بررسي اثرات حفاظتي اسيد رزمارينيك در مدل صرع لوب گيجگاهي القا شده با تزريق داخل هيپوكامپ اسيد كاينيك در موش‌هاي صحرايي نر

صفورا خمسه[۱و۲] ، سيد شهاب‌الدين صدر[۱و۲] ، مهرداد روغني[۳*]

۱- مركز تحقيقات الكتروفيزيولوژي، دانشكده پزشكي دانشگاه علوم پزشكي تهران، تهران، ايران.

۲- گروه فيزيولوژي، دانشكده پزشكي دانشگاه علوم پزشكي تهران، تهران، ايران.

۳- مركز تحقيقات نورو فيزيولوژي، دانشگاه شاهد، تهران، ايران.

چكيده:

مقدمه: صرع لوب گيجگاهي اختلال مزمن عصبي است كه با تشنجات مزمن همراه است. اسيد كاينيک آگونيست گيرنده‌های يونوتروپيک گلوتامات می‌باشد و به عنوان داروی صرع‌زا جهت القاء صرع لوب گيجگاهی در حيوانات آزمايشگاهی استفاده می‌شود. اسيد رزمارينيک فنول طبيعی با خواص آنتی‌اكسيدان، ضد آپوپتوز، نوروپروتكتيو و ضد التهاب می‌باشد. هدف از اين مطالعه بررسي اثر حفاظتي اسيد رزمارينيک در مدل صرع لوب گيجگاهي القا شده توسط تزريق داخل هيپوكامپ اسيد كاينيک در موش‌های صحرايی بود.

مواد و روش كار: ۷۸ سر موش صحرايی نر به صورت تصادفي به ٦ گروه: كنترل، شم، شم دريافت كننده اسيد رزمارينيک، صرعي (تزريق اسيد كاينيك به هيپوكامپ سمت راست)، صرعي پيش‌درمان شده با اسيد والپروئيك (۳۰۰ mg/kg به مدت يك هفته از طريق گاواژ قبل از القا صرع) و صرعي پيش‌درمان شده با اسيد رزمارينيك (۱۰mg/kg يك هفته از طريق گاواژ قبل از القا صرع) تقسيم شدند. در تمام گروه‌ها در طي ٢٤ ساعت پس از جراحي، رفتار تشنجي با استفاده از دوربين ثبت شد. سپس تغييرات بافت‌شناسي شامل بررسي تراكم نوروني (با كمك رنگ‌آميزي نيسل)، شدت جوانه‌زدن فيبرهاي خزه‌اي (توسط رنگ‌آميزي تيم) بررسي گرديد. همچنين شاخص‌هاي استرس اكسيداتيو شامل مالون‌دي‌آلدئيد، نيتريت و نيترات نيز اندازه گيري شد.

نتايج: رفتار تشنجي بارزي در گروه صرعي مشاهده شد كه پيش‌درماني با اسيد رزمارينيك به طور معني‌داري آن را كاهش داد. ميزان مالون‌دي‌آلدئيد، نيتريت و نيترات در گروه صرعي نسبت به گروه شم افزايش معني‌داري داشت كه در گروه صرعي پيش‌درمان شده با اسيد رزمارينيك به طور معني‌داري كاهش پيدا كرد. تراكم نوروني در گروه صرعي كاهش يافته بود كه پيش‌درماني با اسيد رزمارينيك به‌طور معني‌داري از اين كاهش جلوگيري نمود. جوانه‌زدن فيبرهاي خزه‌اي در گروه صرعي افزايش يافته بود كه پيش‌درماني با اسيد رزمارينيك به‌طور معني‌داري سبب كاهش آن گرديد.

نتيجه‌گيري: اسيد رزمارينيك اثرات نوروپروتكتيو در برابر صرع لوب گيجگاهي از طريق كاهش شدت رفتار تشنجي، برخي شاخص‌هاي مرتبط با استرس اكسيداتيو نظير مالون‌دي‌آلدئيد، نيتريت و نيترات نشان داد. همچنين از كاهش تراكم نوروني و جوانه‌زدن فيبرهاي خزه‌اي جلوگيري نمود.

كلمات كليدي: صرع لوب گيجگاهی، اسيد كاينيک، اسيد رزمارينيك، استرس اكسيداتيو، تراكم نوروني، انديس تيم

مقدمه

صرع اختلال مزمن عصبي است كه **۱- ۰/۵%** از جمعيت دنيا را تحت تاثير قرار مي‌دهد و در اثر فعاليت بيش از حد و همزمان نورون‌ها در مغز می‌باشد (۱و۲). درواقع تشنجات صرعی زمانی ايجاد می‌شود كه يک عدم تعادل ناگهانی بين عوامل تحريكی و مهاری درون شبكه نورون‌های قشری به نفع عوامل تحريكی اتفاق بيفتد (۳).

صرع لوب گيجگاهی نوعي صرع موضعی و يک اختلال مزمن عصبي است كه حدود ٦٠% صرع بالغين را تشكيل می‌دهد و يكی از شايع‌ترين موارد صرع مقاوم به درمان می‌باشد. اين نوع صرع در هيپوكامپ، شكنج پاراهيپوكامپ، آميگدال و نئوكورتكس رخ می‌دهد (٤). مدل صرع لوب گيجگاهي كه توسط تزريق داخل هيپوكامپ اسيد كاينيک القا مي‌گردد، همان ويژگی‌های نوروپاتولوژيک و الكتروانسفالوگرافيكی را كه در بيماران مبتلا به صرع لوب گيجگاهی مشاهده می‌شود را نشان می‌دهد. اين مدل به دليل دقت بالا و ميزان مرگ و مير كم حيوانات، بر مدل-هاي صرع القا شده به وسيله‌ي تزريق سيستميک (داخل صفاقی) اسيد كاينيک، پنتيلن‌تترازول و پيلوكارپين، ارجحيت دارد (٥ و٦).

اسيد كاينيك آنالوگ L- گلوتامات است كه با افزايش استرس اكسيداتيو موجب سميت عصبي در مغز مي‌شود (۷). در جريان استرس اكسيداتيو برخي شاخص‌هاي بيوشيميايي مانند مالون‌دي-آلدئيد، نيتريت و نيترات در هيپوكامپ افزايش مي‌يابد (۸) اين ماده سبب مرگ نورون‌ها، افزايش جوانه‌زدن فيبرهای خزه‌ای، توليد متابوليت‌هاي نيتريك اكساید، پراكسيداسيو ن ليپيدها، در نورون‌ها می‌گردد (۹ و ۱۰).

اسيد رزمارينيک يك فنول طبيعی آنتی‌اكسيدان می‌باشد. اين تركيب با فرمول شيميايي C۱۸H۱٦O۸ در گونه‌هاي Boraginaceae و خانواده Lamiaceae از جمله ريحان، رزماري، باد-رنجبويه، اكليل كوهی، پونه كوهی، آويشن و نعناع بيابانی يافت می‌شود (۱۱). اسيد رزمارينيک يک ماده طبيعی، مؤثر، مطمئن و غير سمی است كه در درمان زخم‌های پپتيک، آرتريت روماتوئيد، آسم برونشيال، بيماری‌های ايسكميک قلبی و بيماری‌های التهابی تاثير دارد و نيمه عمر آن در سرم كمتر از ۲ ساعت مي‌باشد (۱۲). به علت فعاليت آنتی‌اكسيداني اثرات سودمندی در افزايش سلامتي انسان دارد. فعاليت‌های بيولوژيكی آن شامل ضد ويروس، ضد باكتری، ضد التهاب، آنتي‌اكسيدان و نيز مهار كننده آنزيم گابا ترانس‌آميناز است (۱۳). فعاليت آنتی‌اكسيداني آن از ويتامين E بيشتر می‌باشد و سبب حذف راديكال‌های آزاد و نيز تخريب اكسيژن‌های يک ظرفيتی می‌شود تا بدين وسيله از ساختار غشاي سلول حمايت كرده و منجر به آهسته شدن روند پيری شود (١٤).

مواد و روش‌ها

در اين مطالعه از ٤٨ سر موش صحرايی نر از نژاد wistar در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. موش‌هاي صحرايی نر به صورت تصادفي به ٦ گروه: كنترل، شم، شم دريافت كننده اسيد

رزمارينيک، صرعي (تزريق اسيد کاينيك به هيپوکامپ سمت راست)، صرعي پيش‌درمان شده با اسيد والپروئيك (mg/kg ۳۰۰ به مدت يك هفته از طريق گاواژ قبل از القا صرع) و صرعي پيش-درمان شده با اسيد رزمارينيك (mg/kg۱۰ يك هفته از طريق گاواژ قبل از القا صرع) تقسيم شدند.

روش انجام کار

براي انجام جراحي، موش‌هاي صحرايي نر با استفاده از تزريق داخل صفاقي کلرال هيدرات (mg/kg ۳۵۰) بيهوش شدند. پس از تراشيدن موهاي سر، حيوان در دستگاه استريوتاکس قرار داده شد. سپس با استفاده از تيغ بيستوري شکافي بر روي پوست سر ايجاد شده و سطح استخوان جمجمه تميز و خشك شد، براي صرعي نمودن هر موش، ٤ ميکروگرم اسيد کاينيك در ٥ ميکروليتر نرمال سالين حل شده و به ناحيه CA۳ هيپوکامپ سمت راست با مختصات قدامي خلفي ٤/١ ميلي‌متر، جانبي ٤/١ ميلي‌متر و شکمي ٤ ميلي‌متر زير سطح جمجمه از طريق سرنگ هاميلتون تزريق شد، ميزان تزريق مايع در هر دقيقه ١ ميکروليتر بوده و پس از اتمام تزريق سرنگ حدود پنج تا ده دقيقه در مختصات مورد نظر باقي ماند تا مايع تزريق شده پس‌زده نشود، پس از خارج نمودن سرنگ محل جراحي بخيه زده شد (١٥). گروه شم فقط محلول نرمال سالين را با همان حجم دريافت نمودند.

ارزيابي رفتارهاي تشنجي

پس از انجام جراحي و به هوش آمدن حيوانات، حرکات تشنجي پايدار در يك دوره زماني ٤ ساعته با استفاده از دوربين ثبت گرديد. حيوانات از نظر رفتار تشنجي بر اساس تقسيم بندي Racine (رتبه‌بندي از صفر تا پنج) مورد ارزيابي دقيق قرار گرفتند؛ ٠: بدون رفتار تشنجي، ١: چشمك زدن، کلونوس خفيف صورت، ٢: تکان دادن سر، کلونوس‌هاي متعدد در ناحيه سر، ٣: کلونوس اندام جلويي، ٤: کلونوس دو طرفه اندام حرکتي جلويي و بلند شدن برروي دو پا، ٥: تشنجات کلونيك در سرتاسر بدن همراه با از دست دادن تعادل (١٦).

بررسي ماركرهاي استرس اکسيداتيو

به منظور سنجش فاکتورهاي بيوشيميايي، حيوانات با اتر بيهوش شده و مغز به سرعت خارج گرديد، پس از شستشو با محلول نرمال سالين، در فويل آلومينيومی پيچيده شده و تا زمان سنجش فاکتورهای بيوشيميايی مربوط به استرس اکسيداتيو، در فريزر ٧٠- درجه سانتي‌گراد نگهداري گرديد. براي تهيه سوپرناتانت بلوک‌های هيپوکامپ از نمونه‌های مغزی تهيه و توزين شدند، سپس در مقدار مناسب از نرمال سالين قرار گرفتند. سپس در دستگاه هموژنايزور با دور ٥٠٠٠ به مدت ١ دقيقه هموژنيزه شدند، پس از آن محلول هموژنيزه با دور ٣٠٠٠ به مدت ٥ دقيقه سانتريفوژ شد. پس از سانتريفوژ، محلول شفاف رويي از محلول سانتريفوژ شده جدا گرديد و براي سنجش‌هاي آنزيمي و پروتئيني مورد استفاده قرار گرفت (١٧).

ارزيابي غلظت MDA هيپوکامپ

اندازه گيري مقدار مالون‌دي‌آلدئيد بر پايه روشي است که اساس آن واکنش تيوباربيتوريك اسيد است. در اين آزمايش، مالون‌دي‌آلدئيد با باربيتوريك اسيد واکنش داده و ماده واکنشی

تيوباربيتوريک اسيد، صورتي رنگ ايجاد مي‌کند که حداکثر جذب نوري آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر است (۱۸).

تعيين غلظت نيتريت هيپوکامپ

سنجش ميزان نيتريت و نيترات بر اساس واکنش گريس انجام شد (۱۹).

سنجش پروتئين هيپوکامپ

سنجش پروتئين بافت مغزي با روش برادفورد انجام شد (۲۰).

رنگ‌آميزي نيسل و تيم

جهت فيکس کردن مغز حيوان، از روش پرفيوژن ترانس‌کاردیال استفاده گرديد. موش‌ها توسط مخلوط کتامين (۷۰ mg/kg i.p) و زايلازين (۱۵ mg/kg i.p) به طور عميق بيهوش شدند و قفسه سينه باز گرديد تا قلب نمايان شود، سپس شريان آئورت نزولي کلمپ گرديد تا از ورود محلول فيکساتيو به قسمت‌هاي پايين بدن جلوگيري شود، پس از آن ۰/۲ ميلي ليتر هپارين در قلب تزريق شد تا مانع از لخته شدن خون در عروق گردد، سپس در نوك بطن چپ برش ظريفي ايجاد شد و کانول ست پرفيوژن وارد آن گرديد تا به ابتداي آئورت برسد و بوسيله کلمپ ظريفي ثابت نگه داشته شد، بعد از آن جريان مايع برقرار گرديد، بلافاصله در گوشك راست نيز برشي جهت خروج خون ايجاد شد. جهت فيکس کردن مغز حيوان براي استفاده بافت‌شناسي، در ابتدا توسط ۱۰۰ ميلي‌ليتر محلول نرمال سالين شستشوي اوليه انجام شد تا خون خارج شود و در ادامه بوسيله‌ي حدود ۲۰۰-۱۰۰ ميلي‌ليتر محلول فيکساتيو ٤% شستشوي دوم انجام گرديد. پس از فيکس شدن مغز، سر حيوان جدا گرديد، سپس مغز حيوان خارج شده و به مدت ۳-۲ روز در ظرف فيکساتيو ٤% به عنوان Post Fixative نگهداري شد (۱۵). براي تهيه بلوك مغز بخشي از مغز که حاوي هيپوکامپ بود برش داده شد. سپس بلوك‌ها در محلول سوکروز ۳۰% به مدت ۳-۲ قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها بر روي قالب‌هاي مخصوص برش‌گيري درون دستگاه ميکروتوم فريزينگ قرار داده شدند، با منجمد شدن نمونه‌ها برش‌هايي با ضخامت ۳۰ ميکرون از آن‌ها تهيه شد. جهت رنگ‌آميزي نيسل ، از محلول کرزيل ويوله ۱% استفاده شد و براي شمارش نوروني، برش-هاي ناحيه هيپوکامپ در محدوده ٤/٤ mm الي ٦/۲ mm اينترا اورال اطلس پاکسينوس و واتسون مورد بررسي قرار گرفتند. تعداد نورون‌هاي واقع در بخش‌هاي CA_1 و CA_3 در واحد سطح (mm^2) شمارش شدند.

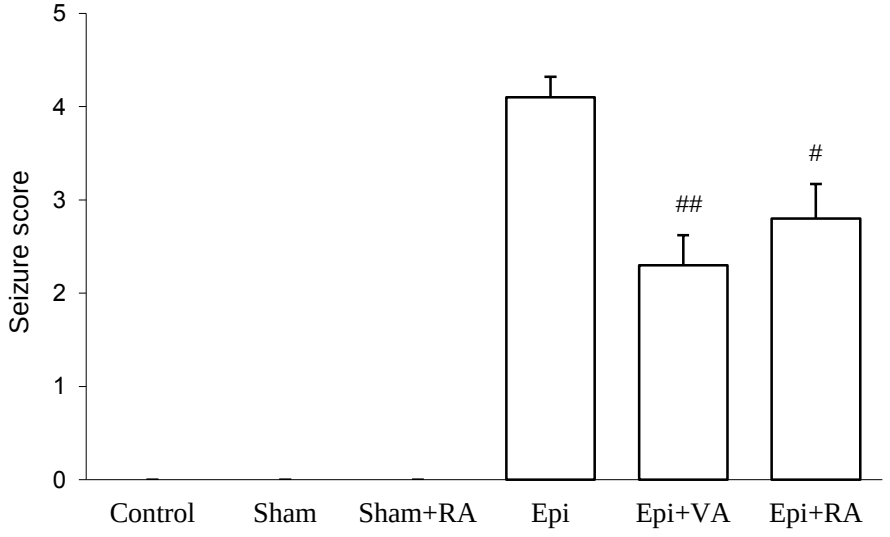
به منظور رنگ‌آميزي تيم، نمونه‌ها در محلول تيم حاوی: ۱۵۰ ميلي‌ليتر صمغ عربی ۵۰%، ۳۰ ميلی‌ليتر بافر سديم سيترات ۲ مولار، ۹۰ ميلی‌ليتر محلول هيدروکينون ٦/۵% و ۱/۵ ميلی‌ليتر محلول نيترات نقره ۱۷% در اتاق تاريک قرار داده شدند. پس از گذشت ٤۵ دقيقه، برای خاتمه واکنش‌ها نمونه‌ها در آب مقطر غوطه‌ور گرديده و سپس به مدت ۲ دقيقه در رنگ کرزيل‌ويوله قرار داده شدند. براي محاسبه انديس تيم، مساحت کل ناحيه شکنج دندانه‌اي حاوي گرانول‌هاي تيم

به روش دانسيتومتري اندازه‌گيري شده و جواب حاصله بر طول كل ناحيه شكنج دندانه‌اي تقسيم گرديد.

نتايج

رفتارهاي تشنجي

نتايج به دست آمده از مطالعه حاضر، رفتار تشنجي را در روز اول پس از القاء صرع در يك دوره زماني ٤ ساعته نشان مي‌دهد. در اين خصوص در گروه كنترل، شم و شم پيش‌درمان شده با اسيد رزمارينيک هيچ‌گونه رفتار تشنجي در حيوانات مشاهده نشد. در گروه صرعي رفتار تشنجي بارز ديده شد. رفتار تشنجي در گروه صرعي پيش‌درمان شده با اسيد والپروئيك نسبت به گروه صرعي كاهش معني‌داري داشت (P<۰/۰۱) و در گروه صرعي پيش‌درمان شده با اسيد رزمارينيك نسبت به گروه صرعي نيز كاهش معني‌داري نشان داد (P<۰/۰۵) (شكل ۱).



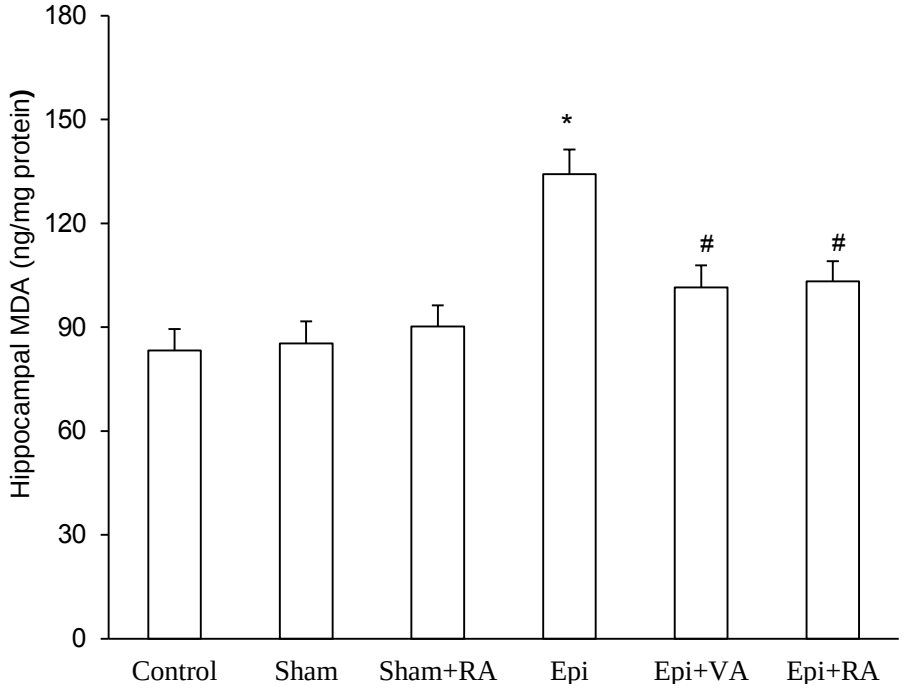
شكل۱: ميانگين كميت رفتار تشنجي در يك دوره ٤ ساعته در روز اول پس از حراحي در گروه‌هاي

مختلف (n=۱۰). Epi: صرعي، VA: اسيد والپروئيك، RA: اسيد رزمارينيك

ماركرهاي استرس اكسيداتيو

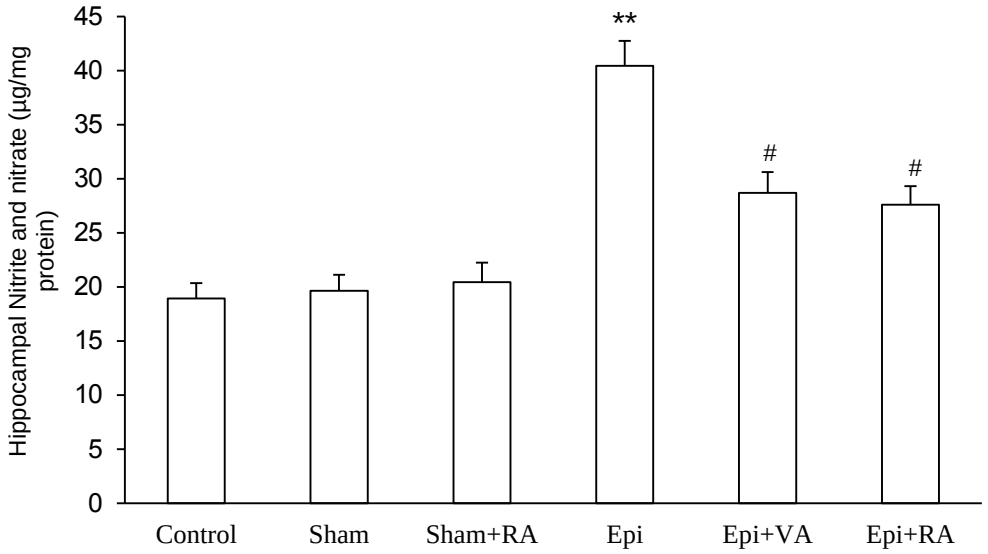
ميزان مالون‌دي‌آلدئيد در گروه شم پيش‌درمان شده با اسيد رزمارينيک در مقايسه با گروه شم و گروه کنترل تغيير معني‌داري نداشت ولي در گروه صرعي نسبت به گروه شم افزايش معني‌داري نشان داد (P<۰/۰۵). در گروه صرعي پيش‌درمان شده با اسيد والپروئيك نسبت به گروه صرعي کاهش معني‌داري ديده شد (P<۰/۰۵) و در گروه صرعي پيش‌درمان شده با اسيد رزمارينيك نسبت به گروه صرعي نيز کاهش معني‌داري وجود داشت (P<۰/۰۵) (شکل ۲).

ميزان نيتريت و نيترات در گروه شم پيش‌درمان شده با اسيد رزمارينيک در مقايسه با گروه شم و گروه کنترل تغيير معني‌داري نداشت ولي در گروه صرعي نسبت به گروه شم افزايش معني‌داري نشان داد (P<۰/۰۱). در گروه صرعي پيش‌درمان شده با اسيد والپروئيك نسبت به گروه صرعي ميزان نيتريت و نيترات کاهش معني‌داري يافت (P<۰/۰۵) و در گروه صرعي پيش‌درمان شده با اسيد رزمارينيك نسبت به گروه صرعي نيز کاهش معني‌داري وجود داشت (P<۰/۰۵) (شکل ۳).



شکل-۲: تغييرات ميزان MDA هيپوکامپ در گروه‌هاي مختلف (n=٦). Epi: صرعي،

VA: اسيد والپروئيك، RA: اسيد رزمارينيك



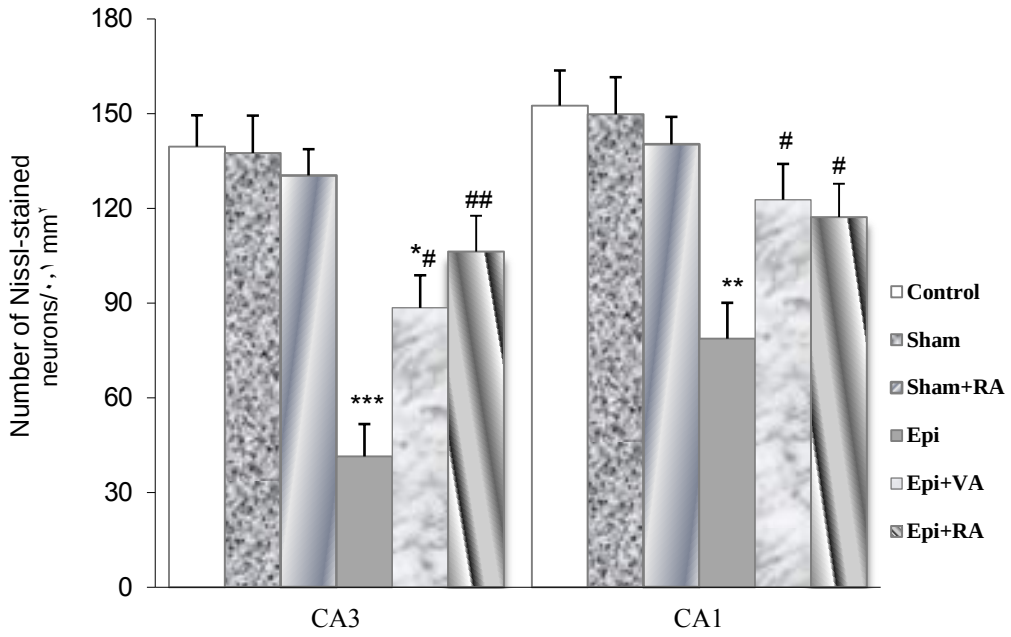
شكل۳: تغييرات ميزان نيتريت ونيترات هيپوكامپ در گروه‌هاي مختلف (n=٦). Epi: صرعي،

VA: اسيد والپروئيك، RA: اسيد رزمارينيك

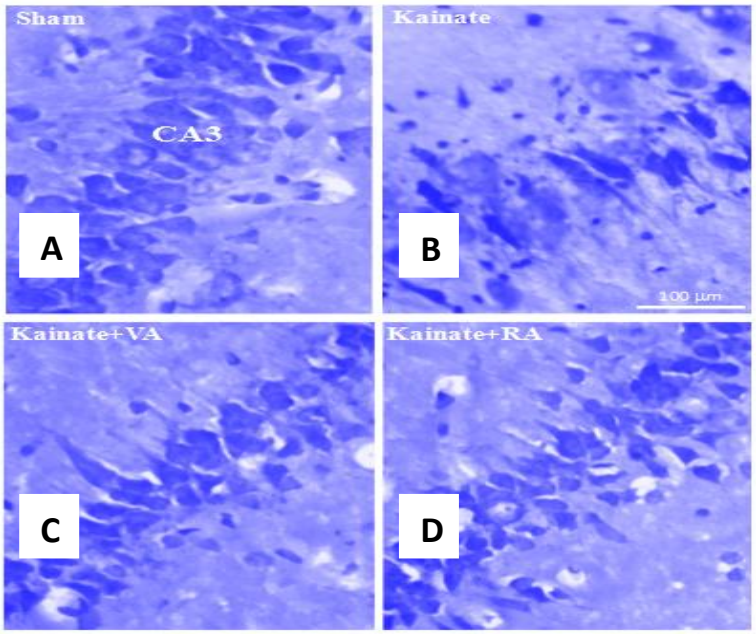
رنگ‌آميزي نيسل و تيم

تراكم نوروني در گروه شم پيش‌درمان شده با اسيد رزمارينيک در مقايسه با گروه شم و گروه كنترل تغيير معني‌داري نداشت ولي در گروه صرعي در مقايسه با گروه شم كاهش معني‌داري وجود داشت (P<۰/۰۰۱). در گروه صرعي پيش‌درمان شده با اسيد والپروئيك نسبت به گروه شم كاهش معني‌داري ديده شد (P<۰/۰۵) ولي نسبت به گروه صرعي افزايش معني‌داري وجود داشت (P<۰/۰۵). در گروه صرعي پيش‌درمان شده با اسيد رزمارينيك در مقايسه با گروه صرعي نيز افزايش معني‌داري مشاهده شد (P<۰/۰۱) (شكل ٤).

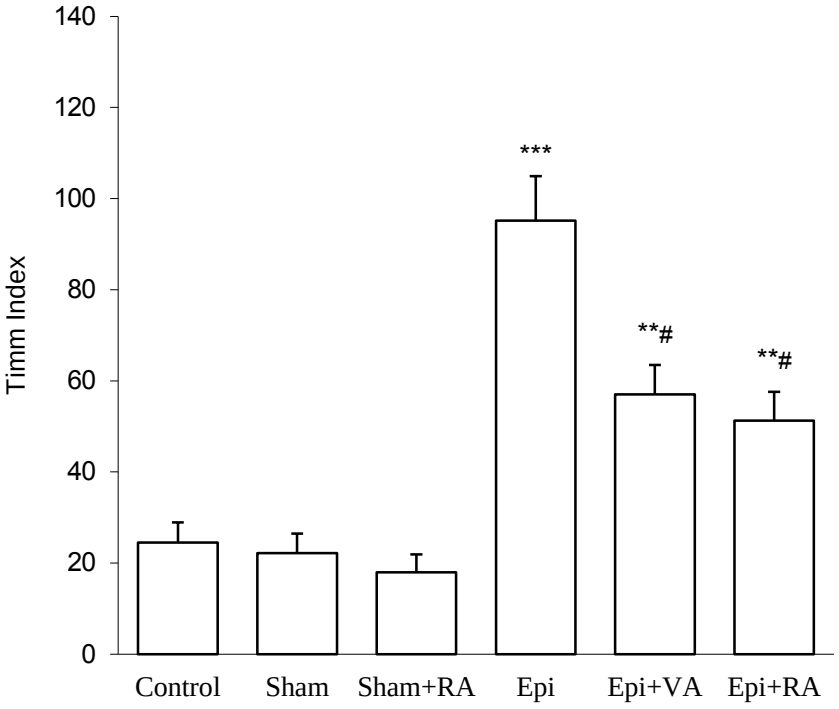
جهت بررسي شدت جوانه‌زدن فيبرهاي خزه‌اي در ناحيه شكنج دندانه‌اي هيپوكامپ از روش رنگ-آميزي تيم استفاده و در اين رابطه انديس تيم محاسبه شد. اين انديس در گروه شم پيش‌درمان شده با اسيد رزمارينيک در مقايسه با گروه شم و گروه كنترل تغيير معني‌داري نداشت ولي در گروه صرعي در مقايسه با گروه شم افزايش معني‌داري نشان داد (P<۰/۰۰۱). در گروه صرعي پيش‌درمان شده با اسيد والپروئيك نسبت به گروه شم افزايش معني‌داري ديده شد (P<۰/۰۱) ولي نسبت به گروه صرعي كاهش معني‌داري وجود داشت (P<۰/۰۵). در گروه صرعي پيش-درمان شده با اسيد رزمارينيك در مقايسه با گروه شم افزايش معني‌داري مشاهده گرديد (P<۰/۰۱) ولي نسبت به گروه صرعي كاهش معني‌داري داشت (P<۰/۰۵) (شكل ٥).



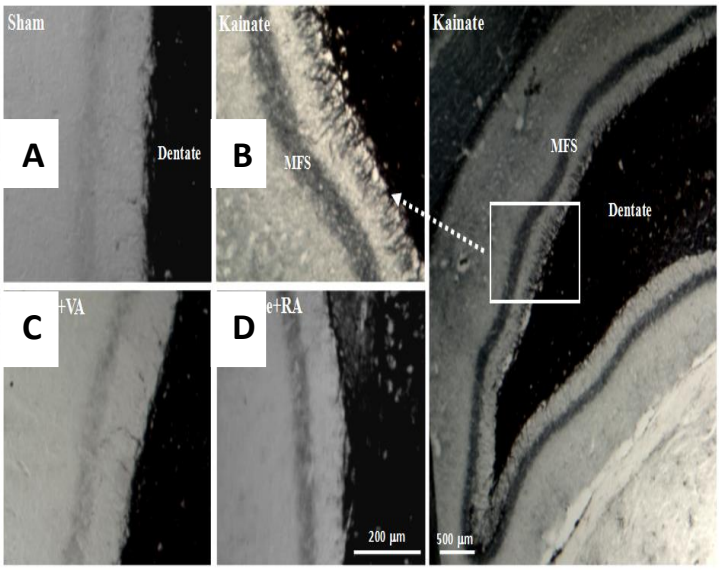
شکل- ٤: تراکم نورون‌هاي نیسل مثبت در ناحیه CA_1 و CA_3 هیپوکامپ در گروه‌هاي مختلف



عکس میکروسکوپ نوري از ناحیه CA_3 هیپوکامپ در گروه‌هاي مختتف رنگ‌آمیزي شده بـا روش نیســل. A: شــم، B: صـرعي، C: اســید والپروئیـك، D: اســید رزمارینیك



شکل- ۵: اندیس تیم در ناحیه CA_3 هیپوکامپ در گروه‌هاي مختلف



عكس ميكروسكوپ نوري از ناحيه شكنج دندانه‌دار هيپوكامپ در گروه‌هاي مختلف رنگ-آميزي شده

با روش تيم. A: شم، B: صرعي، C: اسيد والپروئيك، D: اسيد رزمارينيك

بحث

نتايج بررسي‌هاي قبلي نشان مي‌دهد كه آنتي‌اكسيدان‌ها از طريق كاهش استرس اكسيداتيو و پراكسيداسيون ليپيدي ناشي از تشكيل راديكال‌هاي آزاد اكسيژن در ناحيه هيپوكامپ، موجب كاهش شدت و احتمال وقوع صرع در حيوانات آزمايشگاهي مي‌گردند. همچنين آنتي‌اكسيدان‌ها مي‌توانند از طريق افزايش پايداري غشاي سلولي موجب افزايش مقاومت نورون‌ها در برابر آسيب اكسيداتيو شده و از طرفي ظرفيت آنتي‌اكسيداني مغز را در برابر آسيب اكسيداتيو افزايش دهند (۲۱). گزارش شده است كه فعاليت آنتي‌اكسيداني اسيد رزمارينيك بر پايه مهار رايكال‌هاي آزاد مي‌باشد و اين ماده به عنوان مهار كننده قوي و مؤثر گونه‌هاي فعال اكسيژن شناخته شده است. سطح گونه‌هاي فعال اكسيژن در پاسخ به فعاليت الكتريكي نوروني و تشنجات افزايش مي‌يابد بنابراين آنتي‌اكسيدان‌ها براي درمان و تعديل حملات صرعي پيشنهاد مي‌گردند (۲۲). حضور اسيد رزمارينيك در ناحيه‌ی هيپوكامپ توانايی برداشت راديكال‌های آزاد و عوامل پيش-التهابی را افزايش داده و توانست از طريق مقابله با سيستم تحريكی و تقويت سيستم مهاری در كاهش شدت رفتارهای تشنجی نقش داشته باشد.

در اثر تشنج، پراكسيداسيون ليپيدي در هر دو نيمكره مغزي و مرگ سلولي در هيپوكامپ افزايش چشمگيري مي‌يابد و آنتي‌اكسيدان‌ها از افزايش پراكسيداسيون ليپيدها و مرگ سلولي هيپوكامپ در طول كيندلينگ جلوگيري مي‌كنند (۲۳). در سرم خون بيماران صرعي، ميزان آنتي-اكسيدان‌ها كاهش يافته ولي ميزان پراكسيداسيون ليپيدي افزايش مي‌يابد و بعد از درمان با داروهاي ضد صرع، سطح آنتي‌اكسيدان‌ها اصلاح مي‌شود (۲٤). Bruce و همكارانش طی مطالعه‌اي به اين نتيجه رسيدند كه آنچه موجب آسيب نورونی پس از فعاليت تشنجی القا شده توسط اسيد كاينيک می‌شود، افزايش تشكيل راديكال‌های آزاد اكسيژن می‌باشد. آنها مشاهده كردند كه پس از القا تشنج توسط اسيد كاينيک در موش‌های صحرايی بالغ، ميزان پراكسيداسيون ليپيدی و اكسيداسيون پروتئينی در هيپوكامپ افزايش يافته و پيش‌درمانی با مواد اگزوژن كه قابليت برداشت راديكال‌های آزاد را دارند می‌تواند اثرات حفاظتی داشته باشد (۲۵). گزارش گرديد فعاليت آنتی‌اكسيداني اسيدرزمارينيک بطور اساسی مربوط به خصوصيت احيا-كنندگی آن است كه نقش مهمی در بازجذب، خنثی كردن راديكال‌های آزاد و از بين بردن اكسيژن‌های يک ظرفيتی، سه ظرفيتی و تخريب پراكسيدازها دارد (۲٦).

مشاهدات نشان مي‌دهد كه نيتريك اكساید سبب از بين رفتن نورون‌ها و تكثير سلول‌هاي گليا مي‌گردد كه مي‌تواند در پاتوژنز صرع دخيل باشد (۲۷). در مطالعه‌اي نشان داده شد كه صرع سبب افزايش غلظت متابوليت‌هاي نيترات مي‌گردد كه تأييدي بر دخالت نيتريك اكساید در پاتوفيزيولوژي سميت تحريكي ناشي از صرع است (۲۸). افزايش معني‌دار نيتريت و نيترات در گروه صرعي نشان مي‌دهد كه در طول تشنج ناشي از تزريق كاينات، به دليل توليد راديكال‌هاي آزاد اكسيژن، ميزان نيتريت و نيترات افزايش يافت و پيش‌درماني با اسيد رزمارينيك توانست به

طور معني‌داري آن را نسبت به گروه صرعي كاهش دهد. اثر فوق از يك سو به عمل آنتي - اكسيداني اين ماده كه موجب كاهش غلظت متابوليت‌هاي نيترات گرديده و از سوي ديگر به كاهش فعاليت نيتريك اكساید سنتاز نوروني (nNOS) و در نتيجه كاهش توليد نيتريك اكساید نسبت داده مي‌شود.

القا صرع با تزريق داخل هيپوكامپ اسيد كاينيك، سبب كاهش تراكم نوروني در نواحي CA_1 و CA_3 هيپوكامپ شده و پيش درماني با آنتي‌اكسيدان‌ها باعث افزايش تراكم نوروني در اين نواحي مي‌شود (۲۹). همچنين گزارش شده است كه در مدل كيندلينگ شيميايي و بيماري‌هاي نورودژنراتيو (مثل آلزايمرو پاركينسون) اسيد رزمارينيك اثرات نوروپروتكتيو در برابر استرس اكسيداتيو داشته است (۳۰ و ۳۱).

تزريق داخل هيپوكامپ اسيد كاينيك سبب افزايش جوانه‌زدن فيبرهاي خزه‌اي به سمت لايه سوپراگرانولار شكنج دندانه‌اي مي‌شود كه با روش تيم قابل مشاهده است و پيش‌درماني با عوامل نوروپروتكتيو سبب كاهش تراكم و وسعت اين فيبرها مي‌شود (۳۲). پيش‌درماني با عوامل آنتي‌اكسيدان سبب كاهش تراكم و وسعت فيبرهاي خزه‌اي در مدل صرع لوب گيجگاهي با تزريق داخل هيپوكامپ اسيد كاينيك مي‌شود (۱۵).

اين مطالعه نشان داد كه اسيد رزمارينيك از طريق كاهش پراكسيداسيون ليپيدها، مهار از دست رفتن نورون‌هاي هيپوكامپ و كاهش جوانه زدن فيبرهاي خزه‌اي بر صرع لوب گيجگاهي اثرات ضد تشنجي و نوروپروتكتيو اعمال مي كند.

Reference

۱. Blume WT, Lüders HO, Mizrahi E, Tassinari C, van Emde Boas W, Engel J. Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. Epilepsia. ۲۰۰۱;٤۲(۹):۱۲۱۲-۸.

۲. Theodore WH, Fisher RS. Brain stimulation for epilepsy. Lancet Neurol. ۲۰۰٤;۳(۲):۱۱۱-۸.

۳. Barooni S, Thambirajah Balachandra A, Lee L. Death in epileptic people: a review of Manitoba’s medical examiner’s cases. J Forensic Leg Med. ۲۰۰۷;۱٤(٥):۲۷٥-۸.

٤. Wiebe S. Epidemiology of temporal lobe epilepsy. Can J Neurol Sci. ۲۰۰۰;۲۷(۱).

٥. Lévesque M, Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. ۲۰۱۳;۳۷(۱۰):۲۸۸۷-۹۹.

٦. Rattka M, Brandt C, Löscher W. The intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy revisited: epileptogenesis, behavioral and cognitive alterations,

pharmacological response, and hippoccampal damage in epileptic rats. Epilepsy research. ٢٠١٣;١٠٣(٢):١٣٥-٥٢.

٧. Mariani E, Polidori M, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. ٢٠٠٥;٨٢٧(١):٦٥-٧٥.

٨. Płonka-Półtorak E, Zagrodzki P, Nicol F, Kryczyk J, Bartoń H, Westermarck T, et al. Antioxidant agents and physiological responses in adult epileptic patients treated with lamotrigine. Pharmacogn Rev. ٢٠١٣;٦٥(١):٩٩-١٠٦.

٩. Wakai S, Ito N, Sueoka H, Kawamoto Y, Hayasaka H, Tsutsumi H, et al. Complex partial status epilepticus in childhood. Pediatr Neurol. ١٩٩٥;١٣(٢):١٣٧-٤١.

١٠. Hsieh PF, Hou C-W, Yao P-W, Wu S-P, Peng Y-F, Shen M-L, et al. Sesamin ameliorates oxidative stress and mortality in kainic acid-induced status epilepticus by inhibition of MAPK and COX-٢ activation. J Neuroinflammation. ٢٠١١;٨(٥٧):١٨٨٢-٩٠.

١١. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates–nature, occurrence and dietary burden. J Sci Food Agric. ١٩٩٩; ٧٩(٣):٣٦٢-٧٢.

١٢. Al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P. Pharmacology of rosemary (Rosmarinus officinalis Linn.) and its therapeutic potentials. Indian J Exp Biol. ١٩٩٩;٣٧:١٢٤-٣١.

١٣. Petersen M, Simmonds M. Rosmarinic acid. Phytochemistry. ٢٠٠٣; ٦١: ١٢١-١٢٥.

١٤. Triantaphyllou K, Blekas G, Boskou D. Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiacaea. Int J Food Sci Nutr. ٢٠٠١; ٥٢: ٣١٣-٣١٧.

١٥. Dariani S, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Thymoquinone Attenuates Astrogliosis, Neurodegeneration, Mossy Fiber Sprouting, and Oxidative Stress in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. J Mol Neurosci. ٢٠١٣;٥١(٣):٦٧٩-٨٦.

١٦. Friedman L, Goldstein B, Rafiuddin A, Roblejo P, Friedman S. Lack of resveratrol neuroprotection in developing rats treated with kainic acid. Neuroscience. ٢٠١٣;٢٣٠:٣٩-٤٩.

١٧. Ilhan A, Iraz M, Kamisli S, Yigitoglu R. Pentylenetetrazol-induced kindling seizure attenuated by Ginkgo iloba extract (EGb ٧٦١) in mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. ٢٠٠٦; ٣٠(٨): ١٥٠٤-١٠.

١٨. Lefevre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol J, Therond P, et al., editors. [Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances]. Annales de biologie clinique; ١٩٩٧.

١٩. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [١٥ N] nitrate in biological fluids. Analytical biochemistry. ١٩٨٢;١٢٦(١):١٣١-٨.

٢٠. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. ١٩٧٦;٧٢(١):٢٤٨-٥٤.

٢١. Jefferys JG. Advances in understanding basic mechanisms of epilepsy and seizures. Seizure. ٢٠١٠;١٩(١٠):٦٣٨- ٤٦.

٢٢. Popov A, Osipov A, Korepanova E, Krivoshapko O, Artyukov A. Study of antioxidant and membrane activity of rosmarinic acid using different model systems. Biophysics. ٢٠١٣;٥٨(٥):٦٠٧-١٥.

٢٣. Frantseva M, Perez Velazquez J, Tsoraklidis G, Mendonca A, Adamchik Y, Mills L, et al. Oxidative stress is

involved in seizure-induced neurodegeneration in the kindling model of epilepsy. Neuroscience. ٢٠٠٠;٩٧(٣):٤٣١-٥.

٢٤. Sudha K, Rao AV, Rao A. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. Clinica Chimica Acta. ٢٠٠١;٣٠٣(١):١٩.

٢٥. Bruce AJ, Baudry M. Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures. Free Radical Biology and Medicine. ١٩٩٥;١٨(٦):٩٩٣-١٠٠٢.

٢٦. Furtado MA, de Almeida LCF, Furtado RA, Cunha WR, Tavares DC. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. ٢٠٠٨;٦٥٧(٢):١٥٠-٤.

٢٧. Arhan E, Serdaroglu A, Ozturk B, Ozturk HS, Ozcelik A, Kurt N, et al. Effects of epilepsy and antiepileptic drugs on nitric oxide, lipid peroxidation and xanthine oxidase system in children with idiopathic epilepsy. Seizure. ٢٠١١;٢٠(٢):١٣٨-٤٢.

٢٨. Alm P, Sharma H, Sjöquist P-O, Westman J. A new antioxidant compound H-٢٩٠/٥١ attenuates nitric oxide synthase and heme oxygenase expression following hyperthermic brain injury. Amino acids. ٢٠٠٠;١٩(١):٣٨٣- ٩٤.

٢٩. Wu Z, Xu Q, Zhang L, Kong D, Ma R, Wang L. Protective effect of resveratrol against kainate-induced

temporal lobe epilepsy in rats. Neurochem Res. ٢٠٠٩;٣٤(٨):١٣٩٣-٤٠٠.

٣٠. Coelho VR, Vieira CG, de Souza LP, Moysés F, Basso C, Papke DKM, et al. Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. Life sciences. ٢٠١٥;١٢٢:٦٥-٧١.

٣١. Ghaffari H, Venkataramana M, Ghassam BJ, Nayaka SC, Nataraju A, Geetha N, et al. Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H ٢ O ٢-induced neuronal cell damage in N٢A cells. Life sciences. ٢٠١٤;١١٣(١):٧-١٣.

٣٢. Xie C, Sun J, Qiao W, Lu D, Wei L, Na M, et al. Administration of simvastatin after kainic acid-induced status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy. PloS one. ٢٠١١;٦(٩):e٢٤٩٦٦.