

اثرات ضد تشنجی هسپرتین در مدل حیوانی تشنج القا شده با پنتیلین تترازول

سعیده برادران (MSc)^۱، مریم قاسمی کاسمان (PhD)^{۲*}، آناهیتا ابراهیم پور (BSc)^۳، سید راحله احمدیان (BSc)^۱، مهدی پورامیر (PhD)^۲

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۳- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

دریافت: ۹۷/۵/۱۴، اصلاح: ۹۷/۶/۲۶، پذیرش: ۹۷/۶/۳۱

خلاصه

سابقه و هدف: هسپرتین به عنوان فلاونوئید مهم مرکبات، دارای خواص فارماکولوژیکی متعددی از جمله اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است. در این مطالعه، اثرات هسپرتین بر رفتار تشنجی و عملکرد آن بر ظرفیت تام آنتی اکسیدانی و شاخص پراکسیداسیون لیپید در مدل تشنج القا شده با پنتیلین تترازول بررسی شده است. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۵ سر موش NMRI در پنج گروه ۷ تایی کنترل، سالی و دوزهای ۱۰، ۲۰، ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم هسپرتین تقسیم شدند. حیوانات به مدت هفت روز و به صورت خوراکی مداخلات مورد نظر را دریافت کردند. در روز هفتم، سی دقیقه پس از گاوژ، تشنجات با تزریق داخل صفاقی تک دوز پنتیلین تترازول با دوز ۶۰ میلی گرم/کیلوگرم القا شد. پس از ثبت علائم رفتاری تشنج شامل تاخیر آغاز انقباضات میوکلونیک، تاخیر آغاز و طول دوره زمان تشنجات عمومی تونیک کلونیک و زمان مرگ، اندازه گیری ظرفیت تام آنتی اکسیدان (FRAP) و ماده واکنش پذیر اسید تیوباربیتریک (TBARS) بافت هیپوکامپ انجام و مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته ها: پیش درمان با هسپرتین به طور معنی داری سبب افزایش تاخیر زمانی آغاز انقباضات میوکلونیک (هسپرتین ۵۰: 35 ± 22 ثانیه، $p = 0.003$) و تاخیر آغاز تشنجات عمومی تونیک کلونیک (هسپرتین ۱۰: 48 ± 21 ثانیه، $p = 0.003$; هسپرتین ۲۰: $26 \pm 83/5$ ثانیه، $p = 0.001$; هسپرتین ۵۰: $30 \pm 34/5$ ثانیه، $p = 0.004$) گردید. اعمال هسپرتین در دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت معنی داری سبب کاهش مقادیر TBARS در مقایسه با گروه سالی و دوزهای ۲۰ و ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم هسپرتین ($p < 0.001$) گشت. هیچ گونه تفاوت معنی داری در سطوح FRAP بین گروه های مختلف آزمایش مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه بیانگر این است که هسپرتین ممکن است به عنوان درمان کمکی در بیماری صرع موثر باشد.

واژه های کلیدی: هسپرتین، تشنج، پنتیلین تترازول.

مقدمه

شناختی و آسیب های مغزی را کاهش می دهند (۵۶). فلاونوئیدها از ترکیبات پلی فنولیک موجود در بسیاری از میوه ها، سبزیجات می باشند و گزارشات متعددی اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی آن ها را تایید می کنند (۷-۱۰). هسپرتین موجود در پوست مرکبات که خواص درمانی گسترده تری نسبت به فرم قند دار این فلاونوئید، هسپردین، دارا می باشد، پتانسیل محافظت کنندگی عصبی خود را با استفاده از خواص تجزیه رادیکالی و کاهش سطوح کلسیم و کاسپاز-۳ از سلول های PC-12 در برابر سمیت ناشی از پراکسید هیدروژن نشان می دهد (۱۱ و ۱۲). همچنین مطالعات بسیاری نشان می دهند که هسپرتین با افزایش آنزیم های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز می تواند ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی را افزایش دهد (۱۳ و ۱۴). مطالعه Kumar و همکاران نشان می دهد که هسپردین، فرم قند دار هسپرتین، دارای خواص ضد تشنجی قابل توجهی در مدل شیمیایی القا شده با پنتیلین تترازول (PTZ) می باشد. همچنین، نتایج این بررسی نشان داد که هسپرتین با افزایش گلوکاتامات، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و کمپلکس های

صرع سومین اختلال عصبی با تشنجهای غیر قابل پیش بینی و کاهش عملکردهای شناختی می باشد که مطالعات پیشین، آزاد شدن فاکتورهای التهابی از سلول های گلیال فعال شده را به عنوان نقش اصلی در پیدایش این بیماری معرفی کردند (۱ و ۲). علاوه بر این، فعالیت تشنجی در طول صرع سبب کاهش مکانیسم دفاع آنتی اکسیدانی و افزایش میزان رادیکال های آزاد می گردد که به نوبه خود سبب تشدید استرس اکسیداتیو در مغز می شود. رادیکال های آزاد در پراکسیداسیون لیپید، ادم مغزی و بیماری صرع نقش با اهمیتی دارند (۳). داروهای بی شماری جهت درمان بیماری صرع ابداع شده اند، اما حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد از بیماران به درمان های رایج در بیماری صرع پاسخ نمی دهند. همچنین، درمان مداوم و طولانی مدت داروهای ضد صرع زمینه بروز عوارض جانبی متعدد داروها را فراهم می کند (۳). در سال های اخیر استفاده از داروهای گیاهی به علت پراکندگی وسیع، بازده نسبی، اثرات جانبی کمتر و قیمت ارزان در مقایسه با دیگر داروها افزایش یافته است (۴). گزارشات پیشین ثابت کرده اند که آنتی اکسیدان های طبیعی همانند پلی فنول ها، عملکردهای

* مسئول مقاله: دکتر مریم قاسمی کاسمان

آدرس: بابل، دانشگاه علوم پزشکی، پژوهشکده سلامت، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی. تلفن: ۰۱۱-۳۲۱۹۰۵۵۷

E-mail: m.ghaseemi@mubabol.ac.ir

لذا بافت هیپوکامپ جهت بررسی های بیوشیمیایی خارج و مورد بررسی قرار گرفت. میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپید با استفاده از روش FRAP و TBARS مورد بررسی قرار گرفت.

ایجاد مدل تشنج: جهت ایجاد مدل حاد تشنج، از تزریق داخل صفاقی PTZ با دوز ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم استفاده گردید (۲۰). پس از تزریق PTZ، حیوانات به مدت ۲۰ دقیقه با دوربین فیلم برداری مانیتور شدند و علائم رفتاری تشنج مورد بررسی قرار گرفت. کرد. علائم رفتاری تشنج به صورت مرحله ۰ = بدون پاسخ، مرحله ۱ = انقباض عضلات صورت و گوش ها، مرحله ۲ = انتشار موج انقباضی در طول بدن و حرکت سر به طرف بالا و پایین، مرحله ۳ = پرش های میوکلونیک، مرحله ۴ = ایستادن روی دو پا و کلونوس اندام های جلویی و مرحله ۵ = حملات عمومی تونیک کلونیک و از دست رفتن رفلکس ایستادن، طبقه بندی شدند (۱۹).

اندازه گیری ظرفیت تام آنتی اکسیدانی: پس از ثبت علائم رفتاری، حیوانات ابتدا با کتامین (۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم) بیهوش شده و بافت هیپوکامپ سریعاً خارج و به میکروتیوپ منتقل گردید و در فریز -۸۰ درجه سانتیگراد تا زمان انجام سنجش های بیوشیمیایی، نگهداری شدند. هر بافت هیپوکامپ به نسبت وزنی یکسان در ۰/۵ میکرولیتر از نرمال سالین به خوبی هموژنیزه شد و پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰g، سوپ حاصل جهت بررسی های بیوشیمیایی مورد آنالیز قرار گرفت. یک و نیم میلی لیتر معرف آماده به کار FRAP شامل (بافراستات، معرف TPTZ و محلول کلرور فریک به نسبت به ترتیب ۱۱:۱:۱) به تمام لوله های آزمایش اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد. در مرحله بعد ۵۱ میکرولیتر از نمونه (عصاره بافت و یا استانداردهای مختلف) به لوله های مربوطه اضافه و به خوبی مخلوط گشته و مجدداً ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از طی این زمان شدت رنگ در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل بلانک (۱/۵ میلی لیتر محلول FRAP و ۵۰ میکرولیتر آب مقطر) با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. مقادیر جذب به دست آمده با استفاده از منحنی استاندارد که با کمک محلول سولفات آهن در غلظت های ۱۲۵-۲۵۰-۲۵۰-۵۰۰-۱۰۰۰ میکرومولار به عنوان استاندارد رسم شد؛ به غلظت تبدیل گردید (۲۱). لوله ها به صوت تری پلیکیت استفاده شد.

سنجش TBARS: جهت سنجش TBARS یک میلی لیتر از عصاره بافت با ۲ میلی لیتر معرف TBARS مخلوط گشت و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شد (۲۲).

آنالیز آماری: داده ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

تزریق دوز حاد پنتیلین تترازول منجر به شروع حملات شدید تشنجی در مدت زمان ۵۱۶۴/۹۵± ثانیه در گروه سالیین شد. اگرچه پیش درمان با دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم هسپرتین سبب تأخیر در شروع حملات تشنجی گردید (دوز ۱۰: ۱۶/۱۷±۴/۱۲ ثانیه، دوز ۲۰: ۱۵/۱۷±۲/۹۶ ثانیه) اما در مقایسه با گروه سالیین، این تفاوت معنی دار نبود (در گروه هسپرتین ۱۰: ۳۷۰۳/۰۰۳، $P=0$ ، در گروه هسپرتین

میتوکندریایی و همچنین کاهش سطوح مالون دی آلدئید و نیترات اثرات ضد تشنجی خود را در گروه های دریافت کننده پنتیلین تترازول اعمال می کند (۱۵). علاوه بر این نشان داده شده است که عصاره آبی *Citrus aurantium* سبب افزایش آستانه تشنج در ماهی گوره خری می گردد (۱۶). مدل های تجربی جهت القاء صرع، امکان تجزیه و تحلیل مکانیزم ها و عوامل مستعد کننده صرع و ارزیابی داروهای ضد تشنج و روش های درمانی جدید را فراهم می کنند (۱۷). یکی از مدل های حیوانی رایج، مدل ایجاد تشنج حاد با تزریق PTZ است. PTZ به عنوان آنتاگونیست گیرنده های مهاری گابا نوع A سبب ایجاد تشنج می گردد (۱۸). بر اساس شواهد موجود، تاکنون مطالعه ای جهت بررسی اثرات پیش درمان هسپرتین بر پارامترهای تشنجی، ظرفیت تام آنتی اکسیدانی و شاخص پراکسیداسیون لیپید انجام نگرفته است.

لذا این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات ضد تشنجی هسپرتین بر روی موش سوری در مدل تشنج حاد القا شده با پنتیلین تترازول طراحی شده است. علاوه بر این، میزان پراکسیداسیون لیپید و شاخص آنتی اکسیدان به ترتیب توسط اندازه گیری Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) و اندازه گیری ظرفیت تام آنتی اکسیدانی Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

داروها: پنتیلین تترازول و هسپرتین (با درجه خلوص ۹۵ درصد) از شرکت سیگما-آلدريج (آلمان) تهیه و در نرمال سالین حل شدند.

حیوانات: در این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بابل (MUBABOL.HRI.REC.1396.98)، موش های کوچک آزمایشگاهی سفید نر از نژاد NMRI در محدوده وزنی ۲۵-۳۰ گرم از اتاق حیوانات دانشگاه علوم پزشکی بابل تهیه و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی بدون محدودیت به دسترسی به آب و غذا نگهداری شدند. قبل از انجام آزمایشات، حیوانات توزین و علامت گذاری شده و به آزمایشگاه منتقل شدند و ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه باقی ماندند تا به محیط عادت کنند.

گروه بندی آزمایش: تعداد ۳۵ سر موش به صورت تصادفی در ۵ گروه ۷ تایی کنترل، سالیین و گروه های دریافت کننده دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم هسپرتین تقسیم شدند.

گروکل کنترل: در این گروه حیوانات هیچ گونه مداخله ای دریافت نمی کردند.

گروه سالیین+پنتیلین تترازول: در این گروه حیوانات پیش درمان سالیین به عنوان حلال هسپرتین را به صورت گاوژ به مدت یک هفته دریافت کردند و نیم ساعت پس از آخرین گاوژ سالیین، PTZ با دوز ۶۰ میلی گرم را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

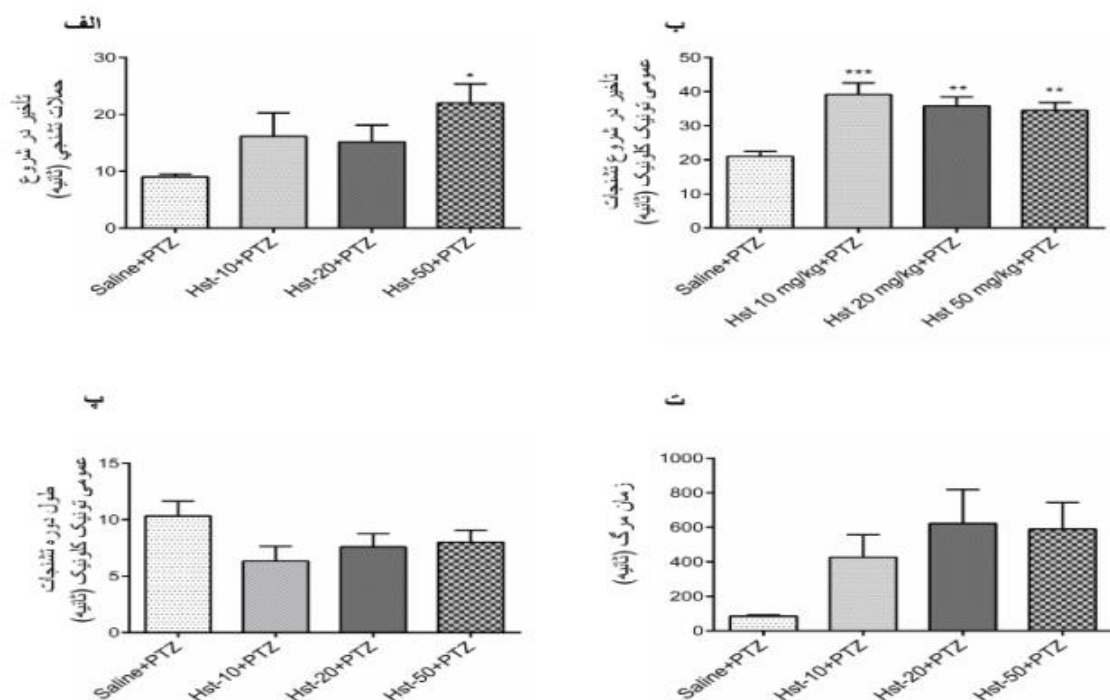
گروه های دریافت کننده هسپرتین+پنتیلین تترازول: در این گروه ها، هسپرتین با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی به مدت یک هفته تجویز شد (۱۴) و نیم ساعت پس از آخرین گاوژ هسپرتین، پنتیلین تترازول به صورت داخل صفاقی تزریق شد. حیوانات به مدت ۲۰ دقیقه پس از تزریق PTZ جهت ثبت علائم رفتاری تشنج مانیتور شدند. از آنجاییکه بافت هیپوکامپ در طی تزریقات صرع یکی از مهم ترین مناطقی است که دچار آسیب نوروئی می گردد (۱۹)؛

مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبود (نمودار ۱-ت). بنابراین نتایج موید این است که اعمال هسپرتین در برخی از دوزهای مورد استفاده سبب کاهش تظاهرات رفتاری تشنج می‌گردد.

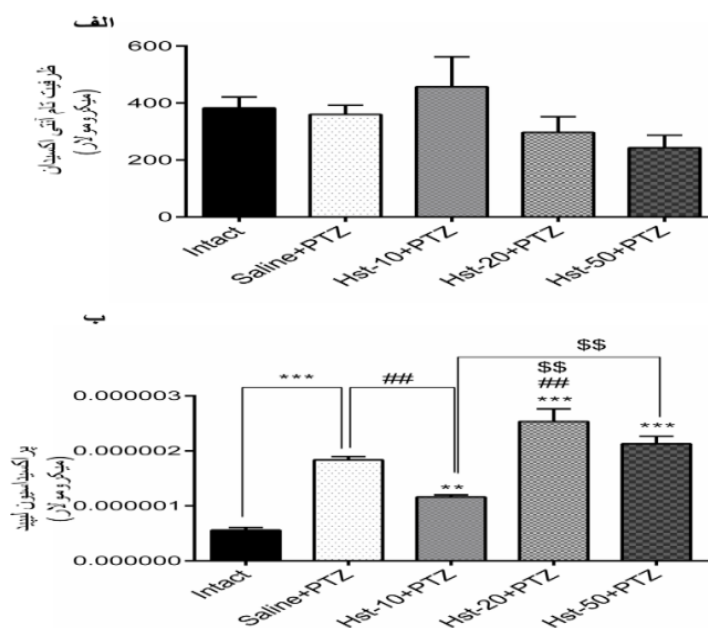
نتایج این پژوهش نشان داد که اگرچه اعمال پنتیلن ترازول سبب کاهش ظرفیت تام آنتی اکسیدان در گروه های دریافت کننده سالیین $360/1 \pm 32/08$ میکرومولار، هسپرتین با دوزهای ۲۰ $297/3 \pm 54/90$ میکرومولار، 50 $243/4 \pm 43/35$ میکرومولار، 50 $0/8564$ $(p=)$ و 50 $0/5009$ $(p=)$ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل $382/9 \pm 38/59$ میکرومولار) گردید، اما این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی دار نبودند. اگرچه در مقایسه با گروه دریافت کننده سالیین، اعمال هسپرتین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم $457/1 \pm 105/8$ میکرومولار) منجر به افزایش شاخص آنتی اکسیدانی گردید، اما این تفاوت معنی دار نبود (نمودار ۲-الف). علاوه بر این، بررسی شاخص پراکسیداسیون لیپید با استفاده از تست TBARS نشان داد که میزان پراکسیداسیون لیپید به صورت معنی دار در حیوانات دریافت کننده سالیین، در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت $(p < 0/0001)$. همچنین، در مقایسه با گروه کنترل، میزان شاخص اکسیداسیون لیپید در گروه های دریافت کننده دوز 10 $(p < 0/0001)$ ، 20 $(p < 0/0001)$ و 50 $(p < 0/0001)$ به صورت معنی دار افزایش یافت. اعمال دوز پایین هسپرتین 10 میلی گرم بر کیلوگرم) سبب کاهش معنی دار در میزان TBARS در مقایسه با گروه سالیین گردید $(p < 0/003)$. علاوه بر این نتایج ما بیانگر این بود که تفاوت معنی دار در شاخص پراکسیداسیون لیپید بین دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم هسپرتین با دوزهای ۲۰ $(p < 0/0001)$ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وجود دارد $(p < 0/0001)$. پیش درمان با هسپرتین، به خصوص دوز پایین آن سبب کاهش سطح پراکسیداسیون لیپید گردید (نمودار ۲-ب).

۲۰: $0/4977$ $(p=)$ در مقایسه با گروه سالیین، اعمال هسپرتین در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سبب افزایش معنی داری در زمان شروع حملات تشنجی گردید $(p = 0/032 \pm 3/35)$.

علاوه بر این نتایج مطالعه ما نشان داد که هیچ تفاوت معنی داری بین گروه های دریافت کننده هسپرتین وجود ندارد (نمودار ۱-الف). بررسی زمان تاخیر در تشنجات عمومی تونیک کلونیک نشان داد که اعمال دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم هسپرتین $39/20 \pm 3/35$ (ثانیه) به طور موثری سبب افزایش زمان این پارامتر در مقایسه با گروه سالیین $21/1 \pm 1/48$ (ثانیه) می‌گردد $(p = 0/0003)$. علاوه بر این، در مقایسه با حیوانات دریافت کننده سالیین، پیش درمان با دوزهای ۲۰ $35/83 \pm 2/6$ (ثانیه) و ۵۰ $34/5 \pm 2/30$ (ثانیه) میلی گرم بر کیلوگرم نیز به طور معنی داری سبب افزایش زمان شروع تشنجات عمومی تونیک کلونیک گردید (هسپرتین ۲۰: $p = 0/001$ ، هسپرتین ۵۰: $p = 0/004$) (نمودار ۱-ب). اندازه گیری پارامتر طول دوره تشنجات عمومی تونیک کلونیک بیانگر این بود که اگرچه در مقایسه با سالیین $10/33 \pm 1/308$ (ثانیه)، پیش درمان با هسپرتین در دوزهای ۲۰ و ۵۰ سبب کاهش دوره تشنجات عمومی تونیک کلونیک شد، اما این تفاوت معنی دار نبود (دوز ۲۰: $7/6 \pm 1/16$ ثانیه، $p = 0/43$ ؛ دوز ۵۰: $8 \pm 1/065$ ثانیه، $p = 0/52$). همچنین، دوز ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن هسپرتین سبب کاهش موثرتری در مقایسه با دیگر دوزهای پیشنهادی شد، اما این تفاوت معنی دار نبود $6/33 \pm 1/30$ (ثانیه، $p = 0/11$) (نمودار ۱-پ). علاوه بر این اندازه گیری زمان مرگ (از زمانی که PTZ تزریق می‌گردد تا زمان مرگ حیوانات) در گروه های پیش تیمار شده با دوزهای مختلف هسپرتین (دوز ۱۰: $426/2 \pm 131/1$ ثانیه، $p = 0/36$ ؛ دوز ۲۰: $621/8 \pm 197/3$ ثانیه، $p = 0/087$ ؛ دوز ۵۰: $589/3 \pm 154/5$ ثانیه، $p = 0/095$) در مقایسه با گروه کنترل $85/20 \pm 6/748$ (ثانیه) افزایش نشان داد اما این افزایش در



نمودار ۱. اثر پیش درمان هسپرتین بر تاخیر آغاز انقباضات میوکلونیک (الف)، تاخیر آغاز تشنجات عمومی تونیک کلونیک (ب)، طول دوره زمان تشنجات عمومی تونیک کلونیک (پ) و زمان مرگ (ت). $p < 0/05$ ، $p < 0/01$ و $p < 0/001$ در مقایسه با گروه سالیین. تعداد حیوانات در هر گروه (n=7)



نمودار ۲. اثر پیش درمان هسپرتین بر ظرفیت تام آنتی اکسیدان (الف) و شاخص پراکسیداسیون لیپید (ب). $p < 0.01$ و $p < 0.001$ *** در مقایسه با گروه intact $p < 0.01$ ## در مقایسه با گروه سالین و $p < 0.01$ \$\$\$ در مقایسه با گروه هسپرتین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم. تعداد حیوانات در هر گروه (n=۷).

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه بیانگر این است که پیش درمان با هسپرتین سبب کاهش برخی از علائم رفتاری تشنج می‌گردد. علاوه بر این، میزان پراکسیداسیون لیپید در حیوانات دریافت کننده دوز پایین هسپرتین کاهش یافت. مطالعه قبلی بیانگر این مطلب بود که اعمال هسپرتین و فرم آگلیکون آن (هسپرتین) سبب کاهش فعالیت الکتریکی نورون‌های هرمی هیپوکامپ در شرایط *in vitro* می‌گردد (۲۳). مطالعه Rosa-Falero و همکاران نشان داد که اعمال عصاره آبی گیاه *Citrus aurantium*، مدت زمان لازم برای وقوع حملات تشنجی را افزایش می‌دهد و این عمل از طریق گیرنده‌های NMDA، mGluR's I و II تعدیل می‌گردد (۱۶). همچنین، مطالعه Kumar و همکاران نشان داد که هسپرتین از طریق اثر بر گیرنده‌های مهاری گابا و بنزودیازپین اثرات ضد تشنجی خود را در مدل تشنج القا شده با پنتیلن تترازول اعمال می‌کند (۲۴). مشابه با این مطالعات، نتیجه مطالعه ما نیز نشان داد که پیش درمان با هسپرتین سبب کاهش تظاهرات رفتاری تشنج در مدل تشنج القا شده با پنتیلن تترازول گردید.

به منظور یافتن مکانیسم احتمالی اثرات ضد تشنجی هسپرتین، میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدان و شاخص اکسیداسیون لیپید در بافت هیپوکامپ مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج مطالعه ما حاکی از آن بود که دوز پایین هسپرتین سبب کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید در بافت هیپوکامپ گردید. سازگار با نتایج مطالعه ما، مطالعه قبلی توسط Kumar و همکاران نیز نشان داد که اعمال هسپرتین سبب کاهش استرس اکسیداتیو، اختلال عملکرد میتوکندری و اختلالات شناختی در مدل کیندلینگ القا شده با پنتیلن تترازول می‌گردد. نتایج این مطالعه بیانگر این است که بخشی از اثرات حفاظت کننده نورونی هسپرتین احتمالاً از طریق تعدیل مسیر نیتریک اکساید حاصل می‌شود (۱۵). مطالعات فراوانی موید نقش موثر هسپرتین در کاهش استرس اکسیداتیو هستند (۲۷-۲۵). مطالعات پیشین نشان داد که هسپرتین و فرم نانوکریستال آن، به طور موثری می‌تواند سبب کاهش استرس اکسیداتیو و

افزایش آنتی اکسیدان بافت مغز در مدل حیوانی بیماری آلزایمر و اتیسم گردد (۲۸ و ۱۴). همچنین نتایج مطالعه برادران و همکاران نشان داد که اعمال هسپرتین به طور موثری سبب کاهش فعالیت سلول‌های گلیال و وسعت ناحیه دمیلیاسیون در مدل دمیلیاسیون موضعی در کیاسمای بینایی می‌گردد (۲۹).

گفته شده است که هسپرتین، نقش آنتی اکسیدانی خود را از دو طریق، یکی با مهار مستقیم رادیکال‌ها و دیگری افزایش دفاع آنتی اکسیدانی سلول اجرا می‌کند. بدین ترتیب از DNA، پروتئین‌ها و بافت‌ها در برابر آسیب عوامل ذاتی همانند تومورها و عوامل بیرونی مانند تابش، التهاب و سموم محافظت می‌کند. هسپرتین ممکن است تولید ROS را مهار کند و از ایجاد آبشار آپوپتوز که منجر به مرگ سلولی می‌گردد، جلوگیری کند (۳۰). این ترکیب ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی خود را به وسیله القاء هموکسیژناز -۱ از طریق سیگنالینگ ERK/Nrf2 افزایش می‌دهد. این القاء همچنین می‌تواند بیان ژن و سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون (GST) را افزایش دهد. علاوه بر این، هسپرتین مکانیسم‌های متعدد محافظت نورونی از جمله ممانعت از شکل‌گیری ROS و فعالیت کاسپاز ۳، کاهش در آسیب غشاء و DNA، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، تعمیر و نگهداری هموستازی کلسیم و پتانسیل میتوکندری و تنظیم سیگنالینگ بقا سلولی را نشان می‌دهد (۳۱ و ۹). علی‌رغم شواهد ذکر شده در مورد اثرات هسپرتین بر افزایش ظرفیت آنتی اکسیدان، در بررسی حاضر ما نتوانستیم تفاوت معنی داری بین گروه‌های مورد مطالعه ببیم. هر چند در مقایسه با دیگر گروه‌های دریافت کننده هسپرتین، دوز پایین هسپرتین توانست سبب افزایش ظرفیت تام آنتی اکسیدان گردد، اما این تفاوت معنی دار نبود.

نکته جالب توجه در مطالعه ما این بود که در حالی که دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم هسپرتین سبب کاهش سطح TBARS می‌گردد؛ اعمال دوزهای بالای آن (۲۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) سبب افزایش شاخص پراکسیداسیون لیپید

تشنج می‌گردد. اگرچه به نظر می‌رسد بخشی از عملکرد ضدتشنجی هسپرتین از طریق اثرات آن بر کاهش سطح شاخص پراکسیداسیون لیپید تعدیل می‌شود؛ اما مطالعات بیشتری جهت شناسایی مکانیسم دقیق اثرات ضدتشنجی هسپرتین مورد نیاز است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بابل در اجرای این مطالعه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

می‌گردد. مطابق با نتایج ما، مطالعه Bouayed و همکاران نیز نشان داد که اگرچه ترکیبات طبیعی با خواص آنتی اکسیدانی می‌توانند در کاهش سطح استرس اکسیداتیو مفید واقع باشند اما دوزهای بالای آنها، ممکن است خواص توکسیک داشته باشد و سبب افزایش وضعیت استرس اکسیداتیو در بدن گردند (۳۲). علاوه بر این، خدیر و همکاران نیز نشان داد که آرپوتین، فرم گلیکوزیده هیدروکینون موجود در میوه گلابی وحشی (تلکا) در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی را افزایش می‌دهد در حالی که دوز بالای آن (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) سبب افزایش میزان TBARS می‌گردد (۳۳). به طور کلی نتایج این مطالعه بیانگر این است که پیش درمان با هسپرتین سبب کاهش علائم رفتاری

Anticonvulsant Effects of Hesperetin in Animal Model of Pentylentetrazole-Induced Seizures

S. Baradaran (MSc)¹, M. Ghasemi-Kasman (PhD)^{*2}, A. Ebrahimpour (BSc)³,
S.R. Ahmadian (BSc)¹, M. Pouramir (PhD)²

1. Student Research Committee, Faculty of Medical Sciences, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran

2. Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran

3. Neuroscience Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(11); Nov 2018; PP: 19-26

Received: Aug 5th 2018, Revised: Sep 17th 2018, Accepted: Sep 22nd 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Hesperetin as the main flavonoid in citrus possesses various pharmacological properties including anti-oxidant and anti-inflammatory effects. In this study, the effects of hesperetin on seizures behavior and its function on total antioxidant capacity and lipid peroxidation has been investigated in pentylentetrazol (PTZ)-induced seizures model.

METHODS: In this experimental study, thirty-five NMRI mice were divided into five experimental groups (n=7) as control, saline and hesperetin at doses of 10, 20 or 50 mg/kg. Animals received orally the related interventions for 7 days. On day 7, 30 minutes after oral gavage, convulsion was induced by single intraperitoneal (i.p.) injection of PTZ at dose of 60 mg/kg. After recording of convulsion behaviors including latency to myoclonic jerks, latency and duration of generalized tonic-clonic seizures, time to death, measuring of Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was carried out in hippocampus tissues.

FINDINGS: Pretreatment with hesperetin at dose of 50 mg/kg significantly increased the latency of myoclonic jerks (hesperetin 50: 22±3.35 s, p=0.032) and generalized tonic-clonic seizures (hesperetin 10: 1±21.48 s, p=0.0003, hesperetin 20: 35.2±83.6 s, 0.001, hesperetin 50: 34.5±2.30 s, p=0.004). The use of hesperetin at dose of 10 mg/kg significantly reduced TBARS values compared to saline (p<0.003) and doses of 20 and 50 mg/kg hesperetin (p<0.0001). Any significant difference in FRAP levels was not observed between different experimental groups.

CONCLUSION: The results of study indicate that hesperetin might be effective as supplementary treatment in epilepsy disorder.

KEY WORDS: Hesperetin, Convulsion, Pentylentetrazol.

Please cite this article as follows:

Baradaran S, Ghasemi-Kasman M, Ebrahimpour A, Ahmadian SR, Pouramir M. Anticonvulsant Effects of Hesperetin in Animal Model of Pentylentetrazole-Induced-Seizures. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(11):19-26.

* Corresponding Author: M. Ghasemi-Kasman (PhD)

Address: Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran

Tel: +98 11 32190557

E-mail: m.ghasemi@mubabol.ac.ir

References

1. McNamara J. Kindling model of epilepsy. *Adv Neurol*. 1986;44:303-18.
2. Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci*. 2013;36(3):174-84.
3. Diniz TC, Silva JC, de Lima-Saraiva SR, Ribeiro FP, Pacheco AG, de Freitas RM, et al. The role of flavonoids on oxidative stress in epilepsy. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015: 171756.
4. Edraki M, Akbarzadeh A, Hosseinzadeh M, Tanideh N, Salehi A, Koochi-Hosseiniabadi O. Healing effect of sea buckthorn, olive oil, and their mixture on full-thickness burn wounds. *Adv Skin Wound Care*. 2014;27(7):317-23.
5. Bisson JF, Nejdi A, Rozan P, Hidalgo S, Lalonde R, Messaoudi M. Effects of long-term administration of a cocoa polyphenolic extract (Acticoa powder) on cognitive performances in aged rats. *Br J Nutr*. 2008;100(1):94-101.
6. Head E. Oxidative damage and cognitive dysfunction: antioxidant treatments to promote healthy brain aging. *Neurochem Res*. 2009;34(4):670-8.
7. Nones J, de Sampaio Spohr TCL, Gomes FCA. Effects of the flavonoid hesperidin in cerebral cortical progenitors in vitro: indirect action through astrocytes. *Int J Dev Neurosci*. 2012;30(4):303-13.
8. Iranshahi M, Rezaee R, Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F. Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. *Life Sci*. 2015;137:125-32.
9. Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother Res*. 2015;29(3):323-31.
10. Kanaze F, Bounartzi M, Georgarakis M, Niopas I. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *Eur J Clin Nutr*. 2007;61(4):472-7.
11. Kobayashi S, Tanabe S, Sugiyama M, Konishi Y. Transepithelial transport of hesperetin and hesperidin in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(1):33-41.
12. Hwang SL, Yen GC. Neuroprotective effects of the citrus flavanones against H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cells. *J Agric Food Chem*. 2008;56(3):859-64.
13. Chen MC, Ye YY, Ji G, Liu JW. Hesperidin upregulates heme oxygenase-1 to attenuate hydrogen peroxide-induced cell damage in hepatic L02 cells. *J Agric Food Chem*. 2010;58(6):3330-5.
14. Kheradmand E, Hajizadeh Moghaddam A, Zare M. Neuroprotective effect of hesperetin and nano-hesperetin on recognition memory impairment and the elevated oxygen stress in rat model of Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*. 2018;97:1096-101.
15. Kumar A, Lalitha S, Mishra J. Possible nitric oxide mechanism in the protective effect of hesperidin against pentylenetetrazole (PTZ)-induced kindling and associated cognitive dysfunction in mice. *Epilepsy Behav*. 2013;29(1):103-11.
16. Rosa-Falero C, Torres-Rodríguez S, Jordán C, Licier R, Santiago Y, Toledo Z, et al. Citrus aurantium increases seizure latency to PTZ induced seizures in zebrafish thru NMDA and mGluR's I and II. *Front Pharmacol*. 2015;5:284.
17. Mandhane SN, Aavula K, Rajamannar T. Timed pentylenetetrazol infusion test: a comparative analysis with sc PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice. *Seizure*. 2007;16(7):636-44.
18. Zareie P, Sadegh M, Palizvan M. Investigating the effect of enzymatic elimination of endocannabinoids inhibitors on tonic-colonic seizure provoked by PTZ. *J Babol Univ Med Sci*. 2016;18(12):49-56.
19. Hashemian M, Anissian D, Ghasemi-Kasman M, Akbari A, Khalili-Fomeshi M, Ghasemi S, et al. Curcumin-loaded chitosan-alginate-STPP nanoparticles ameliorate memory deficits and reduce glial activation in pentylenetetrazol-induced kindling model of epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017;79(Pt B): 462-71.
20. Mehrzadi S, Sadr S, Hosseinzadeh A, Gholamine B, Shahbazi A, FallahHuseini H, et al. Anticonvulsant activity of the ethanolic extract of *Punica granatum* L. seed. *Neurol Res*. 2015;37(6):470-5.
21. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-6.

22. Buege JA, Aust SD. [30] Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52: 302-10.
23. Dimpfel W. Different anticonvulsive effects of hesperidin and its aglycone hesperetin on electrical activity in the rat hippocampus in-vitro. *J Pharm Pharmacol.* 2006;58(3):375-9.
24. Kumar A, Lalitha S, Mishra J. Hesperidin potentiates the neuroprotective effects of diazepam and gabapentin against pentylenetetrazole-induced convulsions in mice: possible behavioral, biochemical and mitochondrial alterations. *Indian J Pharmacol.* 2014;46(3):309.
25. Choi EJ. Antioxidative effects of hesperetin against 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced oxidative stress in mice. *Life Sci.* 2008;82(21-22):1059-64.
26. Kumar B, Gupta SK, Srinivasan B, Nag TC, Srivastava S, Saxena R, et al. Hesperetin rescues retinal oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis in diabetic rats. *Microvasc Res.* 2013;87:65-74.
27. Pari L, Shagirtha K. Hesperetin protects against oxidative stress related hepatic dysfunction by cadmium in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2012;64(5):513-20.
28. Khalaj R, Moghaddam AH, Zare M. Hesperetin and it nanocrystals ameliorate social behavior deficits and oxido-inflammatory stress in rat model of autism. *Int J Dev Neurosci.* 2018;69:80-7.
29. Baradaran S, Hajizadeh Moghaddam A, Ghasemi-Kasman M. Hesperetin reduces myelin damage and ameliorates glial activation in lysolecithin-induced focal demyelination model of rat optic chiasm. *Life Sci.* 2018;207:471-9.
30. Kara M, Türkön H, Karaca T, Güçlü O, Uysal S, Türkyılmaz M, et al. Evaluation of the protective effects of hesperetin against cisplatin-induced ototoxicity in a rat animal model. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2016;85:12-8.
31. Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin—a mini-review. *Life Sci.* 2014;113(1-2):1-6.
32. Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3(4):228-37.
33. Khadir F, Pouramir M, Joorsaraee SG, Feizi F, Sorkhi H, Yousefi F. The effect of arbutin on lipid peroxidation and antioxidant capacity in the serum of cyclosporine-treated rats. *Caspian J Intern Med.* 2015;6(4):196.