

Anticonvulsant Effect of Quinic Acid in Pentylenetetrazol-induced Seizures in Mice: Investigating the Role of Oxidative Stress Pathway and Nitric Oxide

Raeisi Behnam¹, Amini-Khoei Hossein², Mortazavi Seyed Mohsen³, Rahimi-Madiseh Mohammad⁴, Lorigooini Zahra⁵

1. MD Student, Student Research Committee, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. ORCID ID: 0009-0007-1721-7133

2. Associate Professor, Medical Plants Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. ORCID ID: 0000-0002-5029-9632

3. Staff, Medical Plants Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1252-5130

4. Associate Professor, Medical Plants Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3108-4708

5. Associate Professor, Medical Plants Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran., (Corresponding Author), Tel: +98-38-33346692, Email: z.lorigooini@gmail.com. ORCID ID: 0000-0003-0844-7571

ABSTRACT

Background and Aim: Epilepsy is a central nervous system disorder in which the activity of nerve cells in the brain is disrupted and leads to seizures. Despite the variety of available anticonvulsant drugs, approximately 30% of patients are resistant to conventional therapies. Nowadays, attention to drugs of natural origin, especially plant sources, has increased. Due to the effects of quinic acid, including antioxidant, anti-inflammatory, hepatoprotective, and immune cell-enhancing properties, this study aimed to determine the anticonvulsant effect of quinic acid in pentylenetetrazole-induced seizures in mice by investigating the possible role of the oxidative stress pathway and nitric oxide.

Materials and Methods: In this experimental study, 48 male mice were divided into 6 groups of 8. The first group received PTZ at a dose of 90 mg/kg, the second to fifth groups received quinic acid at doses of 5, 10, 20, and 40 mg/kg, and the sixth group received Diazepam at a dose of 10 mg/kg. One week after quinic acid administration, seizures were induced in all mice by intravenous injection of pentylenetetrazole.

Results: Quinic acid at doses of 20 and 40 mg/kg significantly increased seizure threshold compared to the group treated with normal saline ($P < 0.001$). Quinic acid treatment reduced serum nitrite and malondialdehyde levels of brain tissue ($P < 0.001$). Quinic acid treatment also increased serum and brain tissue antioxidant activity in mice. Quinic acid significantly reduced the expression of iNOS and nNOS genes compared to the normal saline group ($P < 0.01$).

Conclusion: Quinic acid seems to have potential anticonvulsant effects. Its mechanism of action is probably to inhibit neuroinflammation and act through the nitric oxide pathway

Keywords: Seizure, Quinic acid, Pentylenetetrazole, Oxidative stress, Nitric oxide

Received: Feb 9, 2024

Accepted: Oct 20, 2024

How to cite the article: Raeisi Behnam, Amini-Khoei Hossein, Mortazavi Seyed Mohsen, Rahimi-Madiseh Mohammad, Lorigooini Zahra. Anticonvulsant Effect of Quinic Acid in Pentylenetetrazol-induced Seizures in Mice: Investigating the Role of Oxidative Stress Pathway and Nitric Oxide. SJKU 2025;30(1):12-30.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

اثر ضد تشنجی کوئینیک اسید در تشنج القا شده با پنتیلن ترازول در موش: بررسی نقش

مسیر استرس اکسیداتیو و نیتریک اکسید

بهنام رئیسی^۱، حسین امینی خوئی^۲، سید محسن مرتضوی^۳، محمد رحیمی مدیسه^۴، زهرا لری گوئی^۵

۱. دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ایران. کد ارکید: ۷۱۳۳-۱۷۲۱-۰۰۰۷-۰۰۰۹
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ایران. کد ارکید: ۹۶۳۲-۵۰۲۹-۰۰۰۲-۰۰۰۰
۳. کارمند، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ایران. کد ارکید: ۵۱۳۰-۱۲۵۲-۰۰۰۳-۰۰۰۰
۴. دانشیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ایران. کد ارکید: ۴۷۰۸-۳۱۰۸-۰۰۰۲-۰۰۰۰
۵. دانشیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ایران، (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: z.lorigooini@gmail.com، تلفن ثابت: ۰۳۸-۳۳۳۴۶۶۹۲، کد ارکید: ۷۵۷۱-۰۸۴۴-۰۰۰۳-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: صرع یک اختلال سیستم عصبی مرکزی است که در آن فعالیت سلول‌های عصبی در مغز مختل شده و منجر به تشنج می‌گردد. علی‌رغم تنوع داروهای ضد تشنج موجود، تقریباً ۳۰٪ بیماران نسبت به درمان‌های معمول مقاوم هستند. امروزه توجه به داروهای با منشأ طبیعی افزایش یافته است که با توجه به تأثیرات کوئینیک اسید از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، هدف از این مطالعه تعیین اثر ضد تشنجی کوئینیک اسید در تشنج القا شده با پنتیلن ترازول در موش با بررسی نقش احتمالی مسیر استرس اکسیداتیو و نیتریک اکسید بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۴۸ سر موش سوری نر، به ۶ گروه ۸ تایی تقسیم‌بندی شدند. گروه اول دریافت کننده نرمال سالین، گروه دوم تا پنجم گروه‌های دریافت کننده کوئینیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گروه ششم دریافت کننده دیازپام با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بودند. بعد از فاصله زمانی یک هفته از تجویز کوئینیک اسید، تشنج در تمام موش‌ها با پنتیلن ترازول با دوز ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تزریق وریدی القا شد.

یافته‌ها: کوئینیک اسید در دوزهای ۲۰، ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه تحت درمان با نرمال سالین، آستانه تشنج را به طور قابل توجهی افزایش داد ($P < 0/001$). تیمار با کوئینیک اسید توانست سطح نیتريت و مالون دی آلدئید در سرم و بافت مغز را کاهش دهد ($P < 0/001$). همچنین تیمار با کوئینیک اسید سبب افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی سرم و بافت مغز در موش‌ها شد. کوئینیک اسید به طور معناداری میزان بیان ژن iNOS و nNOS را نسبت به گروه دریافت کننده نرمال سالین کاهش داد ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد کوئینیک اسید دارای اثرات ضد تشنجی بالقوه‌ای است که احتمالاً مکانیسم اثر آن مهار التهاب عصبی و همچنین مسیر نیتریک اکسید است.

کلمات کلیدی: تشنج، کوئینیک اسید، پنتیلن ترازول، استرس اکسیداتیو، نیتریک اکسید

وصول مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۲۰ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۳/۷/۲۳ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۲۹

مقدمه

بیماری صرع به‌عنوان یک اختلال نورولوژیک مزمن با تشنج‌های مکرری که ناشی از تخلیه ناگهانی و بی‌رویه در گروهی از نورون‌های مغزی به وجود می‌آید، تعریف می‌شود. این بیماری که بر اثر تخلیه الکتریکی نامنظم در مغز ایجاد می‌شود، تأثیرات جسمی و شناختی گسترده‌ای ایجاد می‌کند (۱). با تخمین حدودی ۵۰ میلیون نفر مبتلا در سراسر جهان، صرع به‌عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های نورولوژیک به حساب می‌آید. بر اساس برآوردهای سازمان بهداشت جهانی، سالانه حدود پنج میلیون فرد مبتلا به صرع تشخیص داده می‌شوند. این بحران سلامت جهانی را در هر سن، جنس، نژاد و طبقه اجتماعی در بر گرفته و در جنس مذکر با تفاوت ناچیزی بیشتر از جنس مؤنث است. هر فرد ممکن است در طول زندگی با بیماری صرع درگیر شود. صرع بیشتر در کودکان و افراد مسن ظاهر می‌شود (۲).

نیتریک اکسید (NO) یک مولکول سیگنال‌دهنده است که قابلیت عبور از غشاهای مختلف را دارد. نیتریک اکساید از ال - آرژنین (L-arginine) توسط ایزو آنزیم‌های نیتریک اکساید سنتاز در بافت‌های مختلف تولید می‌شود. با توجه به نقش اساسی NO در فعالیت‌های فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک مغز، برخی مطالعات نشان داده‌اند که افزایش سطح NO با شدت حملات تشنجی در ارتباط مستقیم است و نقش آن در پاتوفیزیولوژی صرع بی‌انکار است (۳).

امروزه به طور گسترده‌ای تحقیقات به دنبال شناسایی و استخراج ترکیبات دارویی جدید هستند، از جمله منابع غنی که از گذشته مورد توجه بسیاری بوده است، گیاهان دارویی هستند از محدودیت‌های تحقیقات در زمینه گیاهان دارویی، تولید داروی استاندارد با ترکیب مشخص است که قابلیت تولید مجدد را داشته باشد. عوامل مختلف مانند تفاوت‌های ژنتیکی، منطقه جغرافیایی، زمان جمع‌آوری گیاه، بخش

مورد استفاده گیاه و روش عصاره‌گیری یا اسانس‌گیری بر ترکیبات داروهای گیاهی و اثربخشی آن‌ها اثر می‌گذارند، لذا اخیراً مطرح شده است که با شناسایی ترکیبات فعال گیاهان و ارزیابی تأثیر آن‌ها در مدل‌های حیوانی و کارآزمایی‌های بالینی می‌توان داروی با ترکیب مشخص دست‌یافت (۴). کوئینیک اسید به‌عنوان یک ترکیب طبیعی فراوان از منابع گیاهی با فرمول شیمیایی $C_7H_{12}O_6$ می‌باشد که از پوست گیاه سینکونا، لوبیا، قهوه، برگ توتون، برگ هویج، سیب، هلو، گلابی، آلو، سبزیجات به دست می‌آید. به طور مثال در یک پرتقال متوسط ۱/۶ گرم کوئینیک اسید وجود دارد. این ترکیب یک ماده طبیعی در رژیم غذایی است که تبدیل شدن به تربیتوفان و نیکوتین آمید در بدن است (۵). با توجه به تأثیرات کوئینیک اسید از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی (۶)، ضد التهابی (۷)، هپاتوپروتکتیو (۸) و افزایش سلول‌های ایمنی (۹)، این مطالعه با هدف تعیین اثر ضد تشنجی کوئینیک اسید بر روی مدل حیوانی تشنج در موش با در نظر قرار دادن مسیر احتمالی نیتریک اکسید و استرس اکسیداتیو طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی و گروه‌بندی

کلیه مراحل کار روی موش‌ها، مطابق با مجوز کمیته اخلاق بعد از تأیید کمیته مذکور صورت گرفت. در این مطالعه سعی شد که دسترسی به آب و غذا، ریتم تاریکی و روشنایی، دمای محیط و به‌طور کلی شرایط نگهداری نمونه‌ها استاندارد باشد.

۴۸ سر موش نر در محدوده وزنی ۲۵ الی ۳۰ گرم در گروه‌های ۸ تایی تقسیم‌بندی شدند. حیوانات در شرایط دمایی مناسب ($1 \pm 22^\circ C$) و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی با دسترسی آزاد به آب و غذای یکسان نگهداری

شدند. سپس این موش‌ها به شش گروه هشت تایی تقسیم شدند.

گروه اول: موش‌هایی که نرمال سالین را با دوز ۱ میلی لیتر بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی به مدت یک هفته دریافت کردند.

گروه دوم، سوم، چهارم و پنجم موش‌هایی که کوئینیک اسید را به ترتیب با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی به مدت یک هفته دریافت کردند.

گروه ششم: موش‌هایی که دیازپام را با دوز ۱۰ میلی-گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی به مدت یک هفته دریافت کردند (۱۰).

سپس جهت القای تشنج همه گروه‌ها PTZ ۵٪ به صورت داخل ورید دمی دریافت کردند.

کلیه دوزهای این مطالعه بر اساس مطالعه پایلوت نویسندگان و مطالعه قبلی خوراسگانی و همکاران در سال ۲۰۲۱ انتخاب شد (۱۱). همه دوزهای کوئینیک اسید و دیازپام، ۶۰ دقیقه قبل از تجویز PTZ به صورت داخل صفاقی تزریق شدند.

القای تشنج

برای القای تشنج به وسیله یک نیدل ۳۰ از طریق ورید دمی موش با استفاده از پمپ انفوزیون PTZ ۵٪ و با سرعت یک میلی لیتر بر دقیقه تزریق شد و به محض دیدن کلونوس اندام قدامی تزریق متوقف شد. مدت زمان بین شروع انفوزیون و شروع مراحل تشنج بر حسب ثانیه ثبت شد و سپس به دوز تحمل تشنج (یعنی میلی گرم دارو به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) تبدیل شد. غلظت تحمل بر حسب میلی گرم بر کیلوگرم برای ظهور علائم تشنج با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Threshold concentration } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right) = \frac{\text{Rate} \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}}\right) \times \text{Time}(\text{s}) \times \text{Concentration} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) \times 1000}{60 \times \text{Body weight of animal}}$$

در پایان پس از تعیین مدت زمان بروز تشنج در گروه‌های مختلف، پس از بی‌هوشی توسط کتامین و زایلازین به ترتیب با دوز ۶۰ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم موشها کشته شدند و قسمت هیپوکمپ مغز جدا شد (۱۲).

ارزیابی‌های بیوشیمیایی

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی سرم و هیپوکمپ

۲۵۰ میکرولیتر نمونه هموزن شده هیپوکمپ یا سرم با ۱ میلی لیتر از معرف تری کلرواستیک اسید مخلوط و بعد از ورتکس به مدت ۱۵ دقیقه در یخ‌خوری قرار گرفت. سپس بعد از سرد شدن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰g سانتریفوژ شد. جذب محلول صورتی رنگ رویی در طول موج ۵۳۵ نانومتر در مقابل لوله بلانک که شامل همه معرف‌ها به غیر از نمونه بود، قرائت گردید (۱۳).

اندازه‌گیری سطح نیتريت پلاسما و هیپوکمپ

سنجش نیتريت به کمک واکنش گریس به روش میکروپلیتی انجام پذیرفت. برای پروتئین زدایی با سولفات روی، ۴۰۰ میکرولیتر نمونه هموزن شده هیپوکمپ یا سرم با ۶ میلی گرم پودر سولفات روی مخلوط گردید (۱۴). برای اندازه‌گیری غلظت نیتريت در میکروپلیت الایزا، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر سرم یا بافت پروتئین زدایی شده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط (۱) به (۱) سولفانامید و ان-۱-نفیتیل) اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید به محیط افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷°C انکوبه گردید. بعد از انجام واکنش و تشکیل رنگ، جذب نوری حاصل از تشکیل ماده رنگی در ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر الایزا قرائت گردید و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌ها محاسبه شد (۱۵).

اندازه‌گیری ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و هیپوکمپ

حدود ۵۰ درصد از کل حجم را به خود اختصاص می‌دهد. فاز رویی به آرامی برداشته شده و به میکروتیوب جدید منتقل و تقریباً هم حجم با آن ایزوپروپانول سرد اضافه و ۱ ساعت در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه انجام و مایع رویی برداشت و به پلیت سلولی الکل ۷۵ درصد اضافه شد. سپس این مرحله مجدد تکرار شد و بعد از تبخیر الکل، به پلیت فوق آب دی اتیل پیرو کر بو نات اضافه شد. جهت کنترل کمی و پی بردن به درجه خلوص و غلظت نمونه‌های RNA، جذب نوری آن‌ها در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ به کمک دستگاه نانودرآپ قرائت گردید. همچنین غلظت RNA استخراج شده از هر نمونه نیز توسط همین دستگاه بر حسب نانوگرم در میکرولیتر (ng/μl) سنجیده شد (۱۷).

با استفاده از کیت ساخت cDNA و با استناد به روش کار ارائه شده توسط کیت از نمونه‌های RNA استخراج شده، ساخت cDNA انجام پذیرفت. پروتکل سنتز cDNA در کیت برای حداکثر مقدار ۵۰۰۰ نانوگرم از RNA طراحی شده است در این مطالعه غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم از همه نمونه‌های RNA استفاده شد. برای سنتز cDNA از نمونه‌های RNA، در ابتدا نمونه را بر روی یخ ذوب کرده و هم‌زمان مواد موجود در کیت را در دمای اتاق نگه داشته تا ذوب شوند.

ساخت cDNA از روی RNA با افزودن RNA اصلی و بافر RT 5X، آنزیم ترانس کریپتاز، پرایمر Oligo dT، آب Random Hexamer، RNase Free، پرایمر dNTP، RNA interference و رساندن حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر و قراردادن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، ۶۰

اندازه‌گیری ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی هیپو کمپ و سرم بر اساس روش پتانسیل کاهندگی آهن توسط آنتی‌اکسیدان (reducing antioxidant power Ferric) که توسط F. F. Benzie و همکارانش پیشنهاد شده است انجام شد (۱۷). مراحل انجام آزمایش به شرح زیر است: مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول کار FRAP به هر یک از لوله‌های آزمایش افزوده و به مدت ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷°C انکوبه می‌شود. مقدار ۳۳ میکرولیتر از نمونه هموزن هیپو کمپ و سرم و یا استانداردهای تهیه شده به لوله‌های مذکور اضافه و سریعاً مخلوط گردید. محتویات لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۳۷°C انکوبه شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل شاهد (۱ میلی‌لیتر محلول FRAP و ۳۳ میکرولیتر آب مقطر) اندازه‌گیری شد. پس از قرائت جذب نوری محلول‌های استاندارد با غلظت‌های مختلف، منحنی استاندارد رسم و مقادیر نمونه‌های مجهول از طریق منحنی استاندارد محاسبه گردید (۱۶).

اندازه‌گیری بیان ژن‌ها

بیان ژن‌های iNOS، nNOS در بافت هیپو کمپ با روش Real-time PCR بررسی شد. به‌ازای هر ۵۰ میلی‌گرم بافت یک میلی‌لیتر از محلول ترایزول مستقیماً به بافت اضافه شد. سپس هموزن‌سازی با استفاده از دستگاه هموزنایزر انجام شد تا بافت به‌خوبی لیز شوند. نمونه به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. به‌ازای یک میلی‌لیتر از محلول ترایزول، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه به آرامی با دست تکان داده شد و سپس به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. این مرحله باعث می‌شود که مخلوط به‌صورت یک‌فاز صورتی‌رنگ فنلی در پایین و یک‌فاز میانی و یک‌فاز بی‌رنگ بالایی جدا شود. RNA نیز در فاز بی‌رنگ بالایی قرار می‌گیرد و فاز بالایی

می‌دهد که به وسیله نرم‌افزار دستگاه، دمایی که در آن افت فلورسانس رخ داده به راحتی قابل تشخیص است. از آنجایی که هر DNA دو رشته‌ای TM مخصوص به خود را دارد، در این روش به راحتی می‌توان محصول PCR اختصاصی را از محصول غیراختصاصی و پرایمر - دایمرها تمایز داد (۱۸).
توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Prism انجام شد. ابتدا بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف - اسمیرنوف صورت پذیرفت. سپس جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از آنالیز واریانس یک‌طرفه و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی استفاده گردید. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد ثبت شدند و $p < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار فرض شد.

دقیقه در دمای ۴۲ درجه سلسیوس و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس انجام شد.

پرایمرهای اختصاصی سنس و آنتی‌سنس با نرم‌افزار Vector NTI برای ژن‌های موردنظر و ژن B2M به عنوان ژنی که بیان ثابت دارد طراحی و سفارش داده شد (جدول ۱). این پرایمرهای طراحی شده قابلیت استفاده در واکنش‌های PCR کمی به روش منحنی ذوب را دارند و پس از پایان سیکل‌های تکثیر PCR، برنامه منحنی ذوب اجرا می‌شود. بدین ترتیب که دستگاه دما را تا کم‌تر از دمای اتصال پرایمرها پایین می‌آورد و سپس دما در حدود ۱ درجه سلسیوس بالا می‌رود و سیگنال فلورسانس قرائت می‌شود و این روند به طور متناوب تا دمایی حدود ۹۵ درجه سلسیوس بالا می‌رود. زمانی که دما به TM محصول PCR رسید، محصولات PCR به حالت تک‌رشته‌ای تبدیل می‌شوند و رنگ‌های SYBR Green I از بین دو رشته خارج می‌شود و افت شدید فلورسانس رخ

جدول ۱. توالی پرایمرها

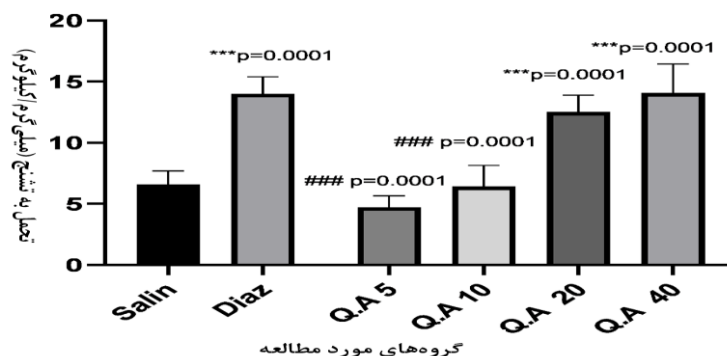
ردیف	نام ژن	توالی Forward	توالی Reverse
۱	nNOS	GGCTGTGCT TTGATGGAGATGA	AGAATAGGAGGAGACGCTGT
۲	iNOS	CCAACAGGAGAAGGGGACGAA	GGACATCAAAGGTCTCACAGGC
۳	B2M	GGAAGTTGGGCTTCCCATTCT	CGTGATCTTTCTCGTGCTTGTC

یافته‌ها

مقایسه تحمل به تشنج در گروه‌های مورد مطالعه

باتوجه به نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی آزمون توکی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد تزریق کوئینیک اسید در دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به شکل معنی‌داری در مقایسه با گروه دریافت‌کننده نرمال سالین باعث افزایش تحمل به تشنج شده است ($P < 0/001$). همچنین نتایج نشان داد گروه‌های دریافت‌کننده دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئینیک اسید تفاوت معنی‌داری با گروه PTZ نداشت ($P > 0/05$). تحمل به تشنج در موش‌های دریافت‌کننده

دiazepam به طور معنی‌داری بیشتر از گروه PTZ بود ($P < 0/001$). در مقایسه تحمل به تشنج در دوزهای مختلف کوئینیک اسید با Diazepam، غلظت تحمل به تشنج در گروه‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئینیک اسید در مقایسه با Diazepam تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$) و پاسخ در این گروه‌ها معادل پاسخ Diazepam بوده‌اند. درحالی‌که پاسخ در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئینیک اسید از پاسخ گروه دریافت‌کننده Diazepam به طور معنی‌داری کمتر بوده است (نمودار ۱). ($P < 0/001$)

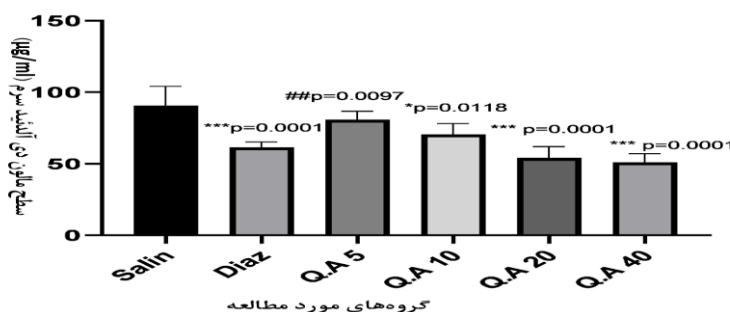


نمودار ۱. مقایسه تحمل به تشنج در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج به صورت صورت میانگین \pm خطای استاندارد ثبت شده و با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی آنالیز شده اند. ***: در مقایسه با گروه دریافت کننده نرمال سالین ($P < 0.001$). ###: در مقایسه با گروه دریافت کننده دیازپام $P < 0.001$. گروه دریافت کننده سالین، Diaz: گروه دریافت کننده دیازپام، Q.A.5,10,20,40: گروه دریافت کننده کوئینیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به ترتیب.

$P < 0.05$ ، $P < 0.001$ و $P < 0.001$. علاوه بر این، میزان کاهش مالون دی آلدئید سرم در گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۱۰، ۲۰، و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئینیک اسید در مقایسه با دیازپام، تفاوت معنی‌داری نداشت و این ویژگی کوئینیک اسید در این دوزها با دیازپام یکسان بوده است ($P > 0.05$). درحالی‌که میزان مالون دی آلدئید سرم در گروه دریافت کننده دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از دیازپام به طور معنی‌داری ($P < 0.001$) بیشتر بود (نمودار ۲).

اثر کوئینیک اسید بر میزان مالون دی آلدئید سرم در گروه‌های مورد مطالعه

بر اساس نتایج تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی، یافته‌های این مطالعه نشان داد که گروه دریافت کننده دیازپام به طور معنی‌داری سطح مالون دی آلدئید سرم کمتری نسبت به گروه دریافت کننده نرمال سالین داشتند ($P < 0.001$). همچنین جوین کوئینیک اسید با دوزهای ۱۰، ۲۰، و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معنی‌داری سبب کاهش سطح مالون دی آلدئید سرم در مقایسه با گروه نرمال سالین شد. این کاهش‌ها به ترتیب برای دوزهای ذکر شده عبارت بودند از:

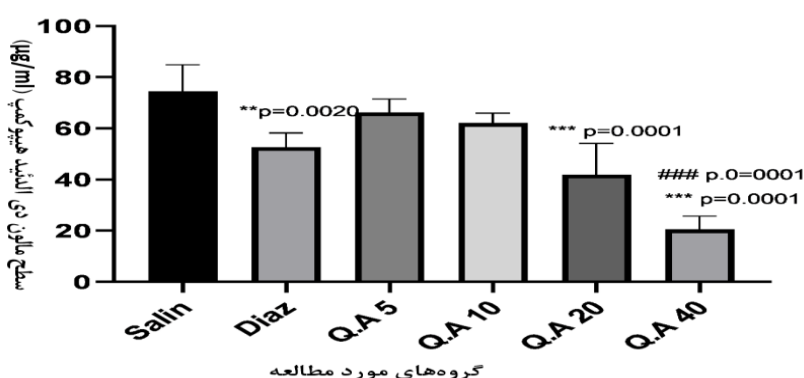


نمودار ۲: مقایسه سطح مالون دی آلدئید سرم در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج به صورت صورت میانگین \pm خطای استاندارد ثبت شده و با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی آنالیز شده اند. ***: و *: در مقایسه با گروه دریافت کننده نرمال سالین $P < 0.001$ و $P < 0.05$ ، به ترتیب. ###: در مقایسه با گروه دریافت کننده دیازپام $P < 0.001$. saline: گروه دریافت کننده نرمال سالین، Diaz: گروه دریافت کننده دیازپام، Q.A.5,10,20,40: گروه دریافت کننده کوئینیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به ترتیب

دی آلدئید هیپو کمپ را نسبت به گروه نرمال سالین کاهش داده است ($P < 0.001$). همچنین، میزان مالون دی آلدئید هیپو کمپ در گروه دریافت کننده دوز کوئینیک اسید ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم از دیازپام به طور معنی داری ($P < 0.001$) کمتر بود. در واقع این دوز کوئینیک اسید از دیازپام توانایی بیشتری در کاهش مالون دی آلدئید هیپو کمپ داشته است (نمودار ۳).

اثر کوئینیک اسید بر میزان مالون دی آلدئید هیپو کمپ در گروه‌های مورد مطالعه

نتایج تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی یافته‌های این مطالعه نشان داد که دیازپام به طور معنی داری سطح مالون دی آلدئید هیپو کمپ را در مقایسه با گروه نرمال سالین کاهش داده است ($P < 0.01$). علاوه بر این، کوئینیک اسید با دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم نیز به طور معناداری سطح مالون

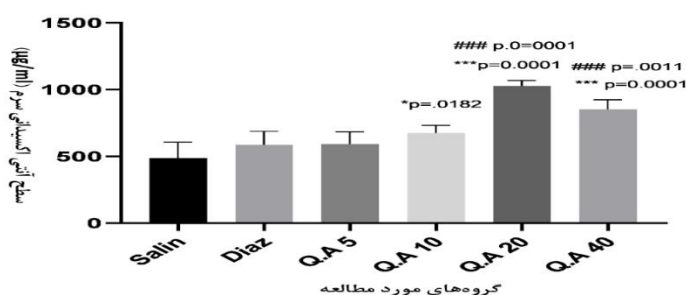


نمودار ۳. مقایسه سطح مالون دی آلدئید هیپو کمپ در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج به صورت صورت میانگین \pm خطای استاندارد ثبت شده و با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی آنالیز شده اند. *** و **: در مقایسه با گروه دریافت کننده نرمال سالین $P < 0.001$ و $P < 0.01$ به ترتیب. ###: در مقایسه با گروه دریافت کننده دیازپام $P < 0.001$. saline: گروه دریافت کننده نرمال سالین، Diaz: گروه دریافت کننده دیازپام، Q.A.5,10,20,40: گروه دریافت کننده کوئینیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم به ترتیب.

$P < 0.001$. همین طور، ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم در گروه‌های دریافت کننده کوئینیک اسید در دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم از دیازپام به طور معنی داری ($P < 0.001$) بیشتر بودند (نمودار ۴).

اثر کوئینیک اسید بر سطح آنتی اکسیدانی سرم در گروه‌های مورد مطالعه

بر اساس نتایج تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی، این مطالعه نشان داد که میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم در گروه دریافت کننده دیازپام تفاوت معنی داری با گروه نرمال سالین ندارد ($P > 0.05$). با این حال، کوئینیک اسید در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم به طور معنی داری موجب افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم در مقایسه با گروه نرمال سالین شده است به ترتیب: $P < 0.05$ ، $P < 0.001$ ،

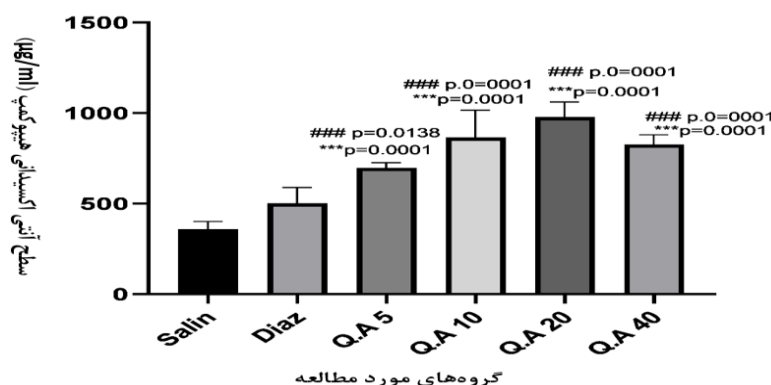


نمودار ۴. مقایسه سطح آنتی‌اکسیدانی سرم در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج به صورت صورت میانگین \pm خطای استاندارد ثبت شده و با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی آنالیز شده اند. *** و **: در مقایسه با گروه دریافت کننده نرمال سالین $P < 0.001$ و $P < 0.05$ به ترتیب. saline: گروه دریافت کننده نرمال سالین، ###: در مقایسه با گروه دریافت کننده دیازپام $P < 0.001$. saline: گروه دریافت کننده نرمال سالین Diaz: گروه دریافت کننده دیازپام، Q.A.5,10,20,40: گروه دریافت کننده کوئینیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به ترتیب.

میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست به صورت معناداری باعث افزایش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدان هیپو کمپ در مقایسه با گروه نرمال سالین گردد ($P < 0.001$). علاوه بر این، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هیپو کمپ در گروه‌های دریافت کننده کوئینیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از دیازپام به طور معنی‌داری ($P < 0.001$) بیشتر شده است (نمودار ۵).

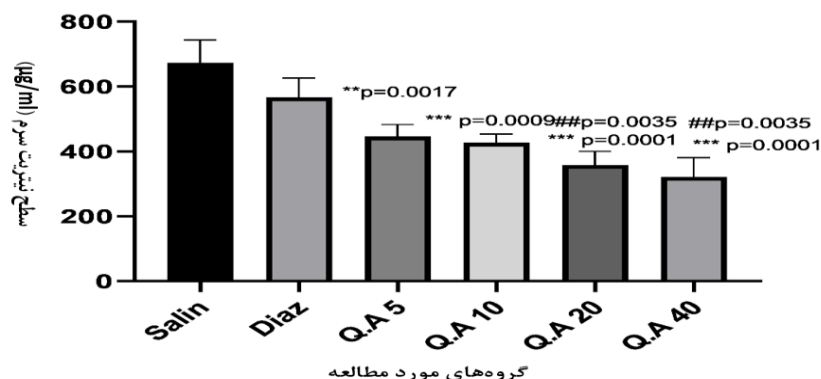
اثر کوئینیک اسید بر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هیپو کمپ در گروه‌های مورد مطالعه

میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدان هیپو کمپ در گروه‌های مورد مطالعه بعد از تحلیل و آنالیز توسط واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی آزمون توکی بیان کردند که گروه دریافت کننده دیازپام از نظر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدان هیپو کمپ تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه دریافت کننده نرمال سالین ندارد ($P > 0.05$). کوئینیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰



نمودار ۵. مقایسه سطح آنتی‌اکسیدانی هیپو کمپ در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج به صورت صورت میانگین \pm خطای استاندارد ثبت شده و با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی آنالیز شده اند. *** و **: در مقایسه با گروه دریافت کننده نرمال سالین $P < 0.001$. ###: در مقایسه با گروه دریافت کننده دیازپام $P < 0.001$. saline: گروه دریافت کننده نرمال سالین، Diaz: گروه دریافت کننده دیازپام، Q.A.5,10,20,40: گروه دریافت کننده کوئینیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به ترتیب.

کیلوگرم توانست به صورت معناداری باعث کاهش میزان نیتريت سرم در مقایسه با گروه نرمال سالین گردد، به ترتیب: $P < 0.001$ ، $P < 0.001$ و $P < 0.001$. همچنین، سطح نیتريت سرم در گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای ۴۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کوئینیک اسید در مقایسه با دیازپام به طور معنی‌داری ($P < 0.01$) کمتر بود (نمودار ۶).



نمودار ۶. مقایسه سطح نیتريت سرم در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج به صورت صورت میانگین \pm خطای استاندارد ثبت شده و با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی آنالیز شده‌اند. *** و ** در مقایسه با گروه دریافت‌کننده نرمال سالین $P < 0.001$ و $P < 0.01$ به ترتیب. ## در مقایسه با گروه دریافت‌کننده دیازپام $P < 0.01$ به ترتیب. saline: گروه دریافت‌کننده نرمال سالین، Diaz: گروه دریافت‌کننده دیازپام، Q.A.5,10,20,40: گروه دریافت‌کننده کوئینیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به ترتیب.

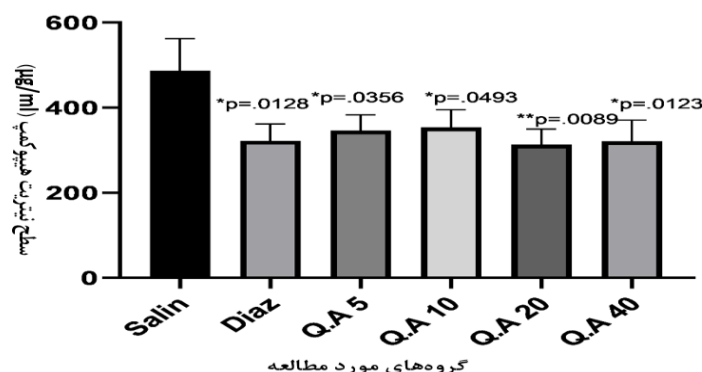
$P < 0.05$ و $P < 0.01$. علاوه بر این، سطح نیتريت هیپو کمپ در گروه دریافت‌کننده دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از دیازپام به طور معنی‌داری ($P < 0.001$) کمتر بود. درحالی‌که، میزان کاهش نیتريت هیپو کمپ توسط کوئینیک اسید در دوزهای مختلف در مقایسه با دیازپام، تفاوت معنی‌داری نداشت و این ویژگی بالقوه یکسان بوده است ($P > 0.05$) (نمودار ۷).

اثر کوئینیک اسید بر میزان نیتريت سرم در گروه‌های مورد مطالعه

نتایج میزان نیتريت سرم در گروه‌های مورد مطالعه بعد از آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی آزمون توکی نشان دادند که گروه دریافت‌کننده دیازپام از نظر میزان نیتريت سرم تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه نرمال سالین ندارد ($P > 0.05$). کوئینیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر

اثر کوئینیک اسید بر میزان نیتريت هیپو کمپ در گروه‌های مورد مطالعه

تیمار موش‌ها با کوئینیک اسید و دیازپام در این مطالعه نشان داد که دیازپام میزان نیتريت هیپو کمپ را به شکل معنی‌داری نسبت به گروه دریافت‌کننده نرمال سالین کاهش داد ($P < 0.05$). همچنین کوئینیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست به صورت معناداری باعث کاهش میزان نیتريت هیپو کمپ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده نرمال سالین گردد، به ترتیب: $P < 0.05$.

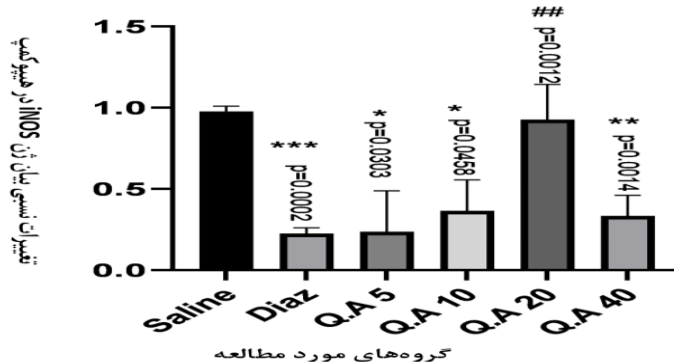


نمودار ۷. مقایسه سطح نیتريت هیپوکمپ در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج به صورت صورت میانگین \pm خطای استاندارد ثبت شده و با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی آنالیز شده اند. * و ** و ***: در مقایسه با گروه دریافت کننده نرمال سالین $P < 0.05$ و $P < 0.01$ به ترتیب. ###: در مقایسه با گروه دریافت کننده دیازپام $P < 0.001$. saline: گروه دریافت کننده نرمال سالین، Diaz: گروه دریافت کننده دیازپام، Q.A.5,10,20,40: گروه دریافت کننده کوئینیک اسید با دوزهای ۵،۱۰،۲۰،۴۰ میلی گرم/کیلوگرم به ترتیب.

میزان بیان ژن iNOS نسبت به گروه نرمال سالین کاهش پیدا کرده است، به ترتیب $(P < 0.05)$ ، $(P < 0.05)$ و $(P < 0.01)$. میزان بیان این ژن در هیپوکمپ در گروه‌های دریافت کننده کوئینیک اسید با دوز ۵،۱۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با دیازپام، تفاوت معنی داری نداشت و این پتانسیل تقریباً با دیازپام یکسان بوده است $(P < 0.05)$ (نمودار ۸).

اثر کوئینیک اسید بر میزان بیان ژن iNOS در هیپوکمپ گروه‌های مورد مطالعه

نتایج حاصل از تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی نشان می‌دهد که تجویز دیازپام به طور معناداری میزان بیان ژن iNOS را نسبت به گروه نرمال سالین کاهش داده است $(P < 0.001)$. در موش‌های دریافت کننده کوئینیک اسید با دوز ۵،۱۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم به شکل معنی داری

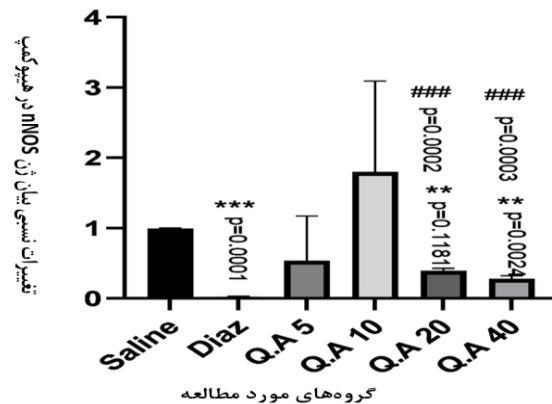


نمودار ۸. مقایسه میزان بیان ژن iNOS در هیپوکمپ گروه‌های مورد مطالعه. نتایج به صورت صورت میانگین \pm خطای استاندارد ثبت شده و با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی آنالیز شده اند. * و ** و ***: در مقایسه با گروه دریافت کننده نرمال سالین $(P < 0.05)$ ، $(P < 0.01)$ و $(P < 0.001)$ به ترتیب. ##: در مقایسه با گروه دریافت کننده دیازپام $P < 0.01$. saline: گروه دریافت کننده نرمال سالین، Diaz: گروه دریافت کننده دیازپام، Q.A.5,10,20,40: گروه دریافت کننده کوئینیک اسید با دوزهای ۵،۱۰،۲۰،۴۰ میلی گرم/کیلوگرم به ترتیب.

مقایسه میزان بیان ژن nNOS در هیپو کمپ گروه‌های مورد مطالعه

بر اساس نتایج به دست آمده از تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی، مشخص شد که بیان ژن nNOS در گروه‌های مختلف به طور معنی داری متفاوت است ($P < 0/001$). تجویز دیازپام به وضوح موجب کاهش میزان بیان ژن nNOS را نسبت به گروه نرمال سالین کاهش داد ($P < 0/001$). همچنین، در موش‌های دریافت کننده کوئینیک اسید با

دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم، کاهش معناداری در میزان بیان ژن nNOS نسبت به گروه نرمال سالین مشاهده شد ($P < 0/001$). علاوه بر این میزان بیان این ژن در هیپو کمپ در گروه‌های دریافت کننده کوئینیک اسید با دوز ۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با دیازپام، تفاوت معنی داری وجود داشت و توانایی دیازپام در کاهش این بیان ژن بیشتر بوده است ($P < 0/001$) (نمودار ۹).



نمودار ۹. مقایسه میزان بیان ژن nNOS در هیپو کمپ گروه‌های مورد مطالعه. نتایج به صورت صورت میانگین \pm خطای استاندارد ثبت شده و با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی آنالیز شده اند. * و ***: در مقایسه با گروه دریافت کننده نرمال سالین ($P < 0/001$) و ($P < 0/001$) به ترتیب. ####: در مقایسه با گروه دریافت کننده دیازپام $P < 0/001$. saline: گروه دریافت کننده نرمال سالین، Diaz: گروه دریافت کننده دیازپام، Q.A.5,10,20,40: گروه دریافت کننده کوئینیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ میلی-گرم/کیلوگرم به ترتیب.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد کوئینیک اسید احتمالاً از طریق اثرات ضد استرس اکسیداتیو و کاهش میزان فعالیت سیستم نیتروژیک باعث ایجاد اثرات ضد تشنجی در مدل موشی القای تشنج با پنتیلین تترازول گردید. صرع یکی از شایع ترین اختلالات مزمن مغز است که از تخلیه غیر طبیعی نورون‌های مغزی ناشی می شود. علل حملات تشنج متعدد بوده و

بیماری‌های گوناگون عصبی از عفونت تا تومور، ضربه مغزی و التهاب را در برمی گیرد (۱۹). به دلیل شیوع تشنج و عوارض جانبی داروهای شیمیایی موجود، محققین به دنبال استفاده از داروهای گیاهی به عنوان ترکیبات رهبر جهت شناسایی داروهای جدید برای درمان این بیماری هستند. این مطالعه باهدف بررسی اثر ضد تشنجی کوئینیک اسید در تشنج القا شده با پنتیلین تترازول در موش با بررسی نقش احتمالی مسیر

استرس اکسیداتیو و نیتریک اکسید طراحی گردید. PTZ یک بلوک کننده انتخابی کانال‌های کلراید است که با کمپلکس رسپتوری GABA-A زوج شده و یک القاکننده تشنج شیمیایی است که برای ارزیابی داروهای ضد تشنج در مدل حیوانی استفاده می‌شود. به خوبی مشخص شده است که PTZ اثرات مخربی را روی ویژگی‌های غشای نورون دارد و کانال‌های پتاسیمی و کلسیمی را تحت تأثیر قرار داده و ذخایر یون‌های کلسیمی درون سلولی را آزاد می‌کند و همچنین کنداکنانس کلری القا شده با نوروترانسمیتر را کاهش می‌دهد (۲۰). بر اساس پژوهش‌ها مشخص شده که PTZ غلظت یون کلسیم درون سلولی را افزایش می‌دهد که در این افزایش غلظت، گیرنده‌های NMDA نقش دارد. از سوی دیگر مشخص شد که افزایش کلسیم در سلول مانع از بروز اثرات مهاری ناشی از گابا می‌شود (۲۱). به همین جهت، داروهایی که سبب افزایش سطوح سیناپسی گابا از طریق مهار کاتابولیسم گابا یا افزایش بازجذب گابا می‌گردند، همانند باربیتورات‌ها و بنزودیازپین‌ها از جمله داروهای ضد تشنج مؤثر به شمار می‌روند (۲۲). دیازپام یک آگونیست گیرنده‌های بنزودیازپینی است که با اثر بر روی گیرنده‌های گابا و در نهایت ورود یون کلر به نورون‌ها اثرات آرام‌بخشی و ضد تشنجی اعمال می‌کند (۲۳). در بررسی حاضر اثرات ضد تشنجی دیازپام در موش‌های دریافت کننده PTZ تأیید کننده مؤید اثربخشی دیازپام در کنترل و کاهش شدت تشنج‌ها است با مکانیسم فوق است. نتایج دیگر مطالعه حاضر نشان داد که تیمار موش‌ها با کوئینیک اسید سبب افزایش معنی‌دار آستانه شروع تشنج در مقایسه با گروه سالین گردید که حاکی از اثرات ضد تشنجی آن است. همچنین یافته‌های مطالعه نشان می‌دهد که تزریق دیازپام به طور معناداری سطح مالون دی آلدئید سرم و هیپو کمپ را در مقایسه با گروه نرمال

سالین کاهش داده است این نتایج ممکن است به دلیل خواص اثرات محافظتی دیازپام باشد که به کاهش استرس اکسیداتیو کمک می‌کند که با یافته‌های مطالعه‌ای که توسط Güngör و همکارانش در سال ۲۰۱۰ انجام شد همخوانی دارد. در آن مطالعه، تجویز مزمن دیازپام به موش‌ها منجر به تغییرات معناداری در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش فعالیت گلو‌تاتیون پراکسیداز در تمام بافت‌ها شد (۲۴). البته در مطالعات متعدد با توجه به دوز و شرایط تزریق دیازپام در مدل‌های مختلف حیوانی بیماری‌ها پاسخ‌های متفاوتی دیده شده است (۲۶ و ۲۵) که در مطالعه حاضر هم اثرات آنتی‌اکسیدانی دیازپام در سرم و هیپو کمپ با وجود افزایش معنی‌دار نبوده است که می‌تواند به خاطر تزریق تحت حاد باشد. همین‌طور نتایج این مطالعه نشان داد که دیازپام می‌تواند باعث کاهش بیان ژن‌های iNOS و nNOS در هیپو کمپ موش‌ها شود که در مطالعه Jiménez-Velázquez و همکاران (۲۰۰۸) نیز نشان داده شد که دیازپام از طریق مسیرهای وابسته به گابا، می‌تواند بیان ژن‌های iNOS را در شرایط التهابی کاهش دهد. این اثرات به دلیل کاهش سطح کلسیم داخل سلولی و متعاقباً کاهش فعالیت آنزیم‌های سنتاز نیتریک اکساید است که منجر به کاهش تولید NO می‌شود (۲۷)، پس این مسیر هم می‌تواند در بروز اثر ضد تشنجی دیازپام هم دخیل باشد و در نتیجه، دیازپام با کاهش بیان ژن‌های iNOS و nNOS، نقش مؤثری در کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو دارد که می‌تواند به بهبود وضعیت بیماران تحت درمان با این دارو منجر شود.

مطالعه حاضر نشان داد که تزریق کوئینیک اسید در دوزهای بالاتر یعنی دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور معناداری زمان شروع تشنج را در مقایسه با گروه دریافت کننده نرمال سالین افزایش داده است. این یافته نشان می‌دهد که

التهایی را اعمال می کنند (۲۹ و ۳۰). کوئینیک اسید یک ماده طبیعی در رژیم غذایی است، که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و قادر به تبدیل شدن به تریپتوفان و نیکوتین آمید می باشد (۳۱). مطالعات نشان داده که اسید کلروژنیک موجود در قهوه سبز می تواند با مهار مرگ خود به خودی هسته سلول های عصبی، مهار قطعه قطعه شدن DNA و کاهش تولید رادیکال های آزاد، اثرات آنتی اکسیدانی خود را اعمال کند. همچنین، اسید کلروژنیک در حفاظت از سلول های عصبی در مقابل استرس اکسیداتیو نقش دارد (۳۲). مطالعه Mijangos-Ramos و همکاران نشان داده است که فعالیت های ضد التهابی و آنتی اکسیدانی تشخیص داده شده در عصاره ریشه *C. urticifolia* را می توان به مشتقات کوئینیک اسید آن نسبت داد که ممکن است به توانایی آن ها به عنوان پاک کننده های رادیکال آزاد مرتبط باشد (۳۳). در مطالعه ای که توسط Soh و همکاران انجام شد، نشان داده شد که اسیدهای کوئینیک می توانند اثرات محافظتی بالقوه ای بر سمیت سلولی ناشی از THP بر سلول های گلیوم C6 موش داشته باشد و در مجموع نشان دادند که کوئینیک اسید ممکن است یک عامل بالقوه برای درمان یا پیش گیری از بیماری های همراه با استرس اکسیداتیو باشد (۳۴).

بنابراین این احتمال وجود دارد که اثرات مثبت این ترکیب در افزایش مدت زمان شروع تشنج به علت پتانسیل محافظت از سلول های عصبی در مقابل رادیکال های آزاد تولید شده در شرایط تشنج باشد.

علاوه بر این، طبق مطالعات قبل نیز گزارش شده است که در بیماران مبتلا به صرع در مقایسه با افراد سالم سطح مالون دی آلدئید سرم (یکی از نشانگرهای پراکسیداسیون لیپیدها و استرس اکسیداتیو) نیز کاهش پیدا می کند (۳۵ و ۳۶) که سطح مالون دی آلدئید در گروه دریافت کننده نرمال سالین و PTZ

دوزهای بالاتر کوئینیک اسید می تواند اثرات بیشتری بر روی تأخیر در شروع تشنج داشته باشند. همچنین، گروه های دریافت کننده دوز ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم کوئینیک اسید به علت کافی نبودن، فراهم نکردن دوز مؤثر به علت تزریق کوتاه مدت یا تحت حاد، شاید اثرات کمتری بر روی تشنج داشته باشند. با مروری بر منابع مطالعه ای که به ارزیابی اثرات ضد تشنجی کوئینیک اسید پرداخته باشد، یافت نشد.

نتایج حاصل از این مطالعه در گروه دریافت کننده نرمال سالین و PTZ، افزایش مالون دی آلدئید و کاهش سطح آنتی اکسیدانی تأیید کننده برهم خوردن دفاع آنتی اکسیدانی بدن در شرایط این بیماری مانند مطالعات قبل نشان می دهد. در واقع زمانی که دفاع آنتی اکسیدانی بدن برای مقابله با رادیکال های آزاد کافی نباشد، استرس اکسیداتیو پدید می آید. رادیکال های آزاد افزایش یافته در استرس اکسیداتیو از راه های مختلف باعث آسیب سیستم عصبی می شوند و عوارضی مثل دیابت و افسردگی و پارکینسون و تشنج را ایجاد می کنند (۲۸). بررسی میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی هیپوکمپ در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که ظرفیت آنتی اکسیدانی هیپوکمپ در گروه های دریافت کننده کوئینیک اسید در همه دوزها نسبت به گروه نرمال سالین افزایش معنی داری داشت. همچنین بررسی میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم در گروه های دریافت کننده کوئینیک اسید نسبت به گروه نرمال سالین افزایش معنی داری داشت. این نتایج نشان دهنده اثرات مثبت کوئینیک اسید بر تقویت دفاع آنتی اکسیدانی در هیپوکمپ و سرم می باشد. در همین راستا مطالعات نشان داده که آنتی اکسیدان ها جایگاه ویژه ای در درمان صرع دارند. برخی از ترکیبات گیاهی با کاهش استرس اکسیداتیو و جلوگیری از تولید گونه های فعال اکسیژن، عملکرد ضد

هم تاییدی بر بروز این شرایط در تشنج می باشد. مطالعه‌ای که توسط Uranga و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد، خواص آنتی‌اکسیدانی کوئینیک اسید و ارتباط آن با ساختار شیمیایی آن را مورد بررسی قرار داد. این مطالعه نشان داد که کوئینیک اسید دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی است که ناشی از توانایی آن در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و شرکت در واکنش‌های ردوکس می‌باشد (۳۷). این نتایج با یافته‌های ما که نشان‌دهنده کاهش سطح مالون دی‌آلدئید در موش‌های دریافت‌کننده کوئینیک اسید است، همخوانی دارد. به این ترتیب، می‌توان نتیجه گرفت که کوئینیک اسید با استفاده از گروه‌های هیدروکسیل و ساختار الکترونی پایدار خود، نقش مهمی در کاهش استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدها دارد و از این طریق ماده‌ای مؤثر در درمان اختلالاتی همچون تشنج محسوب گردد.

از آنجایی نیتریک اکسید باعث تشدید اثرات تشنجی می‌شود و در این راستا نشان‌دهنده شده است که مهار نیتریک اکسید سنتاز باعث ایجاد اثر ضد تشنجی و تقویت اثر داروهای ضد تشنج می‌شود (۳۸). در مطالعه حاضر مشاهده شد که تیمار موش‌های دریافت‌کننده PTZ با کوئینیک اسید سبب کاهش معنی‌داری نیتريت سرم و بافت هیپوکمپ شد. این نتایج نشان‌دهنده اثرات کوئینیک اسید در کاهش استرس نیترواتیو و محافظت از سلول‌های عصبی در شرایط تشنج می‌باشد.

مطالعه حاضر نشان داد که کوئینیک اسید می‌تواند به طور معناداری بیان ژن‌های iNOS و nNOS را در هیپوکمپ موش‌ها کاهش دهد. این یافته‌ها حاکی از آن است که این ترکیب، اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارد. در واقع این نتایج نشان می‌دهد که کوئینیک اسید می‌تواند به‌عنوان یک عامل ضدالتهابی مؤثر در کاهش استرس نیترواتیو و تنظیم فعالیت نیتریک اکسید عمل کند. مطالعات

پیشین نیز به توانایی کوئینیک اسید در کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب اشاره کرده‌اند که این موضوع با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۳۷). در همین راستا، مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که ترکیبات با خواص آنتی‌اکسیدانی مانند کوئینیک اسید می‌توانند به طور مؤثری بیان ژن‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو را تنظیم کنند

در مجموع، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که کوئینیک اسید با کاهش بیان ژن‌های iNOS و nNOS و افزایش مدت‌زمان شروع تشنج می‌تواند به‌عنوان یک عامل درمانی بالقوه برای کاهش التهاب، استرس اکسیداتیو و کنترل تشنج مورد استفاده قرار گیرد. این نتایج نه تنها بر خواص آنتی‌اکسیدانی کوئینیک اسید تأکید دارند، بلکه نقش مهم آن در کاهش التهاب‌های عصبی و بهبود وضعیت تشنج را نیز نشان می‌دهند. این یافته‌ها با نتایج مطالعه Park و همکارانش در سال ۲۰۲۴ نیز همخوانی دارد و تأثیر مثبت کوئینیک اسید به‌عنوان کاهش‌دهنده التهاب عصبی در کاهش نئواینفلامیشن و فعال‌سازی MAPK را تأیید می‌کند (۳۹).

مقایسه اثرات ضد تشنجی کوئینیک اسید در دوزهای مختلف با دیازپام نتایج مهمی را در مورد کارایی نسبی آن‌ها نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که کوئینیک اسید در دوزهای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور قابل توجهی آستانه تشنج را افزایش می‌دهد و این اثر مشابه دیازپام است. این نشان می‌دهد که دوزهای بالاتر کوئینیک اسید می‌تواند جایگزینی برای دیازپام در مدیریت تشنج باشد. دوزهای پایین‌تر (۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اثر قابل توجهی نداشتند که نشان‌دهنده وابستگی اثرات به دوز مصرفی است. همچنین، کوئینیک اسید به طور قابل توجهی نشانگرهای استرس اکسیداتیو (سطح نیتريت و سطح مالون دی‌آلدئید) را کاهش داده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هیپوکمپ را افزایش می‌دهد که مشابه

منجر به افزایش زمان تأخیر در شروع حملات تشنج شود و احتمالاً با کاهش میزان نیتريت و مالون دی آلدئید در بافت هیپو کمپ و سرم و افزایش آنتی اکسیدان در مغز و سرم و همچنین کاهش بیان iNos و nNos اثرات ضد تشنجی خود را اعمال می کند. در واقع، کوئینیک اسید، به ویژه در دوزهای بالاتر، به عنوان یک داروی ضد تشنج مؤثر با کارایی مشابه دپازپام ظاهر گردید که ویژگی آنتی اکسیدانی اضافی آن پتانسیل درمانی آن را بیشتر می کند و آن را به یک کاندید ارزشمند برای تحقیقات و توسعه بیشتر در درمان صرع تبدیل می کند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد با شماره گرنت ۳۲۵۲ قدردانی می گردد. کلیه مراحل کار روی حیوانات، مطابق با مجوز کمیته اخلاق با کد اخلاق IR.SKUMS.1398.206 صورت گرفته است. لازم به ذکر است که هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاهها تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

دپازپام است. این نشان می دهد که کوئینیک اسید هم در افزایش آستانه تشنج و هم در کاهش استرس اکسیداتیو و کاهش بیان ژن های iNOS و nNOS مؤثر است، و به خصوص برای بیمارانی که به داروهای سنتی مقاوم هستند، مفید است.

مطالعات سم شناسی نشان داد که کوئینیک اسید دارای پروفایل ایمنی مناسبی است و در دوزهای معمول سمی نیست. LD50 آن بیش از ۲۰۰۰-۵۰۰۰ mg/kg در موش های آزمایشگاهی به روش خوراکی است که نشان دهنده سمیت کم آن است و تاکنون عوارض جانبی خاصی از آن نیز گزارش نشده است (۴۰). با توجه به نتایج این مطالعه و پروفایل ایمنی کوئینیک اسید، می توان نتیجه گرفت که این ترکیب به عنوان یک گزینه درمانی مؤثر و ایمن برای کاهش نشانه های تشنج مطرح است. باین حال، برای تأیید نهایی اثربخشی و ایمنی آن در انسان، نیاز به مطالعات بیشتر و گسترده تر در آینده است.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب کوئینیک اسید دارای اثرات ضد تشنجی است که به صورت وابسته به دوز می تواند

منابع

1. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon C-S, Dykeman J, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurol*. 2017;88(3):296-303.
2. Jankovic J, Mazziotta JC, Pomeroy SL. *Bradley's Neurology in Clinical Practice E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2021.
3. O'Gallagher K, Puledda F, O'Daly O, Ryan M, Dancy L, Chowienczyk PJ, et al. Neuronal nitric oxide synthase regulates regional brain perfusion in healthy humans. *Cardiovasc Res*. 2022;118(5):1321-9.
4. Liu WJ. *Traditional herbal medicine research methods: identification, analysis, bioassay, and pharmaceutical and clinical studies*: John Wiley & Sons; 2011.
5. Benali T, Bakrim S, Ghchime R, Benkhaira N, El Omari N, Balahbib A, et al. Pharmacological insights into the multifaceted biological properties of quinic acid. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2022:1-30.

6. Ercan L, Dođru M. Antioxidant and antimicrobial capacity of quinic acid. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*. 2022;11(4):1018-25.
7. Jang S-A, Park DW, Kwon JE, Song HS, Park B, Jeon H, et al. Quinic acid inhibits vascular inflammation in TNF- α -stimulated vascular smooth muscle cells. *Biomed Pharmacother*. 2017;96:563-71.
8. Xiang T, Xiong Q-B, Ketut AI, Tezuka Y, Nagaoka T, Wu L-J, et al. Studies on the hepatocyte protective activity and the structure-activity relationships of quinic acid and caffeic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera bournei*. *Planta Med*. 2001;67(04):322-5.
9. Lin H, Wu Y, Chen J, Huang S, Wang Y. (-)-4-O-(4-O- β -D-glucopyranosylcaffeoyl) Quinic Acid Inhibits the Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells to Enhance the Efficacy of Anti-PD1 against Colon Cancer. *Pharm Res*. 2018;35:1-9.
10. Amini-Khoei H, Nasiri Boroujeni S, Lorigooini Z, Salehi A, Sadeghian R, Rahimi-Madiseh M. Implication of nitrergic system in the anticonvulsant effects of ferulic acid in pentylenetetrazole-induced seizures in male mice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2023;34(2):197-203.
11. Khorasgani AT, Amini-Khoei H, Shadkhast M, Salimian S, Majidian M, Dehkordi SH. Quinic acid through mitigation of oxidative stress in the hippocampus exerts analgesic effect in male mice. *Future Nat Prod*. 2021;7(2):1-11.
12. Tavakoli Z, Dehkordi HT, Lorigooini Z, Rahimi-Madiseh M, Korani MS, Amini-Khoei H. Anticonvulsant effect of quercetin in pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures in male mice: The role of anti-neuroinflammatory and anti-oxidative stress. *Int Immunopharmacol*. 2023;116:109772.
13. Lorigooini Z, Sadeghi Dehsahraei K, Bijad E, Habibian Dehkordi S, Amini-Khoei H. Trigonelline through the attenuation of oxidative stress exerts antidepressant-and anxiolytic-like effects in a mouse model of maternal separation stress. *Pharm*. 2020;105(5-6):289-99.
14. Nabavizadeh F, Moloudi RE, Dehpour AR, Nahrevanian H, Shahveysi K, Salimi E. The effects of cholestasis and cirrhosis on gastric acid and pepsin secretions in rat: Involvement of nitric oxide. *Iran J Basic Med Sci*. 2010;13(4(47)):207-212.
15. Lorigooini Z, Boroujeni SN, Sayyadi-Shahraki M, Rahimi-Madiseh M, Bijad E, Amini-Khoei H. Limonene through attenuation of neuroinflammation and nitrite level exerts antidepressant-like effect on mouse model of maternal separation stress. *Behav Neurol*. 2021; 2021(1):8817309.
16. Benzie IF, Devaki M. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. *Measurement of antioxidant activity & capacity: Recent trends and applications*. 2018:77-106.
17. Ahmadi A, Vahabzadeh Z, Moloudi M, Farhadi L, Shirahmadi S. Contribution of toll-like receptor 2 and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase to the trimethylamine N-oxide-induced inflammatory reactions in U937-derived macrophages. *ARYA atheroscler*. 2021;17(4):1.
18. Gałecki P, Gałecka E, Maes M, Chamielec M, Orzechowska A, Bobińska K, et al. The expression of genes encoding for COX-2, MPO, iNOS, and sPLA2-IIA in patients with recurrent depressive disorder. *J Affect Disord*. 2012;138(3):360-6.
19. Anwar H, Khan QU, Nadeem N, Pervaiz I, Ali M, Cheema FF. Epileptic seizures. *Discoveries*. 2020;8(2).

20. AKYÜZ E. A New View of The Racine Scoring System in The Pentylentetrazol Epilepsy Model. *Harran Univ Tip Fak Derg.* 2020;17(2):306-10.
21. Chen T-S, Huang T-H, Lai M-C, Huang C-W. The Role of Glutamate Receptors in Epilepsy. *Biomed.* 2023;11(3):783.
22. Sarlo GL, Holton KF. Brain concentrations of glutamate and GABA in human epilepsy: A review. *Seizure.* 2021;91:213-27.
23. Saberi F, Saberi M, Boojar MMA. The antiepileptic activity of Safranal in kindling model of epilepsy in male rats. *Braz J Pharm Sci.* 2022; 58:e20066.
24. Güngör Ö, Özdemir N. Analysis of oxidative stress parameters depend on diazepam application in rat serum and tissue samples. *Chem Sci Trans.* 2014;3(1):389-95.
25. Musavi S, Kakkar P. Pro and antioxidant responses to repeated administration of diazepam in rat brain. *Mol Cell Biochem.* 2000;206:97-103.
26. Musavi S, Kakkar P. Diazepam induced early oxidative changes at the subcellular level in rat brain. *Mol Cell Biochem.* 1998;178:41-6.
27. Jiménez-Velázquez G, López-Muñoz FJ, Fernández-Guasti A. Participation of the GABA/benzodiazepine receptor and the NO-cyclicGMP pathway in the “antinociceptive-like effects” of diazepam. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008;91(1):128-33.
28. Aguiar CCT, Almeida AB, Araújo PVP, Abreu RNDCd, Chaves EMC, Vale OCd, et al. Oxidative stress and epilepsy: literature review. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012.
29. Rubió L, Motilva M-J, Romero M-P. Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(9):943-53.
30. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci.* 2016;8:33-42.
31. Herrmann KM. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell.* 1995;7(7):907.
32. Wang X, Fan X, Yuan S, Jiao W, Liu B, Cao J, et al. Chlorogenic acid protects against aluminium-induced cytotoxicity through chelation and antioxidant actions in primary hippocampal neuronal cells. *Food Funct.* 2017;8(8):2924-34.
33. Mijangos-Ramos IF, Zapata-Estrella HE, Ruiz-Vargas JA, Escalante-Erosa F, Gómez-Ojeda N, García-Sosa K, et al. Bioactive dicaffeoylquinic acid derivatives from the root extract of *Calea urticifolia*. *Rev Bras Farmacogn.* 2018;28:339-43.
34. Soh Y, Kim J-A, Sohn NW, Lee KR, Kim SY. Protective effects of quinic acid derivatives on tetrahydropapaveroline-induced cell death in C6 glioma cells. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(6):803-7.
35. Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011;35(3):676-92.
36. Sudha K, Rao AV, Rao A. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clin Chim Acta.* 2001;303(1-2):19-24.

37. Uranga JG, Podio NS, Wunderlin DA, Santiago AN. Theoretical and Experimental Study of the Antioxidant Behaviors of 5-O-Caffeoylquinic, Quinic and Caffeic Acids Based on Electronic and Structural Properties. *ChemistrySelect*. 2016;1(13):4113-20.
38. d'Alessio PA, Bisson J-F, Béné MC. Anti-stress effects of d-limonene and its metabolite perillyl alcohol. *Rejuvenation Res*. 2014;17(2):145-9.
39. Park Y, Paing YMM, Cho N, Kim C, Yoo J, Choi JW, et al. Quinic Acid Alleviates Behavior Impairment by Reducing Neuroinflammation and MAPK Activation in LPS-Treated Mice. *Biomol Ther (Seoul)*. 2024;32(3):309-18.
40. Inbathamizh L, Padmini E. Quinic acid as a potent drug candidate for prostate cancer—a comparative pharmacokinetic approach. *Asian J Pharm Clin Res*. 2013;6(4):106-12.