

مقاله پژوهشی

## اثر سافرانال بر فعالیت صرعی شکل ناشی از پنی سیلین: نقش کمپلکس گیرنده گابا آ- بنزودیازپین قشر حسی پیکری

سینا تمدن فرد<sup>۱</sup>، امیر عرفان پرست<sup>۱\*</sup>، اسماعیل تمدن فرد<sup>۱</sup>، فرهاد سلطانی نژاد تقی آباد<sup>۱</sup>

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

پذیرش: ۳ بهمن ۱۴۰۲

دریافت: ۱۹ دی ۱۴۰۲

### چکیده

**زمینه و هدف:** سافرانال یکی از ترکیبات زیست فعال زعفران بوده و دارای خواص ضد درد، ضد التهاب، ضد دیابت و ضد سرطان است. در انواع حالت‌های پاتولوژیک سیستم عصبی، سافرانال یک اثر محافظت‌کننده عصبی قدرتمند از خود نشان داده است. در این مطالعه، اثر سافرانال بر فعالیت صرعی شکل ناشی از پنی سیلین مورد بررسی قرار گرفت. برای پیگیری مکانیسم احتمالی اثر، از آنتاگونیست کمپلکس گیرنده گابا آ-بنزودیازپین (فلومازینیل) استفاده شد. **روش‌ها:** فعالیت صرعی با ریز تزریق پنی سیلین (۳۰۰ واحد بین المللی، ۱/۵ میکرولیتر) به داخل قشر حسی پیکری در موش‌های صحرایی بی‌هوش شده با اورتان القا شد. ثبت‌های الکتروکورتیکوگرافی برای محاسبه زمان نهفته تا ظهور موج نیزه ای اول و فرکانس و دامنه امواج نیزه‌ای استفاده شدند. سافرانال به روش داخل صفاقی و فلومازینیل و دیازپام (به‌عنوان گروه شاهد مثبت) به روش داخل بطن مغزی تزریق شدند. **یافته‌ها:** موج نیزه‌ای اول  $0.27 \pm 3/74$  دقیقه پس از ریز تزریق پنی سیلین ظاهر شد. پنی سیلین همچنین  $0.99 \pm 31/91$  موج نیزه ای در دقیقه با دامنه  $0.03 \pm 1/22$  میلی ولت تولید کرد. تزریق داخل صفاقی سافرانال (۱ و ۴ میلی گرم به کیلوگرم) و تزریق داخل بطن مغزی دیازپام (۵ میکروگرم به هر حیوان) تعداد و دامنه امواج نیزه‌ای را کاهش دادند. تزریق داخل بطن مغزی فلومازینیل (۵ میکروگرم به هر حیوان) از فعالیت ضد صرعی ناشی از سافرانال (۴ میلی گرم به کیلوگرم) و دیازپام (۵ میکروگرم به هر حیوان) جلوگیری کرد. **نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه حاضر یک فعالیت ضد صرعی شکل برای سافرانال نشان دادند. همچنین مشخص شد که کمپلکس گیرنده گابا آ-بنزودیازپین مرکزی ممکن است در فعالیت ضد صرع سافرانال دخیل باشد.

**واژه‌های کلیدی:** پنی سیلین، سافرانال، فعالیت صرعی شکل، کمپلکس گیرنده گابا آ-بنزودیازپین، موش صحرایی

### مقدمه

عصبی مغز شامل اسید گاما-آمینوبوتیریک (گابا)، گلوتامات، استیل کولین، دوپامین، نوراپی نفرین، سروتونین و هیستامین می‌توانند منتهی به بروز صرع شوند [۲]. درمان مرسوم صرع عمدتاً شامل داروهای ضد تشنج معمولی مانند فنوباربیتال<sup>۱</sup>، پریمیدون<sup>۲</sup>، فنی توئین<sup>۳</sup>، کاربامازپین<sup>۴</sup>، اتوسوکسیماید<sup>۵</sup> و بنزودیازپین<sup>۶</sup>ها است [۳]. اگرچه این داروها اغلب دفعات تشنج را کنترل یا کاهش می‌دهند، اما دارای عوارض جانبی زیادی هستند و برخی از

صرع یک اختلال عصبی پیچیده است که با تشنج‌های مکرر با منشاء مغزی مشخص می‌شود و با دوره‌هایی از اختلالات حسی، حرکتی و اتونومیک با یا بدون از دست دادن هوشیاری تظاهر می‌کند [۱]. تشنج‌های صرع ناشی از تخلیه نورونی بیش از حد در جمعیتی از نوره‌های بیش از حد تحریک‌پذیر در ساختارهای قشر مغز و هیپوکامپ است [۱]. تغییرات در بیان گیرنده‌ها و کانال‌های یونی مختص تعدادی از میانجی‌های

<sup>4</sup> Carbamazepine  
<sup>5</sup> Ethosuximide  
<sup>6</sup> Benzodiazepines

<sup>1</sup> Phenobarbital  
<sup>2</sup> Primidone  
<sup>3</sup> Phenytoin

ضد اکسیدانتی، ضد التهابی و تغییر در عملکرد میانجی‌های عصبی را برای اعمال اثرات حفاظت عصبی به خدمت می‌گیرد [۵]، مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر تزریق داخل صفاقی سافرانال بر فعالیت‌های صرعی ناشی از پنی سیلین طراحی شد. مدل صرعی پنی سیلین که تخلیه‌های نورونی آن شبیه به صرعی غایب انسانی<sup>۱۳</sup> است، یکی از مدل‌های صرعی تجربی حاد می‌باشد که در تحقیقات مربوط به صرعی به فراوانی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۰]. علاوه بر این، برای پیگیری مکانیسم مرکزی اثر سافرانال بر فعالیت‌های صرعی، فلومازینیل (آنتاگونیست کمپلکس گیرنده گابا-آ-بنزودیازپین) و دیازپام (آنتاگونیست کمپلکس گیرنده گابا-آ-بنزودیازپین) به روش تزریق داخل بطن مغزی استفاده شدند.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات استفاده شده

آزمایش‌ها بر روی موش‌های صحرایی نر بالغ سالم و بیستار با وزن ۲۵۰ تا ۲۸۰ گرم انجام شد. موش‌ها تحت دمای محیط کنترل شده ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتیگراد با روشنایی از ساعت ۷ قبل از ظهر تا ۷ بعد از ظهر با غذا و آب در دسترس نگهداری شدند. آزمایش‌ها بین ساعت‌های ۱۰ قبل از ظهر تا ۳ بعد از ظهر انجام شدند. آزمایش‌های مربوط به استفاده از موش صحرایی توسط مرکز مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تایید شدند (کد اخلاقی: IR-UU-AEC-3/2-05/04/2023).

### داروهای استفاده شده

در این مطالعه از اورتان، سافرانال، دیازپام، فلومازینیل و پنی سیلین G پتاسیم استفاده شد. پنی سیلین جی پتاسیم از شرکت داروسازی جابرابن حیان تهران، ایران و سایر مواد شیمیایی از شرکت سیگما آلدریج آمریکا<sup>۱۴</sup> خریداری شدند. اورتان، پنی سیلین G پتاسیم در سالین نرمال استریل حل شدند. از کردن سافرانال، دیازپام و فلومازینیل استفاده شد.

### گروه بندی حیوانات

در مطالعه حاضر، ۶۰ موش صحرایی به ۱۰ گروه شش تایی تقسیم شدند:

بیماران اندکی بهبودی یا بدون بهبودی نشان می‌دهند [۳]. از این رو، جستجوی علمی-کاربردی جایگزین‌های قوی به عنوان عوامل ضد صرعی با حداقل عوارض جانبی یک امر ضروری است. زعفران گران‌ترین ادویه به دست آمده از کلاله کروکوس ساتیووس ال<sup>۷</sup> است که در جنوب غربی آسیا و شرق مدیترانه کشت می‌شود و به دلیل داشتن خواص ضد اکسیدانتی، ضد التهابی، ضد التهابی به طور گسترده برای مصارف دارویی استفاده می‌شود [۴]. اثرات مفید گسترده زعفران به علت وجود ترکیباتی مثل کروسین، کروسیتین و سافرانال است [۴]. سافرانال (۲،۶،۶-تری متیل-۱، ۳-سیکلو هگزادین-۱-کربوکسالدئید) به عنوان فراوان‌ترین ماده شیمیایی در اسانس زعفران ۶۰-۷۰ درصد از بخش فرار آن را تشکیل می‌دهد [۵]. مطالعات فارماکولوژیکی خواص ضد درد، ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، ضد آپوپتوز، ضد سرطان، ضد صرعی، تعدیل کننده ایمنی و محافظ بافت سافرانال را پیشنهاد کرده‌اند [۵]. مشخص شده است که سافرانال اثرات محافظت عصبی پر قدرتی را علیه بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مرکزی مانند صرعی، سکته مغزی، بیماری پارکینسون و فراموشی ایجاد می‌کند [۵]. در ارتباط با صرعی مشخص شده است که تجویز عمومی سافرانال تشنج‌های عمومی ناشی از پنتیلن تترازول<sup>۸</sup> را در موش‌های صحرایی کاهش می‌دهد [۶] و از مرگ موش‌های کوچک آزمایشگاهی درمان شده با پنتیلن تترازول جلوگیری می‌کند [۷]. با ثبت فعالیت الکتریکی مغز (الکتروآنسفالوگرافی<sup>۹</sup>)، مشخص شده است که پیش تزریق سافرانال تخلیه امواج نیزه‌ای ناشی از تزریق پنتیلن تترازول، بیکوکولین<sup>۱۰</sup>، باکلوفن<sup>۱۱</sup> و گاما-بوتیرولاکتون<sup>۱۲</sup> را کاهش می‌دهد [۸]. در مدل صرعی با تحریک الکتریکی آمیگدال، سافرانال موجب کاهش مدت زمان تخلیه‌ی متعاقب و مدت زمان مرحله پنج در موش‌های صحرایی شده است [۹].

گیاهان دارویی و محصولات طبیعی آن‌ها به دلیل خواص درمانی منحصر به فرد برای مدیریت و درمان صرعی و تشنج استفاده می‌شوند و توسعه داروهای جدید ضد صرعی و ضد تشنج مبتنی بر گیاه به تمرکز اصلی در صنعت داروسازی تبدیل شده است. باتوجه به این موضوع که سافرانال، به عنوان یکی از محصولات طبیعی زعفران، مکانیسم‌های مختلف از جمله

<sup>11</sup> Baclofen

<sup>12</sup> Gamma-butyrolactone

<sup>13</sup> Human absence epilepsy

<sup>14</sup> Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA

<sup>7</sup> Crocus sativus L.

<sup>8</sup> Pentylenetetrazole

<sup>9</sup> Electroencephalography

<sup>10</sup> Bicucullin

راست برای ایجاد فعالیت صرع موضعی در موش‌های صحرایی به‌طور فراوان استفاده شده است [۱۲، ۱۱].

### ثبت فعالیت الکتریکی قشر مغز (الکتروکورتیکوگرافی<sup>۱۵</sup>)

با استفاده از دو الکتروود سوزنی از جنس نیکل کروم (International Biomedicine, INC, Texas, USA) به طول ۵ میلی‌متر و به قطر ۰/۵ میلی‌متر که در استخوان‌های پیشانی و آهیانه ای راست قرار داده شده بودند، الکتروکورتیکوگرام‌ها ثبت شدند. مختصات محل الکتروودها بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون انتخاب شد [۱۴]. الکتروود پیشانی در یک میلی‌متری قدام برگما و دو میلی‌متری جانب خط وسط و الکتروود آهیانه ای در پنج میلی‌متری خلف برگما و دو میلی‌متری جانب خط وسط قرار داده شدند. علاوه‌براین، یک الکتروود مرجع به گوش سمت راست متصل شد. الکتروودها از طریق یک جفت‌کننده (نوع ۷۱۸۹، Bio-NARCO systems) برای ثبت الکتروکورتیکوگرام به یک فیزیوگراف ۴ کانالی (Physiograph 4-channels, MK-III-P, NARCO) (Bio-systems, Houston, USA) متصل شدند. الکتروکورتیکوگرافی ۱۰ دقیقه قبل از ریز پنی سیلین شروع شد و به‌مدت ۱۸۰ دقیقه پس از آن ادامه یافت. در فواصل زمانی ۲۰ دقیقه‌ای، الکتروکورتیکوگرام به‌مدت یک دقیقه با سرعت ۰/۲۵ سانتی‌متر در ثانیه ثبت شد. علاوه از مدت زمان نهفته تا ظاهر شدن موج نیزه ای اول، تعداد و دامنه امواج الکتروکادیبوگرام‌های ثبت‌شده به‌طور دستی محاسبه شدند [۱۲، ۱۱].

### روش تزریقات داخل صفاقی و داخل بطن جانبی مغز

قبل از ریز تزریق داخل قشری پنی سیلین، سافرانال به حجم یک میلی‌لیتر به یک کیلوگرم وزن بدن با استفاده از سرنگ تزریقی شماره ۲۳ به داخل صفاق تزریق شد. به‌منظور تزریق داخل بطن مغزی سوراخی به قطر یک میلی‌متر در مختصات زیر در استخوان جمجمه ایجاد گردید: ۱/۵ میلی‌متر خلف برگما، ۳ میلی‌متر سمت چپ خط میانی [۱۴]. دیاپام و فلومازنیل با سرنگ هامپلتون پنج میکرولیتری متصل شده به بازوی عمودی دستگاه استریوتاکسی در عمق چهار میلی‌متری از سطح استخوان

گروه ۱ تزریق داخل صفاقی حامل سافرانال (غلظت ۵ درصد توئین ۸۰ در سالی‌ن نرمال) قبل از ریزتزریق داخل قشری پنی‌سیلین را دریافت کرد. گروه‌های ۲، ۳ و ۴ تزریق داخل صفاقی سافرانال را به ترتیب در مقادیر ۰/۲۵، ۱ و ۴ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن قبل از ریزتزریق داخل قشری پنی‌سیلین را دریافت کردند. در گروه ۵ تزریق داخل بطن مغزی حامل فلومازنیل و دیاپام (غلظت ۵ درصد توئین ۸۰ در سالی‌ن نرمال) انجام شد. در گروه‌های ۶، ۷ و ۸ تزریقات داخل بطن مغزی دیاپام و یا فلومازنیل و یا دیاپام بعلاوه فلومازنیل در مقدار ۵ میکروگرم به هر حیوان از هر کدام از آن‌ها قبل از ریزتزریق داخل قشری پنی سیلین انجام شدند. گروه ۹ با تزریق داخل صفاقی حامل سافرانال و تزریق داخل بطن مغزی حامل فلومازنیل قبل از ریزتزریق داخل قشری پنی سیلین درمان شد. گروه ۱۰ موش‌ها با تزریق داخل صفاقی سافرانال (۴ میلی‌گرم به کیلوگرم) بعلاوه تزریق داخل بطن مغزی فلومازنیل (۵ میکروگرم به هر حیوان) قبل از تزریق داخل قشری پنی‌سیلین درمان شدند. مقادیر تجویزی سافرانال، فلومازنیل و دیاپام بر اساس کارهای تحقیقاتی انجام شده [۱۳-۱۱] و آزمایش‌های اولیه ما تعیین شدند.

### روش جراحی و القای فعالیت صرعی شکل

حیوانات با تزریق داخل صفاقی اورتان (۱/۲ گرم به کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند و در صورت نیاز مقدار تکمیلی (۰/۶ گرم به کیلوگرم وزن بدن) داده شد. سپس موش‌ها در دستگاه استریوتاکسی (USA, IL, Wood Dale, Stoelting) قرار گرفتند. با استفاده از یک سیستم پد گرمایشی کنترل شده، دمای بدن بین ۳۶ تا ۳۷ درجه سانتیگراد حفظ شد. ریزتزریق پنی‌سیلین به داخل قشرحسی پیکری راست برای ایجاد فعالیت صرع موضعی اتخاذ شد. برای این‌منظور، با برش دادن پوست سر، سوراخی به قطر ۰/۸ میلی‌متر در جمجمه در مختصات یک میلی‌متر خلف برگما، سه میلی‌متر نسبت به خط میانی برای وارد کردن سرنگ تزریقی به قشر حسی پیکری سمت راست مطابق با اطلس مغز موش‌های پاکسینوس و واتسون ایجاد شد [۱۴]. پنی سیلین G پتاسیم (۳۰۰ واحد بین المللی به حجم ۱/۵ میکرولیتر) با استفاده از سرنگ هامپلتون پنج میکرولیتری در مدت ۶۰ ثانیه به عمق یک و نیم میلی‌متری زیر سطح جمجمه ریزتزریق شد. از ریزتزریق پنی سیلین به داخل قشرحسی پیکری

<sup>15</sup> Electrocorticography

پنی سیلین را نشان می‌دهد. فعالیت پایه از هر کدام از حیوانات ثبت و تایید شد که هیچ یک از حیوانات صرع خود به خودی نداشتند (تصویر الف). فعالیت صرعی ۳-۴ دقیقه پس از ریز تزریق پنی سیلین شروع شد و با تعداد و دامنه تقریباً ثابت تا پایان آزمایش ادامه یافت (تصویر ب). تزریق داخل صفاقی حامل سافرانال (توئین ۵ درصد) تاثیری بر تعداد و دامنه امواج نیزه‌ای القا شده با پنی سیلین نگذاشت (تصویر ج). تزریق داخل صفاقی سافرانال (۰/۲۵ میلی گرم به کیلوگرم) بدون اثر بود (تصویر د)، درحالی که در مقادیر ۱ و ۴ میلی گرم به کیلوگرم سافرانال تعداد و دامنه امواج نیزه‌ای را کاهش داد (تصویر ه و و). دیازپام تعداد و دامنه امواج نیزه‌ای را کاهش داد (تصویر ز) و فلومازنیل آن‌ها را افزایش داد (تصویر ح). فلومازنیل از عملکرد کاهش دهنده‌گی دیازپام و سافرانال جلوگیری کرد (تصویر ط و تصویر ی).

### اثرات سافرانال، فلومازنیل و دیازپام بر مدت زمان نهفته تا ظاهر شدن موج نیزه ای اول القا شده با پنی سیلین

نمودار ۱ اثرات سافرانال، فلومازنیل و دیازپام را بر مدت زمان نهفته تا ظاهر شدن موج نیزه‌ای اول نشان می‌دهد. مدت زمان نهفته تا ظاهر شدن موج نیزه‌ای اول پس از تزریق داخل قشری پنی سیلین  $0.27 \pm 3/74$  دقیقه به دست آمد. آنالیز واریانس یکطرفه اختلاف معنی دار بین گروه‌های درمان شده را نشان داد ( $p < 0.0001$  و  $F_{(9,50)} = 22/36$ ). تجزیه و تحلیل بعدی با آزمون توکی مشخص نمود که تزریق داخل صفاقی سافرانال در مقدار ۰/۲۵ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن بدون اثر بود، درحالی که در مقادیر ۱ و ۴ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن مدت زمان نهفته تا ظاهر شدن موج نیزه‌ای اول القاشده توسط پنی سیلین را به طور معنی دار (به ترتیب  $p < 0.01$  و  $p < 0.001$ ) افزایش داد. به عبارت دیگر، اثر افزایش دهنده‌گی سافرانال بر مدت زمان نهفته تا ظاهر شدن موج نیزه‌ای اول وابسته به مقدار بود. مدت زمان نهفته تا ظاهر شدن موج نیزه‌ای اول القاشده با پنی سیلین پس از تزریق داخل بطن مغزی دیازپام ( $p < 0.001$ ) افزایش یافت. تزریق داخل بطن مغزی فلومازنیل به تنهایی در

مجموعه به داخل بطن جانبی چپ مغز در مدت ۴۵ ثانیه تزریق شدند و برای انتشار کافی محلول های دارویی در داخل بطن، سرنگ هامیلتون به مدت ۳۰ ثانیه دیگر در محل باقی ماند. تزریق داخل صفاقی حامل سافرانال و سافرانال ۳۰ دقیقه و تزریق داخل بطن مغزی حامل دیازپام و فلومازنیل و دیازپام و فلومازنیل به حجم دو میکرولیتر به ترتیب ۱۰ و ۷ دقیقه قبل از ریز تزریق داخل قشری پنی سیلین انجام شدند.

### روش تایید تزریقات داخل قشری و داخل بطن مغزی

در پایان هر آزمایش، دو میکرولیتر جوهر آبی رنگ به داخل بطن جانبی چپ مغز و ۱/۵ میکرولیتر به داخل قشر راست مغز تزریق شدند پس از آسان کشی با تزریق داخل قلبی یک میلی لیتر نسدونال (تیوپنتال سدیم)، مغزها خارج شدند و در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند. سه روز بعد، برش‌های عرضی از مغزها داده شدند و انتشار جوهر در بطن جانبی چپ مغز و قشر راست مغز بر اساس مختصات قید شده در اطلس مغز موش‌های صحرایی [۱۴] مشاهده شدند.

### تجزیه و تحلیل آماری

مقایسه های آماری با استفاده از نرم افزار گراف پد پرسم نسخه ۱۶۸ انجام شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از نقاط زمانی تعداد و دامنه امواج نیزه ای از تحلیل واریانس دو طرفه<sup>۱۶</sup> و سپس آزمون تعقیبی بونفرونی<sup>۱۸</sup> استفاده شد. داده‌های مربوط به مدت زمان نهفته تا ظاهر شدن موج نیزه‌ای اول و میانگین تعداد و دامنه امواج نیزه‌ای در دقایق ثبت شده با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه<sup>۱۹</sup> و سپس آزمون توکی<sup>۲۰</sup> مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تمام مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد از میانگین<sup>۲۱</sup> بیان شدند. معنی داری آماری  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

### نمونه‌های الکتروکورتیکوگرام در گروه‌های مطالعه

تصویر ۱ نمونه‌های الکتروکورتیکوگرام ثبت شده در گروه‌های مطالعه شده در دقیقه ۴۰ پس از تزریق داخل قشری

<sup>19</sup> One-way analysis of variance (ANOVA)

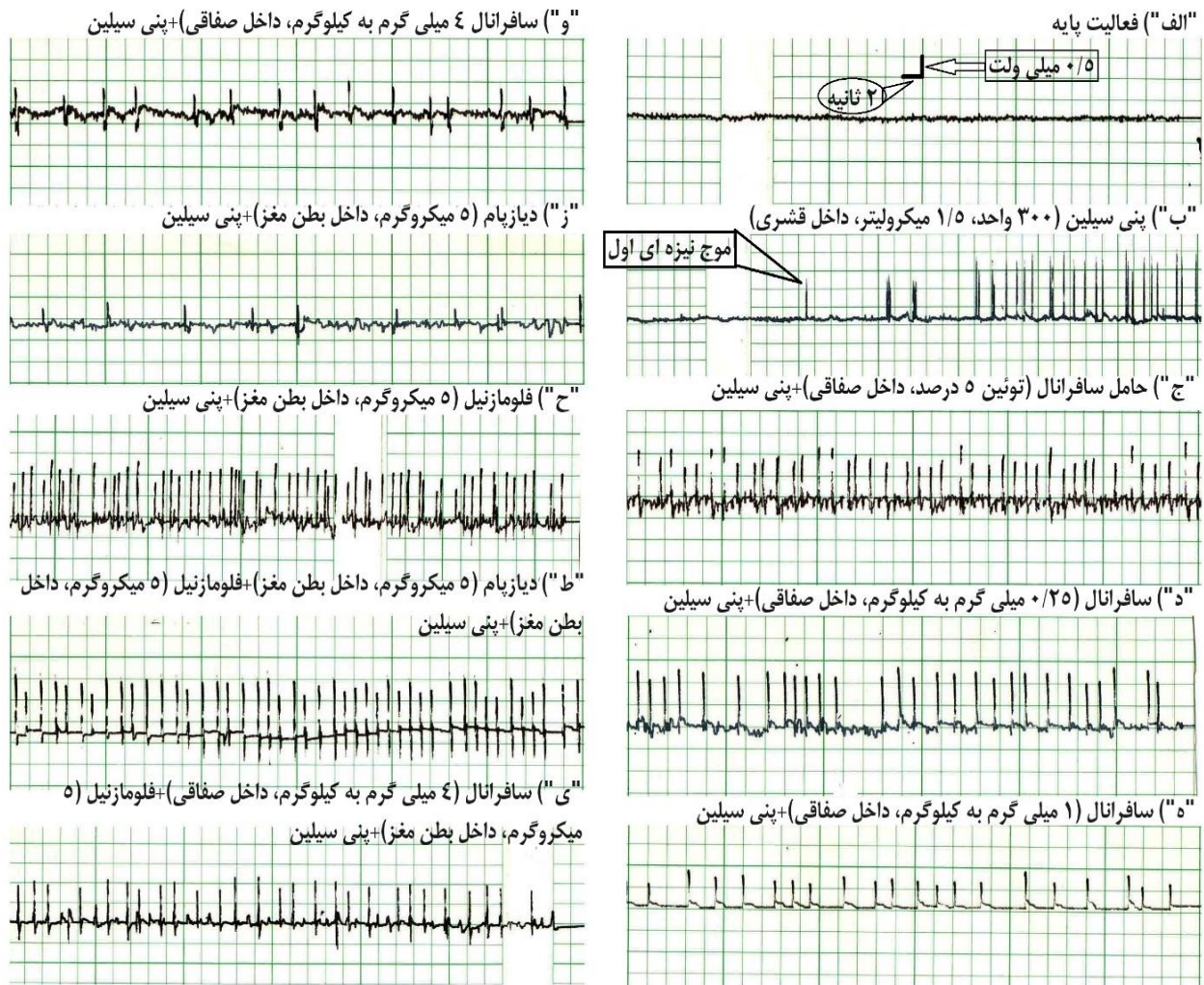
<sup>20</sup> Tuckey post hoc test

<sup>21</sup> Mean  $\pm$  Standard Error of Mean

<sup>16</sup> GraphPad prism software version 8

<sup>17</sup> Two-way analysis of variance (ANOVA)

<sup>18</sup> Bonferroni post hoc test

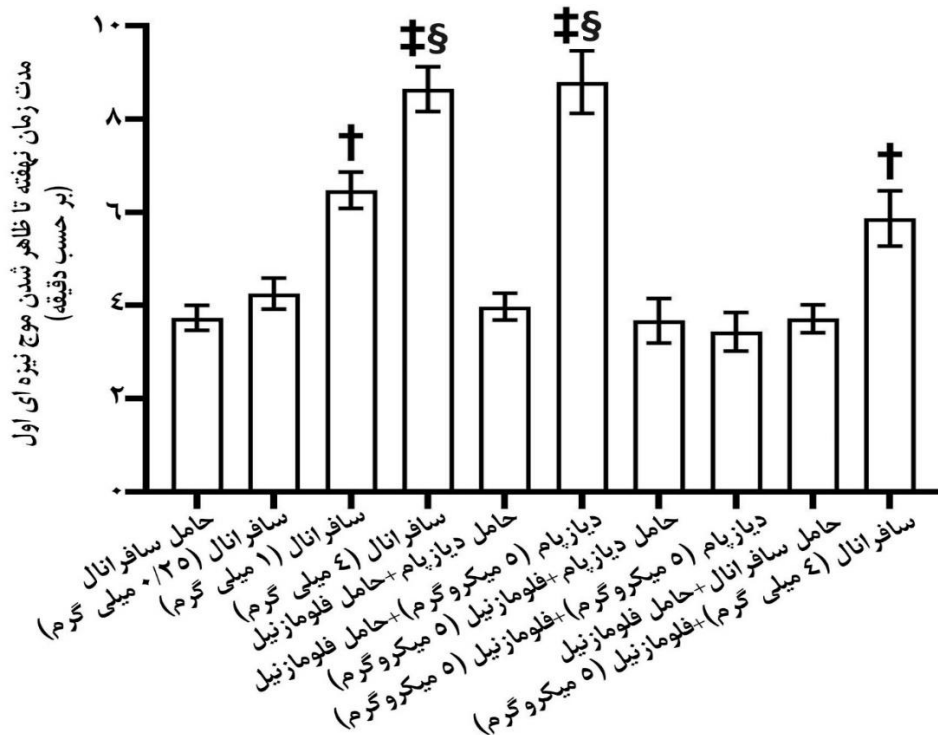


**تصویر ۱-** نمونه‌های الکتروکورتیکوگرافی به دست آمده از قشر حسی پیکری راست موش‌های صحرایی استفاده شده در مطالعه حاضر. الف) فعالیت پایه را نشان می‌دهد که در دقیقه ۱۰ قبل از ریز تزریق پنی‌سیلین ثبت شده است. ب) اولین موج نیزه‌ای (سر پیکان) ناشی از تجویز داخل قشری پنی‌سیلین را نشان می‌دهد. ج) نشان‌دهنده فعالیت صرعی ناشی از تزریق ریز پنی‌سیلین پس از تجویز حامل است (تحلیل آماری تفاوت معنی‌داری را بین روش‌های مختلف تزریق حامل بر فعالیت پایه و بر امواج نیزه‌ای ناشی از پنی‌سیلین نشان نداد و بنابراین در این پانل نمونه الکتروکورتیکوگرام ثبت شده از حامل سافرانال (توئین ۵ درصد) نشان داده شده است. د، ه، و) اثرات سافرانال را به ترتیب در مقادیر ۰/۲۵، ۱ و ۴ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن بر روی فعالیت صرعی ناشی از پنی‌سیلین را نشان می‌دهد. ز، ح، ط) اثرات دیازپام، فلومازنیل و دیازپام + فلومازنیل بر فعالیت صرعی ناشی از پنی‌سیلین نشان داده شده است. ی) اثر سافرانال + فلومازنیل را فعالیت صرعی ناشی از پنی‌سیلین نشان می‌دهد. الکتروکورتیکوگرافی با سرعت ۰/۲۵ سانتی متر بر ثانیه و کالیبراسیون یک سانتیمتر برابر یک میلی ولت ثبت شده است.

### اثرات سافرانال، فلومازنیل و دیازپام بر تعداد امواج نیزه‌ای القاشده با پنی سیلین

نمودار ۲ اثرات سافرانال، فلومازنیل و دیازپام را بر تعداد امواج نیزه‌ای القاشده با پنی‌سیلین را نشان می‌دهد. با در نظر گرفتن اثر سافرانال بر تعداد امواج نیزه‌ای، آنالیز واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری مکرر اختلافات معنی‌دار بین درمان‌ها  $(F_{(3,918)} = 119/1, p < 0/0001)$  و  $p < 0/05$  زمانه‌های زمانی  $p < 0/05$

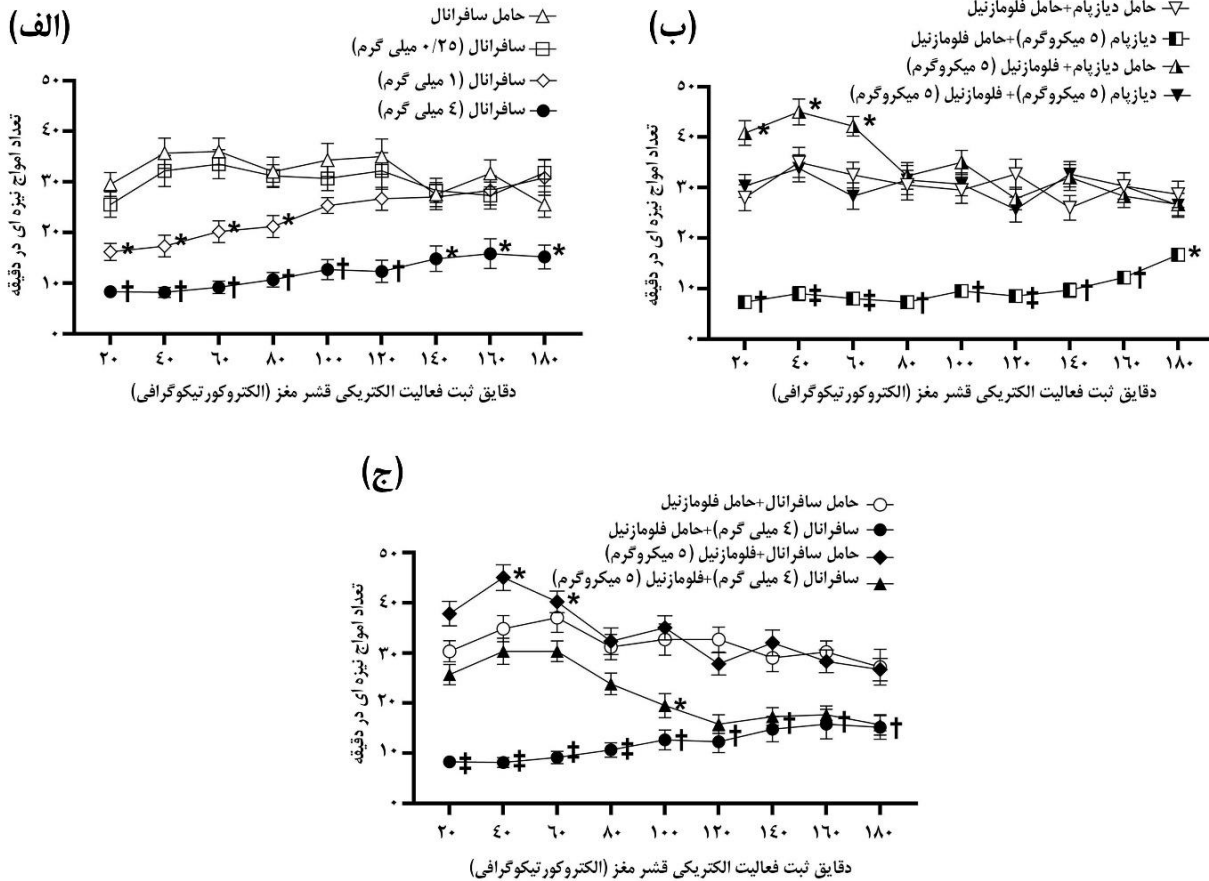
مقدار ۵ میکروگرم اثر معنی‌داری ایجاد نکرد، در حالی که در همین مقدار ذکر شده از عملکرد افزایش‌دهندگی دیازپام (۵ میکروگرم به هر موش صحرایی،  $p < 0/001$ ) و سافرانال (۴ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن،  $p < 0/01$ ) جلوگیری کرد. اثر جلوگیری‌کننده فلومازنیل بر عملکرد افزایش‌دهندگی دیازپام قویتر از سافرانال بود ( $p < 0/01$ ).



**نمودار ۱-** اثرات سافرانال، دیازپام، فلومازینیل، دیازپام + فلومازینیل و سافرانال + فلومازینیل بر مدت زمان نهفته تا ظاهر شدن موج نيزه‌ای اول. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند. تعداد حیوان در هر گروه شش سر موش صحرایی بود. تزریق داخل صفاقی سافرانال ۳۰ دقیقه و تزریقات داخل بطن مغزی دیازپام و فلومازینیل به ترتیب در ۱۰ و ۷ دقیقه قبل از ریز تزریق داخل قشری پنی سیلین انجام شدند. بین گروه‌های بدون نشانه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. †: اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.01$  با تمامی گروه‌های بدون نشانه را نشان می‌دهد. †§: اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.001$  با همه‌ی گروه‌های بدون نشانه را نشان می‌دهد. †: اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  با گروه‌های دارای نشانه † را نشان می‌دهد.

موش صحرایی) تعداد امواج نيزه‌ای القاشده توسط پنی سیلین را در همه دقایق کاهش داد. تزریق داخل تزریق داخل بطنی مغزی فلومازینیل (۵ میکروگرم به هر موش صحرایی) موجب افزایش تعداد امواج نيزه‌ای در دقایق ۲۰، ۴۰ و ۶۰ شد. بعلاوه، تزریق فلومازینیل در مقدار ذکر شده در بالا، از اثر کاهش‌دهندگی دیازپام جلوگیری کرد (نمودار ۲). با توجه به اثرات سافرانال قبل از فلومازینیل بر تعداد امواج نيزه‌ای، آنالیز واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری مکرر اختلافات معنی‌دار بین درمان‌ها ( $p < 0.0001$ ) و  $F(3,180) = 171/3$ ، بازه‌های زمانی ( $p < 0.0001$ ) و  $F(3,180) = 6/372$  را آشکار کرد. تجزیه و تحلیل متعاقب با آزمون بونفرونی مشخص نمود که تزریق داخل بطنی مغزی فلومازینیل (۵ میکروگرم به هر موش صحرایی) از اثر کاهش‌دهندگی سافرانال (۴ میلی گرم به هر کیلوگرم وزن بدن) در دقایق ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ جلوگیری کرد (نمودار ۲ج).

و  $F(8,180) = 2/604$  و تعامل اثر ( $p < 0.01$ ) و  $F(24,180) = 2/141$  را آشکار کرد. تجزیه و تحلیل متعاقب با آزمون بونفرونی مشخص نمود که تزریق داخل صفاقی سافرانال در مقدار ۰/۲۵ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن بدون اثر بود. تزریق داخل صفاقی سافرانال در مقدار ۱ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن تعداد امواج نيزه‌ای القاشده توسط پنی سیلین را در دقایق ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ کاهش داد. تعداد امواج نيزه‌ای القاشده توسط پنی سیلین با تزریق داخل صفاقی سافرانال در همه دقایق ثبت شده کاهش یافت (نمودار ۲الف). آنالیز واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری مکرر اختلافات معنی‌دار بین درمان‌ها ( $p < 0.0001$ ) و  $F(3,180) = 214/2$  و بازه‌های زمانی ( $p < 0.05$ ) و  $F(8,180) = 3/333$  و تعامل اثر ( $p < 0.01$ ) و  $F(24,180) = 3/345$  را با در نظر گرفتن اثر دیازپام و فلومازینیل بر تعداد امواج نيزه‌ای پدیدار کرد. تجزیه و تحلیل متعاقب با آزمون بونفرونی مشخص نمود که تزریق داخل بطن مغزی دیازپام (۵ میکروگرم به هر

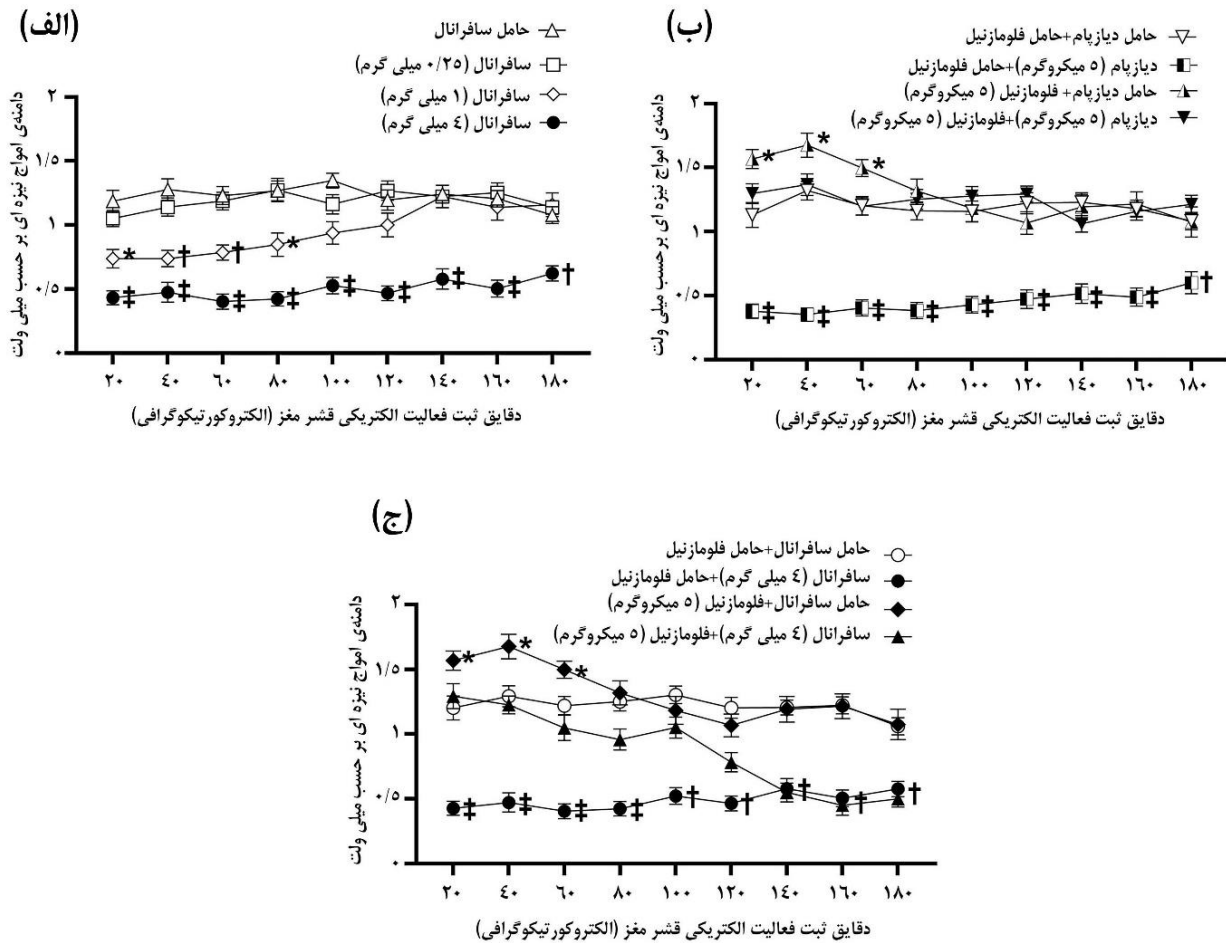


**نمودار ۲- اثرات سافرانال (الف)، دیازپام، فلومازنیل و دیازپام + فلومازنیل (ب)، سافرانال + فلومازنیل (ج) بر تعداد امواج نیزه‌ای.** داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند. تعداد حیوان در هر گروه شش سر موش صحرایی بود. تزریق داخل صفاقی سافرانال ۳۰ دقیقه و تزریقات داخل بطن مغزی دیازپام و فلومازنیل به ترتیب در ۱۰ و ۷ دقیقه قبل از ریز تزریق داخل قشری پنی سیلین انجام شدند. \*؛ اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  با گروه حامل متجانس خودش را نشان می‌دهد. †؛ اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.01$  با گروه حامل متجانس خودش را نشان می‌دهد. ‡؛ اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.001$  با گروه حامل متجانس خودش را نشان می‌دهد.

القاشده توسط پنی سیلین را در دقایق ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ کاهش داد. دامنه امواج نیزه‌ای افزایش یافته توسط پنی سیلین با تزریق داخل صفاقی سافرانال در همه دقایق ثبت شده کاهش یافت (نمودار ۳الف). آنالیز واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری مکرر اختلافات معنی‌دار بین درمان‌ها ( $p < 0.0001$ ) و  $238/6$  و  $(F_{(8,180)} = 2/414)$  و  $(F_{(3,180)} = 185/8)$ ، بازه‌های زمانی ( $p < 0.05$ ) و  $2/893$  ( $F_{(3,180)} = 2/893$ ) را با در نظر گرفتن تعامل اثر ( $p < 0.01$ ) و  $2/038$  ( $F_{(3,180)} = 2/038$ ) را آشکار کرد. تجزیه و تحلیل متعاقب با آزمون بونفرونی مشخص نمود که تزریق داخل بطن مغزی دیازپام (۵ میکروگرم به هر موش صحرایی) دامنه امواج نیزه‌ای القاشده توسط پنی سیلین را در همه دقایق کاهش داد. تزریق داخل تزریق داخل بطنی مغزی فلومازنیل

## اثرات سافرانال، فلومازنیل و دیازپام بر دامنه امواج نیزه‌ای القاشده با پنی سیلین

نمودار ۳ اثرات سافرانال، فلومازنیل و دیازپام را بر دامنه‌ی امواج نیزه‌ای القاشده با پنی سیلین را نشان می‌دهد. با در نظر گرفتن اثر سافرانال بر دامنه امواج نیزه‌ای، آنالیز واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری مکرر اختلافات معنی‌دار بین درمان‌ها ( $p < 0.0001$ ) و  $3/323$  ( $F_{(3,180)} = 185/8$ )، بازه‌های زمانی ( $p < 0.01$ ) و  $3/323$  ( $F_{(3,180)} = 185/8$ ) و  $2/038$  ( $F_{(3,180)} = 2/038$ ) را آشکار کرد. تجزیه و تحلیل متعاقب با آزمون بونفرونی مشخص نمود که تزریق داخل صفاقی سافرانال در مقدار ۰/۲۵ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن اثر نگذاشت. تزریق داخل صفاقی سافرانال در مقدار ۱ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن دامنه امواج نیزه‌ای



**نمودار ۳- اثرات سافرانال (الف)، دیازپام، فلومازنیل و دیازپام + فلومازنیل (ب)، سافرانال + فلومازنیل (ج) بر دامنه‌ی امواج نیزه‌ای.** داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند. تعداد حیوان در هر گروه شش سر موش صحرایی بود. تزریق داخل صفاقی سافرانال ۳۰ دقیقه و تزریقات داخل بطن مغزی دیازپام و فلومازنیل به ترتیب در ۱۰ و ۷ دقیقه قبل از ریزتزریق داخل قشری پنی سیلین انجام شدند. \*؛ اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  با گروه حامل متجانس خودش را نشان می‌دهد. †؛ اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.01$  با گروه حامل متجانس خودش را نشان می‌دهد. ‡؛ اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.001$  با گروه حامل متجانس خودش را نشان می‌دهد.

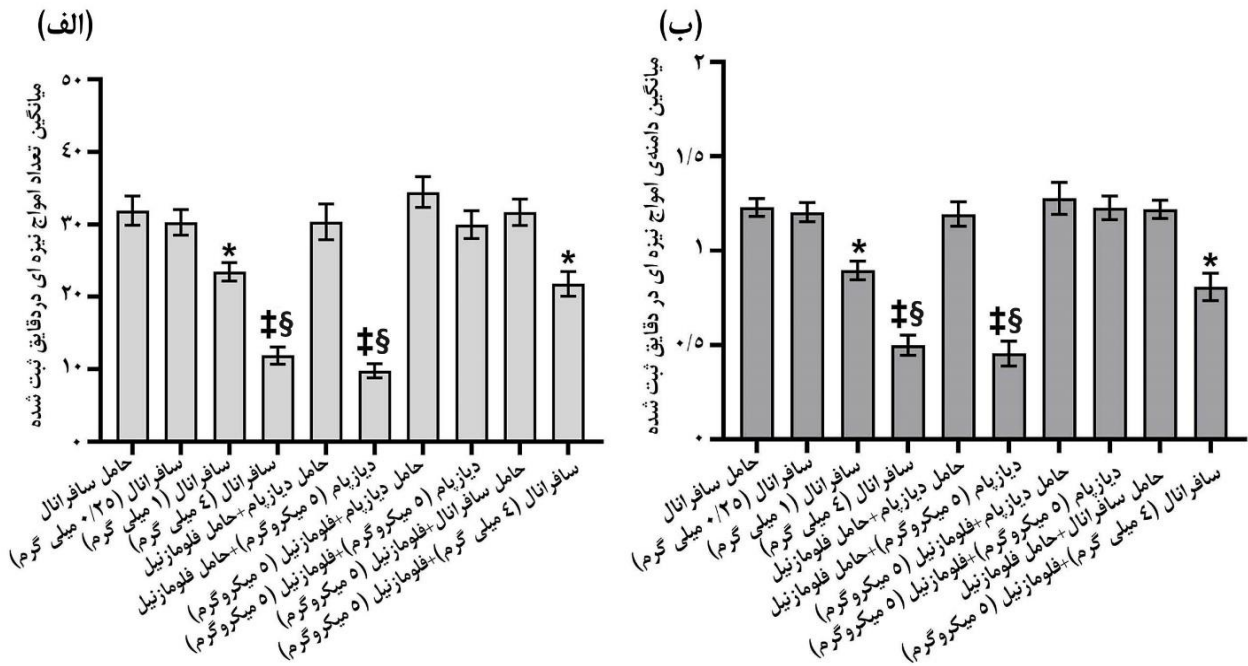
فلومازنیل (۵ میکروگرم به هر موش صحرایی) از اثر کاهش دهنده‌ی سافرانال (۴ میلی گرم به کیلوگرم وزن بدن) در دقایق ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ جلوگیری کرد (نمودار ۳ج).

### اثرات سافرانال، فلومازنیل و دیازپام بر میانگین تعداد و دامنه‌ی امواج نیزه‌ای القا شده با پنی سیلین در دقایق ثبت شده

نمودار ۴ اثرات سافرانال، فلومازنیل و دیازپام بر میانگین تعداد و دامنه‌ی امواج نیزه‌ای القا شده با پنی سیلین را در دقایق ثبت شده نشان می‌دهد. میانگین تعداد امواج نیزه‌ای در دقایق ثبت شده

(۵ میکروگرم به هر موش صحرایی) موجب افزایش دامنه امواج نیزه‌ای در دقایق ۲۰، ۴۰ و ۶۰ شد. بعلاوه، تزریق فلومازنیل در مقدار ذکر شده در بالا، از اثر کاهش دهنده‌ی دیازپام جلوگیری کرد (نمودار ۳ب). با توجه به اثرات سافرانال قبل از فلومازنیل بر تعداد امواج نیزه‌ای، آنالیز واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری مکرر اختلافات معنی‌دار بین درمان‌ها ( $p < 0.0001$ ) و  $F(2,18) = 20.5/8$ ، بازه‌های زمانی ( $p < 0.0001$ ) و  $F(8,18) = 10.4/8$  و تعامل اثر ( $p < 0.0001$ ) و  $F(24,18) = 5.0/94$  را پدیدار نمود. تجزیه و تحلیل متعاقب با آزمون بونفرونی مشخص نمود که تزریق داخل بطنی مغزی





**نمودار ۴-** اثرات سافرانال، دیازپام، فلومازنیل و دیازپام + فلومازنیل، سافرانال + فلومازنیل بر میانگین تعداد (الف) و دامنه‌ی (ب) امواج نیزه‌ای در دقایق ثبت شده. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین نمایش داده شده‌اند. تعداد حیوان در هر گروه شش سر موش صحرایی بود. تزریق داخل صفاقی سافرانال ۳۰ دقیقه و تزریقات داخل بطن مغزی دیازپام و فلومازنیل به ترتیب در ۱۰ و ۷ دقیقه قبل از ریز تزریق داخل قشری پنی سیلین انجام شدند. بین گروه‌های بدون نشانه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. \* اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  با همه‌ی گروه‌های بدون نشانه را نشان می‌دهد. † اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.001$  با همه‌ی گروه‌های بدون نشانه را نشان می‌دهد. ‡ اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.01$  با گروه‌های دارای نشانه \* را نشان می‌دهد.

تزریق داخل قشری پنی سیلین  $0.05 \pm 1/23$  میلی‌ولت به دست آمد (نمودار ۴ب). تزریق داخل صفاقی سافرانال در مقدار  $0.25$  میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن اثر معنی‌داری ایجاد نکرد ( $0.05 \pm 1/21$  میلی‌ولت)، درحالی‌که در مقدار ۱ و ۴ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن میانگین دامنه‌ی امواج نیزه‌ای را به ترتیب به  $0.04 \pm 0.88$  میلی‌ولت ( $p < 0.05$ ) و  $0.49 \pm 0.49$  میلی‌ولت ( $p < 0.001$ ) کاهش داد (نمودار ۴ب). تزریق داخل بطنی مغزی دیازپام در مقدار ۵ میکروگرم موجب کاهش معنی‌دار ( $0.07 \pm 0.46$  میلی‌ولت،  $p < 0.001$ ) میانگین دامنه‌ی امواج نیزه‌ای شد. تزریق داخل بطنی مغزی فلومازنیل (۵ میکروگرم) بدون اثر بود ( $0.08 \pm 1/28$  میلی‌ولت) (نمودار ۴ب). تزریق داخل بطن مغزی فلومازنیل به طور معنی‌دار اثر کاهش‌دهندگی داخل بطن مغزی دیازپام ( $p < 0.001$ ) و تزریق داخل صفاقی سافرانال ( $0.05 < p < 0.05$ ) را مهار نمود. بین اثر مهار فلومازنیل بر عملکرد کاهش‌دهندگی دیازپام نسبت به سافرانال اختلاف معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) مشاهده شد (نمودار ۴ب).

متعاقب تزریق داخل قشری پنی سیلین  $2/02 \pm 31/91$  عدد به دست آمد (نمودار ۴الف). تزریق داخل صفاقی سافرانال در مقدار  $0.25$  میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن بدون اثر بود ( $29/76 \pm 30/1$  عدد)، در حالی‌که در مقدار ۱ و ۴ میلی‌گرم به کیلوگرم وزن بدن میانگین تعداد امواج نیزه‌ای را به ترتیب به  $1/27 \pm 23/44$  عدد ( $p < 0.05$ ) و  $1/18 \pm 11/91$  عدد ( $p < 0.001$ ) کاهش داد (نمودار ۴الف). تزریق داخل بطنی مغزی دیازپام در مقدار ۵ میکروگرم موجب کاهش معنی‌دار ( $0.98 \pm 9/79$  عدد،  $p < 0.001$ ) میانگین تعداد امواج نیزه‌ای شد. تزریق داخل بطنی مغزی فلومازنیل (۵ میکروگرم) اثر معنی‌داری ایجاد نکرد ( $34/2 \pm 46/21$  عدد) (نمودار ۴الف). تزریق داخل بطن مغزی فلومازنیل به طور معنی‌دار از اثر کاهش‌دهندگی داخل بطن مغزی دیازپام ( $p < 0.001$ ) و تزریق داخل صفاقی سافرانال ( $p < 0.05$ ) جلوگیری کرد. بین اثر مهار فلومازنیل بر عملکرد کاهش‌دهندگی دیازپام نسبت به سافرانال اختلاف معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) مشاهده شد (نمودار ۴الف). میانگین دامنه‌ی امواج نیزه‌ای در دقایق ثبت شده متعاقب

## بحث

در این مطالعه ریز تزریق پنی سیلین به داخل قشر حسی پیکری مغز فعالیت صرعی شکل با امواج نیزه‌ای با مشخصات شامل مدت زمان نهفته تا ظاهر شدن موج نیزه‌ای اول  $0/27 \pm 3/74$  دقیقه، میانگین تعداد و دامنه امواج نیزه‌ای در طول مدت ثبت (۱۸۰ دقیقه) به ترتیب  $0/99 \pm 31/91$  عدد در دقیقه و  $0/3 \pm 1/22$  میلی‌ولت ایجاد کرد. نتایج ما تقریباً مطابق با سایر یافته‌ها هستند که در آن‌ها پس از ریز تزریق داخل قشری مقادیر ۲۰۰ تا ۵۰۰ واحد بین المللی پنی سیلین مدت زمان نهفته ۲ تا ۴ دقیقه، تعداد امواج نیزه‌ای بین ۳۰ تا ۴۰ موج در دقیقه و دامنه بین ۱/۱ تا ۱/۵ میلی‌ولت گزارش شده‌اند [۱۱، ۱۲]. پنی سیلین‌ها یکی از قدیمی‌ترین گروه‌های آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که هنوز هم مورد استفاده قرار می‌گیرند. تجربه‌های بالینی نشان داده‌اند که استفاده تجویز عمومی مقادیر بالای پنی سیلین در انسان می‌تواند تشنج تونیک کلونیک و آسیب‌های مغزی ایجاد کند [۱۵]. در همین رابطه، ریز تزریق پنی سیلین در نواحی مختلف قشر مغز از جمله نواحی حرکتی و حسی پیکری به‌عنوان یک مدل ایجاد فعالیت صرعی شکل معرفی و به‌طور گسترده برای بررسی مکانیسم‌های صرع استفاده شده است [۱۱، ۱۲، ۱۶]. پنی سیلین با مهار گیرنده‌های گابا، به دلیل شباهت ساختاری آن به یک آنتاگونیست خاص گیرنده گابا، یعنی بیکوکولین، تعادل تحریک-مهار در بافت‌های قشر مغز را تغییر می‌دهد و در نتیجه منجر به تخلیه ریتیمیک صرعی می‌شود [۱۱، ۱۲، ۱۶].

در مطالعه حاضر، دیازپام فعالیت صرعی شکل پنی سیلین را کاهش داد. این عملکرد با یافته‌های دیگر که در آن‌ها تزریقات داخل صفاقی و داخل بطن مغزی و داخل قشر مغزی دیازپام اثرات ضدصرعی شکل در مدل تزریق داخل قشری پنی سیلین ایجاد کرده‌اند همخوانی دارد [۱۱، ۱۲، ۱۷]. دیازپام و سایر داروهای متعلق به دسته دارویی بنزودیازپینی<sup>۲۲</sup> و همچنین باربیتورات‌ها<sup>۲۳</sup> و نورواستروئیدها<sup>۲۴</sup> که روی هم به‌عنوان گابا کین‌ها شناخته شده‌اند، به جایگاه‌های اختصاصی در گیرنده‌های گابا<sup>۲۵</sup> متصل و موجب ورود یون‌های کلر به داخل نورون‌ها می‌شوند و وضعیت الکتریکی نورون‌ها را به نفع میانجی عصبی مهاری گابا تغییر می‌دهند و از این طریق تخلیه ریتیمیک

صرعی شکل را یا کاهش می‌دهند و یا جلوگیری می‌کنند [۱۸]. در این مطالعه، فلومازنیل برای مدت کوتاهی موجب افزایش فعالیت صرعی شکل شد و از عملکرد کاهش‌دهندگی دیازپام به‌طور کامل جلوگیری کرد. فلومازنیل یک آنتاگونیست مجتمع گیرنده گابا/بنزودیازپین است و به‌طور رقابتی فعالیت بنزودیازپین‌ها و مواد غیر بنزودیازپینی را که با محل گیرنده‌های بنزودیازپین در مجتمع گیرنده گابا/بنزودیازپین تعامل دارند، مهار می‌کند. همچنین می‌تواند اتصال بنزودیازپین‌ها به گیرنده‌های بنزودیازپین را معکوس کند [۱۹]. در راستای آشکار شدن نقش مجتمع گیرنده گابا/بنزودیازپین بر فعالیت صرعی مشخص شده است که تزریق داخل صفاقی دیازپام تشنج ناشی از پیلوکارپین در موش صحرایی را تخفیف می‌دهد و موجب کاهش میزان افزایش یافته‌ی گلوتامات در هیپوکامپ می‌شود و تزریق داخل صفاقی فلومازنیل از این عملکردهای دیازپام جلوگیری می‌کند [۲۰].

نتایج مطالعه فعلی نشان دادند که سافرانال موجب کاهش فعالیت صرعی شکل ناشی از پنی سیلین شد. یافته‌های فارماکولوژیک این موضوع را تایید می‌کنند که سافرانال در مدل‌های مختلف صرع در حیوانات آزمایشگاهی اثرات ضدصرع ایجاد می‌کند. در مدل صرع ایجاد شده با تحریک الکتریکی آمیگدال و با استفاده از ثبت فعالیت الکتریکی مغز (الکتروآنسفالوگرافی)، سافرانال آستانه تخلیه متعاقب و مدت زمان تخلیه متعاقب را افزایش داد و مدت زمان نهفته مرحله ۴ را کاهش داد و پیشنهاد گردید که سافرانال اثر ضد تشنج ایجاد می‌کند [۹]. در مدل تشنج ناشی از پنتیلن تترازول در موش‌های کوچک آزمایشگاهی تزریق داخل صفاقی سافرانال مدت زمان نهفته تا شروع تشنج را افزایش و وقوع تشنج‌ها را کاهش داده است [۶]. بعلاوه، سافرانال تشنج‌های القا شده با گاما-بوتیرولاکتون، پنتیلن تترازول و پیکروتوکسین را تخفیف داده است [۸]. سافرانال قابل حمل توسط حامل‌های لیپیدی نانوساختاری<sup>۲۶</sup> وقوع تشنج را در مدل حاد تشنج القا شده با پیلوکارپین و در مدل مزمن القا شده با پنتیلن تترازول را در موش‌های کوچک آزمایشگاهی کاهش داده است [۲۱]. در این مطالعه عملکرد ضدصرعی سافرانال با فلومازنیل مهار شد که می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که اثر ضدصرعی سافرانال

<sup>25</sup> GABA<sub>A</sub>

<sup>26</sup> Nanostructured lipid vehicle carried safranal

<sup>22</sup> Benzodiazepines

<sup>23</sup> Barbiturates

<sup>24</sup> Neurosteroids

دiazepam و فلومازنیل بر خط پایه در ثبت‌های فعالیت الکتریکی قشر مغز در مطالعات قبلی گزارش شده است [۸، ۱۱، ۱۲]. حامل سافرانال، diazepam و فلومازنیل یعنی توئین ۵ درصد بر خط پایه و همچنین بر تعداد و دامنه امواج نیزه‌ای در فعالیت الکتریکی قشر مغز القاشده با پنی‌سیلین اثر نگذاشت.

### نتیجه‌گیری

سافرانال، یکی از ترکیبات شیمیایی فعال زیستی زعفران، برای ایجاد اثر ضد صرعی شکل بر علیه فعالیت صرعی شکل القاشده با پنی‌سیلین از واسطه‌گری مجتمع گیرنده‌ای گابا آ-بنزودیازپین استفاده می‌کند. همچنین این امکان وجود دارد که از سایر مکانیسم‌های ضد صرعی نیز بهره گرفته باشد. شناخت مکانیسم‌های درگیر در اثر ضد صرعی مواد موثر گیاهان دارویی به یافتن داروهایی موثرتر برای بهبود روش‌های مدیریت صرع بسیار سودمند هستند.

### سپاسگزاری

از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه تقدیر و تشکر می‌گردد.

### ملاحظات مالی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه (پژوهانه شماره ۱۴۰۰-۰۵-۱۳-۱۰-۴۹۳-۱۰-۱۰) انجام شده است.

### تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

### نقش نویسندگان

س.ت.: انجام مطالعه و جمع‌آوری داده‌ها و نگارش مقاله؛  
ا.ع.: ایده و طراحی مطالعه، نظارت بر انجام مطالعه، آنالیز داده‌ها و نگارش مقاله؛ ا.ت.: انجام مطالعه و جمع‌آوری داده‌ها، اصلاح مقاله؛ ف.س.ت.: انجام مطالعه و تایید محل‌های تزریق و اصلاح مقاله.

احتمالاً از طریق گیرنده‌های مجتمع گابا آ-بنزودیازپین به ثمر می‌رسد. در همین ارتباط مشخص شده است که پیش‌درمانی با فلومازنیل از عملکرد ضد تشنج سافرانال در مدل تشنج ناشی از پنتیلین تترازول جلوگیری می‌کند [۶]. از فلومازنیل برای پی‌بردن به بهره‌گیری از گیرنده‌های مجتمع گابا آ-بنزودیازپین در مکانیسم اثر ترکیبات شیمیایی صناعی و طبیعی ضد صرع به کرات استفاده شده است. به‌عنوان مثال، در مدل تشنج القاشده با پنتیلین تترازول تجویز اسانس روغنی بذر مرزه‌ی بختیاری<sup>۲۷</sup> مدت زمان نهفته تا شروع تشنج را افزایش و تعداد تشنج‌های سر و اندام‌های حرکتی فوقانی و پرش‌ها را کاهش داد و فلومازنیل از این اثرات جلوگیری کرد [۲۲].

در مطالعه حاضر، عملکرد ضد صرعی diazepam بر تعداد و دامنه‌ی امواج نیزه‌ای در همه‌ی دقایق ثبت شده و همچنین میانگین تعداد و دامنه امواج نیزه‌ای در دقایق ثبت شده توسط فلومازنیل به‌طور کامل مهار شد، درحالی‌که اثر مهار فلومازنیل بر عملکرد ضد صرعی سافرانال فقط بر تعداد و دامنه‌ی امواج نیزه‌ای در دقایق ۲۰، ۴۰ و ۶۰ مشاهده شد ولی میانگین تعداد و دامنه‌ی امواج نیزه‌ای تحت تاثیر قرار نگرفت که نشان می‌دهد اثر مهار فلومازنیل بر عملکرد ضد صرعی diazepam کامل می‌باشد درحالی‌که عملکرد ضد صرعی سافرانال را به‌طور نسبی مهار می‌کند. این نتایج نشان‌دهنده‌ی این موضوع هستند که سافرانال احتمالاً از سایر مکانیسم‌های ضد صرع نیز استفاده می‌کند. برای مثال، سیستم اپیوئیدی را می‌تواند به خدمت بگیرد چون نالوکسون (آنتاگونیست غیر اختصاصی گیرنده‌های اپیوئیدی) از عملکرد ضد تشنج سافرانال در کاهش دادن تشنج کلونیک حداقل در مدل تشنج القاشده با پنتیلین تترازول جلوگیری کرده است [۶]. همچنین سافرانال با مکانیسم‌های ضد اکسیدانسی و ضد التهابی اثرات بهبوددهندگی در بیماری‌های نورولوژیک مثل صرع، سکت، پارکینسون و فراموشی ایجاد کرده است [۲۳]. در همین رابطه، نقش سیستم اکسیداتیو (افزایش مقدار مالون‌دی‌آلدئید) و واسطه‌های التهابی (افزایش فاکتور نکروز تومور) در بروز تغییرات فعالیت الکتریکی قشر مغز پس از ریز تزریق داخل قشری پنی‌سیلین گزارش شده است [۲۴].

در این مطالعه، سافرانال، diazepam و فلومازنیل بر خط پایه فعالیت الکتریکی قشر مغز اثر نگذاشتند. بدون اثر بودن سافرانال،

<sup>27</sup> *Satureja bachtiarica* essential oil

## فهرست منابع

- [1] Hu T, Zhang J, Wang J, Sha L, Xia Y, Ortyl TC, Tian X, Chen L, Advances in epilepsy: Mechanisms, clinical trials, and drug therapies. *J Med Chem* 7 (2023) 4434-4467.
- [2] Akyuz E, Polat AK, Eroglu E, Kullu I, Angelopoulou E, Paudel YN, Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review. *Life Sci* 265 (2021) 118826.
- [3] Wei CX, Bian M, Gong GH, Current research on antiepileptic compounds. *Molecules* 20 (2015) 20741-20776.
- [4] Khoshandam A, Razavi BM, Hosseinzadeh H, Interaction of saffron and its constituents with Nrf2 signaling pathway: A review. *Iran J Basic Med Sci* 25 (2022) 789-798.
- [5] Esmaealzadeh D, Moodi Ghalibaf A, Shariati Rad M, Rezaee R, Razavi BM, Hosseinzadeh H, Pharmacological effects of safranin: An updated review. *Iran J Basic Med Sci* 26 (2023) 1131-1143.
- [6] Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Protective effect of safranin on pentylenetetrazol-induced seizures in the rat: involvement of GABAergic and opioids systems. *Phytomedicine* 14 (2007) 256-262.
- [7] Hosseinzadeh H, Talebzadeh F, Anticonvulsant evaluation of safranin and crocin from *Crocus sativus* in mice. *Fitoterapia* 76 (2005) 722-724.
- [8] Sadeghnia HR, Cortez MA, Liu D, Hosseinzadeh H, Snead OC 3rd. Antiabsence effects of safranin in acute experimental seizure models: EEG and autoradiography. *J Pharm Pharm Sci* 11 (2008) 1-14.
- [9] Saberi F, Saberi M, Sayyah M, Boojar MMA, The antiepileptic activity of Safranin in kindling model of epilepsy in male rats. *Braz J Pharm Sci* 58 (2022) e20066.
- [10] Meeren H, van Luijckelaar G, da Silva FL, Coenen A, Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch Neurol* 62 (2005) 371-376.
- [11] Erfanparast A, Tamaddonfard E, Effects of intracortical microinjection of vitamin B<sub>12</sub> on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 75 (2015) 200-207.
- [12] Tamaddonfard E, Erfanparast A, Hamzeh-Gooshchi N, Yousofizadeh S, Effect of curcumin, the active constituent of turmeric, on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Avicenna J Phytomed* 2 (2012) 196-205.
- [13] Tamaddonfard E, Erfanparast A, Farshid AA, Imani M, Mirzakhani N, Salighedar R, Tamaddonfard S, Safranin, a constituent of saffron, exerts gastro-protective effects against indomethacin-induced gastric ulcer. *Life Sci* 224 (2019) 88-94.
- [14] Paxinos G, Watson C, The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. New York, Elsevier Academic Press, 2007.
- [15] Wanleenuwat P, Suntharampillai N, Iwanowski P, Antibiotic-induced epileptic seizures: mechanisms of action and clinical considerations. *Seizure* 81 (2020) 167-174.
- [16] Arslan G, Avci B, Kocacan SE, Rzayev E, Ayyildiz M, Agar E, The interaction between P2X<sub>7</sub>Rs and T-type calcium ion channels in penicillin-induced epileptiform activity. *Neuropharmacology* 149 (2019) 1-12.
- [17] Ögin MN, Çetinkaya A, Beyazçiçek E, The effect of vortioxetine on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Arq Neuropsiquiatr* 77 (2019) 412-417.
- [18] Cerne R, Lippa A, Poe MM, Smith JL, Jin X, Ping X, Golani LK, Cook JM, Witkin JM, GABA<sub>A</sub>kinases - Advances in the discovery, development, and commercialization of positive allosteric modulators of GABA<sub>A</sub> receptors. *Pharmacol Ther* 234 (2022) 108035.
- [19] Zhu S, Noviello CM, Teng J, Walsh RM Jr, Kim JJ, Hibbs RE, Structure of a human synaptic GABA<sub>A</sub> receptor. *Nature* 559 (2018) 67-72.
- [20] Khan GM, Smolders I, Ebinger G, Michotte Y, Flumazenil prevents diazepam-elicited anticonvulsant action and concomitant attenuation of glutamate overflow. *Eur J Pharmacol* 407 (2000) 139-144.
- [21] Bo-Qiang L, Si-Tong Z, Zu-Yuan L, Wan-Yun N, Bin C, Yuan L, Xuyun L, Liangen M, You-Chao C, Xin-Zhen Y, Zhong C, Xiao-Ying Y, Wei-Wei H, Safranin carried by nanostructured lipid vehicles inhibits generalized epilepsy in mice. *Pharmazie* 73 (2018) 207-212.
- [22] Rabiei Z, Shirchi M, Rafeian-Kopaei M, Asgharzade S, Effects of *Satureja bachtiarica* essential oil in preventing seizure in pentylenetetrazol-kindled mice. *Basic Clin Neurosci* 13 (2022) 465-475.
- [23] Fazeli E, Ghalibaf MHE, Forouzanfar F, Neuroprotective potency of safranin against neurological disorders. *Curr Mol Med* 23 (2023) 952-959.
- [24] Sumbul O, Aygun H, Electrocorticographic and electrocardiographic evaluation of lacosamide in a penicillin-induced status epilepticus model. *Epilepsy Res* 180 (2022) 106866.

## Research paper

The effect of safranal on epileptiform activity induced by penicillin: Role of somatosensory cortex GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor complexSina Tamaddonfard<sup>1</sup>, Amir Erfanparast<sup>1\*</sup>, Esmaeal Tamaddonfard<sup>1</sup>, Farhad Soltananejad-Taghiabad<sup>1</sup>*Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*

Received: 9 January 2024

Accepted: 23 January 2024

## Abstract

**Background and Aim:** Safranal is one of the bioactive compounds of saffron and has analgesic, anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-cancer properties. In a variety of pathological states of the nervous system, safranal has shown a powerful neuroprotective effect. In this study, the effect of safranal on penicillin-induced epileptic activity was investigated. GABA-benzodiazepine receptor complex antagonist (flumazenil) was used to follow the possible mechanism of action.

**Methods:** Epileptiform activity was induced by intra-somatosensory cortex microinjection of penicillin (300 IU, 1.5  $\mu$ L) in urethane-anesthetized rats. Electrographic recordings were used to record the latency time to first spike appearance and to analyze the frequency and amplitude of spike waves. Safranal was intraperitoneally injected and flumazenil and diazepam (as a positive control group) were intracerebroventricularly administered.

**Results:** The first spike wave was appeared  $3.74 \pm 0.27$  min after penicillin microinjection. Penicillin also produced  $31.91 \pm 0.99$  spike wave per min with an amplitude of  $1.22 \pm 0.03$  mV. Intraperitoneal injection of safranal (1 and 4 mg/kg) and intracerebroventricular administration of diazepam (5  $\mu$ g per animal) reduced both the number and amplitude of spike waves. Intracerebroventricular injection of flumazenil (5  $\mu$ g per animal) prevented diazepam (5  $\mu$ g per animal)-, and safranal (4 mg/kg)-induced anti-epileptiform activity.

**Conclusion:** The results indicated an anti-epileptiform activity for safranal. It was also found that the central GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor complex might be involved in the antiepileptic activity of safranal.

**Keywords:** Penicillin, Safranal, Epileptiform activity, GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor complex, Rat

Please cite this article as follows:

Tamaddonfard S, Erfanparast A, Tamaddonfard E, Soltananejad-Taghiabad F, The effect of safranal on epileptiform activity induced by penicillin: Role of somatosensory cortex GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptor complex. *Iran J Physiol Pharmacol* 7 (2023) 206-218.

\*Corresponding author: a.erfanparast@urmia.ac.ir (ORCID ID: 0000-0003-2526-2253)