Wojcik E, Krocicka B, Świąder M, Czuczwar SJ, et al. Roles of group II metabotropic glutamate receptors in modulation of seizure activity. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2000 Mar 1;361(3):283-8. doi: 10.1007/s002109900197
8. Bradford H. Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol*. 1995;47(6):477-511. doi: 10.1016/0301-0082(95)00030-5
9. Chapman A. Glutamate and epilepsy. *J Nutr*. 2000;130(4):1043-5. doi: 10.1093/jn/130.4.1043S
10. Bayer TA, Wiestler OD, Wolf HK. Hippocampal loss of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 mRNA in chronic temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol*. 1995;89(5):446-50. doi: 10.1007/BF00307650
11. Wang P, Luo Q, Qiao H, Ding H, Cao Y, Yu J, Liu R, Zhang Q, Zhu H, Qu L. The neuroprotective effects of carvacrol on ethanol-induced hippocampal neurons impairment via the antioxidative and antiapoptotic pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017 Jan 16;2017. doi: 10.1155/2017/4079425
12. Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F, Borji A. Protective effects of carvacrol against oxidative stress induced by chronic stress in rat's brain, liver, and kidney. *Biochem Res Int*. 2016;2016. doi: 10.1155/2016/2645237
13. Zhu X, Dong J, Shen K, Bai Y, Zhang Y, Lv X, et al. NMDA receptor NR2B subunits contribute to PTZ-kindling-induced hippocampal astrocytosis and oxidative stress. *Brain research bulletin*. 2015 May 1;114:70-8. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.04.002
14. Yu H, Zhang ZL, Chen J, Pei A, Hua F, Qian X, et al. Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *PloS one*. 2012 Mar 16;7(3):e33584. doi: 10.1371/journal.pone.0033584
15. Sadegh M, Sakhaie MH. Carvacrol mitigates proconvulsive effects of lipopolysaccharide, possibly through the hippocampal cyclooxygenase-2 inhibition. *Metabolic brain disease*. 2018 Dec;33(6):2045-50. doi: 10.1007/s11011-018-0314-3
16. Mishra RK, Baker MT. Seizure prevention by the naturally occurring phenols, carvacrol and thymol in a partial seizure-psychomotor model. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2014 Dec 1;24(23):5446-9. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.10.028
17. Amini-Khoei H, Kordjazy N, Haj-Mirzaian A, Amiri S, Haj-Mirzaian A, Shirzadian A, et al. Anticonvulsant effect of minocycline on pentylenetetrazole-induced seizure in mice: involvement of nitric oxide and N-methyl-D-aspartate receptor. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2018;96(8):742-50. doi: 10.1139/cjpp-2017-0673
18. Benzie IF, Devaki M. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. *J Med Sci*. 2018;1(2):77-106. doi: 10.1002/9781119135388

19. Jiang ZS, Pu ZC, Hao ZH. Carvacrol protects against spinal cord injury in rats via suppressing oxidative stress and the endothelial nitric oxide synthase pathway. *Mol Med Rep.* 2015;12(4):5349-54 .doi: 10.3892/mmr.2015.4045
20. Zhu X, Dong J, Shen K, Bai Y, Zhang Y, Lv X, et al. NMDA receptor NR2B subunits contribute to PTZ-kindling-induced hippocampal astrogliosis and oxidative stress. *Brain research bulletin.* 2015 May 1;114:70-8. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.04.002
21. Fang Y, Wang X. Ketamine for the treatment of refractory status epilepticus. *Seizure.* 2015;30:14-20. doi: 10.1016/j.seizure.2015.05.010
22. Obay BD, Taşdemir E, Tümer C, Bilgin HM, 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
23. Sudha K, Rao AV, Rao A. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clin Chim Acta.* 2001;303(1-2):19-24. doi: 10.1016/S0009-8981(00)00337-5