

Research Paper:

Anticonvulsive and Antioxidant Effects of Pioglitazone on Pentylentetrazole-induced Seizures in Rats



Yasaman Ghiasi<sup>1</sup>, Saba Rostamian<sup>1</sup>, Ehsan Aali<sup>2</sup>, \*Yazdan Naderi<sup>2</sup>

1. Student Research Committee, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.  
2. Department of Pharmacology, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.



**Citation** Ghiasi Y, Rostamian S, Aali E, Naderi Y. Anticonvulsive and Antioxidant Effects of Pioglitazone on Pentylentetrazole-Induced Seizures in Rats. Journal of Inflammatory Diseases. 2020; 24(4):320-331. <https://doi.org/10.32598/JQUMS.24.4.6>

**doi** <https://doi.org/10.32598/JQUMS.24.4.6>



Received: 10 Aug 2020  
Accepted: 30 Sep 2020  
Available Online: 01 Oct 2020

**Keywords:**

Seizure, Pioglitazone, Pentylentetrazole, Antioxidant, Anticonvulsant

**ABSTRACT**

**Background** Epilepsy is a neurologic dysfunction caused by abnormal electrical activity in the brain. Oxidative stress is involved in the seizure-induced brain damage.

**Objective** This study aimed to evaluate the anticonvulsant and antioxidant effects of pioglitazone (a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist used for treatment of type 2 diabetes) on Pentylentetrazole (PTZ)-induced seizure in rats.

**Methods** In this experimental study, 28 rats weighing 20-30 g were divided into four groups of control, pioglitazone, PTZ, and treatment. For treatment, PTZ (85 mg/kg) or normal saline was injected intraperitoneally and 4 hours later, pioglitazone (80 mg/kg) was administered orally. Carboxymethylcellulose was administered orally in the control and PTZ groups, instead of pioglitazone. One hour after PTZ injection, seizure severity was assessed using Racine scale. Then, the rats were decapitated and the Malondialdehyde (MDA) level and the activity of Catalase (CAT) and Superoxide Dismutase (SOD) in their hippocampus samples were measured by standard methods.

**Findings** Pioglitazone administration significantly increased the latency to the onset of seizure stages 1-4 and prevented the stage 5. It significantly reduced the lipid peroxidation caused by PTZ-induced seizure and increased the activity of CAT and SOD enzymes in the hippocampus of rats.

**Conclusion** Antioxidant effects of pioglitazone may play a role in preventing stable PTZ-induced seizures and protecting neurons from seizure-caused damage.

**Extended Abstract**

**1. Introduction**

Epilepsy is a chronic neurological disorder in the brain characterized by recurrent seizures [1]. The severity of these attacks varies from mild episodes involving involuntary movements of a part of the body, to general seizures involving all parts of the body [1, 2]. In de-

veloped countries, the prevalence of the disease is 40-70 per 100,000 people, while in developing countries the rate is 100-190 per 100,000 people [3]. More than 60% of people with epilepsy need treatment with anticonvulsant drugs [4]. Various studies have shown that seizures cause neuronal damage and complications through the production of free radicals and oxidative stress [10, 11]. Therefore, treatment with antioxidant drugs may reduce seizure damage in the brain [12]. One of the models of seizures in rodents is the

\* **Corresponding Author:**

Yazdan Naderi

Address: Department of Pharmacology, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

Tel: +98 (28) 3333 6001

E-mail: y.naderi@qums.ac.ir

administration of high dose of Pentylentetrazole (PTZ) [13]. PTZ damages GABAergic interneurons in the hippocampus by causing oxidative stress, resulting in the induction of stable seizures [14]. Pioglitazone is a PPAR- $\gamma$  nuclear receptor agonist used for treatment of type 2 diabetes [15]. Various studies have shown that pioglitazone has antioxidant effects [16]. Due to the role of oxidative stress in neuronal damage caused by seizures, in this study we aim to investigate the antioxidant and anticonvulsant effects of pioglitazone in a rat model of seizure induced by PTZ.

## 2. Materials and Methods

In this study, 28 adult male rats were divided into 4 groups of 7; control, pioglitazone, PTZ, and treatment. For treatment, pioglitazone (80 mg/kg) was administered orally and, 4 hours later, normal saline or PTZ (85 mg/kg) was injected intraperitoneally. Carboxymethylcellulose (0.5%) was used instead of pioglitazone in control and PTZ groups. Within one hour after PTZ injection, the latency time to the onset of different stages of seizures (according to Racine's criteria) was measured. Racine stages include: Stage 0=no seizures, stage 1= mouth and facial movement, stage 2=rhythmic head nodding, stage 3=forelimb clonus, stage 4=rearing with forelimb clonus, and stage 5=rearing and falling with forelimb clonus. Rats were then anesthetized and their brains were extracted. Next, the Malondialdehyde (MDA) level and the activity of catalase and superoxide dismutase enzymes in hippocampal samples were measured. Results were expressed based on Mean $\pm$ SEM. Student t-test was used to compare the latency time to the onset of different stages of seizures. In order to investigate the difference between the mean MDA and the activity of antioxidant enzymes in the study groups, Tukeys' post hoc test and one-way ANOVA were used, considering  $P<0.05$  as the significance level.

## 3. Results

The results showed that oral administration of 80 mg/kg pioglitazone or its vehicle (control group) did not induce seizures in rats; however, oral administration of 80 mg/kg pioglitazone 4 hours before intraperitoneal administration of 85 mg/kg PTZ increased the latency time to the onset of seizures stages 1 to 4 of and prevented the stage 5 (Table 1). Measurement of MDA level in hippocampal samples showed that PTZ-induced seizures significantly increased lipid peroxidation in the hippocampus of rats ( $P<0.001$ ). Moreover, oral administration of 80 mg/kg pioglitazone 4 hours before 85 mg/kg PTZ administration significantly reduced MDA in hippocampus samples ( $P<0.05$ ). PTZ-induced seizures significantly reduced the activity of catalase and superoxide dismutase in the hippocampus samples compared to the control group ( $P<0.001$ ). However, oral administration of pioglitazone 4 hours before intraperitoneal administration of PTZ significantly increased the activity of superoxide dismutase and catalase enzymes ( $P<0.05$ ).

## 4. Conclusion

Pioglitazone administration increases the PTZ-induced seizure threshold and reduces the PTZ-induced oxidative stress in the hippocampus of rats. Therefore, pioglitazone may have antioxidant effects against PTZ-induced seizures.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Research Ethics Committee of Qazvin University of Medical Sciences (Code: IR.QUMS.REC.1398.004).

**Table 1.** Effect of pioglitazone on the latency time (seconds) to the onset of different stages of PTZ-induced seizures

Group	Mean $\pm$ SEM				
	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Stage 5
Control	-	-	-	-	-
Pioglitazone (80 mg/kg)	-	-	-	-	-
PTZ (85 mg/kg)	58.44 $\pm$ 7	90.4 $\pm$ 2.69	104.82 $\pm$ 5	203.7 $\pm$ 6.23	216.4 $\pm$ 6.234
Treatment #	91.3 $\pm$ 2.73**	111.4 $\pm$ 8.24 **	165.54 $\pm$ 17*	269.27 $\pm$ 8.88***	-

#PTZ (85 mg/kg) + Pioglitazone (80 mg/kg); \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$  compared to PTZ group.

### **Funding**

This research received financial support from the Student Research Committee of Qazvin University of Medical Sciences.

### **Authors' contributions**

All authors equally contributed to preparing this article.

### **Conflicts of interest**

The authors declared no conflict of interest.

# اثرات ضد تشنج و آنتی اکسیدان پیوگلیتازون در برابر تشنج ناشی از پنتیلین تترازول در موش سوری

یاسمن قیاسی<sup>۱</sup>، صبا رستمیان<sup>۱</sup>، احسان عالی<sup>۲</sup>، یزدان نادری<sup>۳</sup>

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

۲. گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

## چکیده

تاریخ دریافت: ۲۰ مرداد ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: ۰۹ مهر ۱۳۹۹

تاریخ انتشار: ۱۱ مهر ۱۳۹۹

**زمینه:** تشنج یک اختلال عملکرد مغزی ناشی از تخلیه الکتریکی غیرطبیعی نورون‌هاست که به صورت فعالیت الکتریکی پاتولوژیک در مغز بروز می‌کند. استرس اکسیداتیو در آسیب ناشی از تشنج در نورون‌های مغز نقش دارد.

**هدف:** در این مطالعه اثرات ضد تشنج و آنتی اکسیدانت پیوگلیتازون، یک داروی مورد استفاده در دیابت نوع ۲، در برابر تشنج ناشی از پنتیلین تترازول در موش سوری مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی ۲۸ موش سوری نر بالغ با وزن بین ۲۰ تا ۳۰ گرم مورد مطالعه قرار گرفتند. موش‌ها به چهار گروه کنترل، پیوگلیتازون، پنتیلین تترازول و درمان تقسیم شدند. پیوگلیتازون (۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت خوراکی تجویز شد و چهار ساعت پس از آن نرمال سالیین یا پنتیلین تترازول (۸۵ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در گروه‌های کنترل و پنتیلین تترازول به جای پیوگلیتازون از کربوکسی متیل سلولز استفاده شد. در بازه زمانی یک ساعت بعد از تزریق پنتیلین تترازول شدت تشنج با استفاده از معیار راسین مورد سنجش قرار گرفت. سپس موش‌ها کشته شدند و میزان مالون دی‌آلدهید و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در نمونه‌های هیپوکامپ اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** پیوگلیتازون باعث افزایش مدت زمان لازم برای شروع مراحل یک تا چهار تشنج و پیشگیری از مرحله پنج تشنج بر اساس معیار راسین شد. این دارو باعث کاهش میزان لیپید پراکسیداسیون ناشی از تشنج ایجاد شده توسط پنتیلین تترازول و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در هیپوکامپ شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد اثرات آنتی اکسیدانت پیوگلیتازون احتمالاً در پیشگیری از تشنج پایدار ناشی از پنتیلین تترازول و محافظت از نورون‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از تشنج نقش دارد.

## کلیدواژه‌ها:

تشنج، پیوگلیتازون، پنتیلین تترازول، آنتی اکسیدانت

## مقدمه

سرع<sup>۱</sup> یک اختلال عصبی مزمن در مغز است که به صورت حملات تشنجی عودکننده مشخص می‌شود [۱]. شدت این حملات از تشنج‌های خفیف که به صورت حرکات غیرارادی، یک قسمت محدود از بدن را دربر می‌گیرند تا تشنج‌های عمومی که تمام قسمت‌های بدن را دربر می‌گیرند متغیر است [۲، ۱]. در کشورهای توسعه‌یافته دامنه شیوع بیماری چهل تا هفتاد نفر در هر صد هزار نفر و در کشورهای در حال توسعه این میزان ۱۰۰-۱۹۰ نفر در هر صد هزار نفر است [۳]. بیش از ۶۰ درصد افراد مبتلا به سرع نیاز به درمان با داروهای ضد تشنج دارند [۴]. مصرف داروهای ضد سرع در بیماران با برخی عوارض جانبی از

قبیل خواب آلودگی، عدم تعادل و اختلالات شناختی همراه است [۵، ۶]. علی‌رغم درمان‌های موجود ۳۰ درصد بیماران همچنان از حملات سرعی رنج می‌برند [۷]. بنابراین ضرورت استفاده از داروهای ضد سرع جدید با عوارض کمتر و اثربخشی بالاتر احساس می‌شود [۶-۴]. تشنج<sup>۲</sup> تخلیه الکتریکی غیرطبیعی در نورون‌هاست که به صورت فعالیت الکتریکی پاتولوژیک<sup>۳</sup> در مغز بروز می‌کند و چهارمین اختلال عصبی شایع بعد از میگرن، سکته مغزی و آلزایمر<sup>۴</sup> است [۸، ۹].

مطالعات مختلف نشان داده است که تشنج از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد استرس اکسیداتیو باعث آسیب به

1. Epilepsy

2. Seizure  
3. Pathologic  
4. Alzheimer

## \* نویسنده مسئول:

یزدان نادری

نشانی: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی.

تلفن: ۶۰۰۱ ۳۳۳۳ (۲۸) ۰۹۸

رایانامه: y.naderi@qumsa.ac.ir

تترازول: ۰/۵ درصد CMC به صورت خوراکی به موش‌ها داده و چهار ساعت پس از آن PTZ (۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه درمان: پیوگلیتازون (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت خوراکی به موش‌ها داده و چهار ساعت پس از آن PTZ (۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

در بازه زمانی یک ساعت بعد از تزریق PTZ شدت تشنج با استفاده از معیار راسین<sup>۱۱</sup> مورد سنجش قرار گرفت و مدت زمان لازم برای شروع هریک از این مراحل (ثانیه) در گروه‌های مختلف اندازه‌گیری شد [۱۷]: مرحله صفر: هیچ تشنجی مشاهده نشد. مرحله یک: حرکات ریتمیک صورت و دهان، مرحله دو: تکان دادن ریتمیک سر، مرحله سه: کلونوس<sup>۱۲</sup> اندام جلویی، مرحله چهار: بلند شدن روی پا و کلونوس دوطرفه اندام جلویی و مرحله پنج: تشنج تونیک - کلونیک ژنرالیزه<sup>۱۳</sup> و افتادن. بعد از ارزیابی شدت تشنج، موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سر موش‌ها با استفاده از گیوتین قطع، مغز حیوان از جمجمه خارج شد و از وسط در سطح ساژیتال<sup>۱۴</sup> برش داده شد و سپس هیپوکامپ از بقیه قسمت‌های مغز جدا شد. نمونه‌ها در یخچال و در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بلافاصله قبل از انجام آزمایش نمونه‌های بافتی هیپوکامپ از یخچال خارج شدند و پس از رسیدن به دمای محیط در محلول پتاسیم کلرید ۱/۵ درصد هموژنیزه شدند و مخلوط ۱۰ درصد ایجاد شد.

برای اندازه‌گیری میزان لیپید پراکسیداسیون<sup>۱۵</sup> در بافت هیپوکامپ ۰/۵ میلی‌لیتر از مخلوط هموزن هیپوکامپ به لوله سانتریفیوژ منتقل شد و ۳ میلی‌لیتر محلول اسید فسفریک ۱ درصد و ۱ میلی‌لیتر محلول آبی تیوباربیتوریک اسید<sup>۱۶</sup> ۶ درصد به آن اضافه شد. سپس به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت و بعد از سرد شدن، ۴ میلی‌لیتر پ-نتانول<sup>۱۷</sup> به آن اضافه و به شدت هم زده شد. سپس با دور بیست هزار به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و میزان جذب لایه رنگی حاوی بوتانول در طول موج ۵۳۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و ۱، ۱، ۱، ۳، ۳- تترامتوکسی پروپان<sup>۱۸</sup> نیز به عنوان استاندارد استفاده شد [۱۸].

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز<sup>۱۹</sup> بر اساس میزان تجزیه شدن آب اکسیژنه و با استفاده از ضریب خاموشی ۴۳/۶ میلی‌مولار تعیین شد. بافر استخراج، حاوی بافر فسفات بافر سالین ۵۰ میلی‌مولار،

نورون‌ها و عوارض ناشی از تشنج می‌شود [۱۱، ۱۰]. بنابراین درمان با داروهای آنتی‌اکسیدانت ممکن است باعث کاهش آسیب ناشی از تشنج در مغز شود [۱۲]. یکی از مدل‌های ایجاد تشنج در جوندگان تجویز دز بالای پنتیلن تترازول<sup>۵</sup> است [۱۳]. پنتیلن تترازول از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو باعث آسیب به اینترنورون‌های گابارژیک<sup>۶</sup> در ناحیه هیپوکامپ و در نتیجه القای تشنج پایدار می‌شود [۱۴]. پیوگلیتازون که یک آگونیست گیرنده هسته‌ای  $\gamma$ -PPAR است، باعث افزایش حساسیت گیرنده‌های انسولین می‌شود و در دیابت نوع ۲ کاربرد دارد [۱۵]. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که پیوگلیتازون دارای اثرات آنتی‌اکسیدانت است و باعث محافظت از نورون‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو می‌شود [۱۶]. با توجه به نقش استرس اکسیداتیو در آغاز تشنج و آسیب نورونی ناشی از تشنج، در این مطالعه اثرات آنتی‌اکسیدانت و ضد تشنج پیوگلیتازون در مدل تشنج ایجادشده توسط پنتیلن تترازول در موش‌های سوری مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی ۲۸ موش سوری نر بالغ با وزن بین ۲۰ تا ۳۰ گرم از حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی قزوین تهیه شد. حیوانات در تمام مراحل آزمایش دسترسی کافی به آب و غذا داشتند و در شرایط دوازده ساعت تاریکی و دوازده ساعت روشنایی و دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تمام آزمایشات بر اساس دستورالعمل‌های اخلاقی تصویب‌شده در دانشگاه علوم پزشکی قزوین در ارتباط با کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. در این مطالعه پیوگلیتازون (E6910، Sigma Aldrich, USA) به صورت پراکنده‌شده در کربوکسی متیل سلولز<sup>۸</sup> ۰/۵ درصد (۰/۵ درصد CMC) به صورت خوراکی تجویز شد. همچنین برای القای تشنج PTZ (P6500, Sigma Aldrich, USA) به صورت تک‌دز از راه داخل صفاقی تزریق شد. برای بیهوش کردن موش‌ها از تزریق داخل صفاقی کتامین<sup>۹</sup> و زایلازین<sup>۱۰</sup> (K113, Sigma Aldrich, USA) استفاده شد.

موش‌های سوری مورد مطالعه به چهار گروه تقسیم شدند (هفت عدد در هر گروه): گروه کنترل: ۰/۵ درصد CMC به صورت خوراکی با سرنگ گاوژ تجویز شد و چهار ساعت پس از آن نرمال سالین (حلال پنتیلن تترازول) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه پیوگلیتازون: پیوگلیتازون (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت خوراکی به موش‌ها داده و چهار ساعت پس از آن نرمال سالین به صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه پنتیلن

11. Racine classification
12. Clonus
13. Generalized tonic clonic seizure
14. Sagittal surface
15. Lipid peroxidation
16. Thiobarbituric acid
17. N-butanol
18. 1,1,1,3,3-tetramethoxypropane
19. Catalase

5. Pentyletinetrazol (PTZ)
6. GABAergic interneurons
7. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$
8. Carboxymethylcellulose
9. Ketamine
10. Xylazine

جدول ۱. اثر پیوگلیتازون بر مدت زمان (بر حسب ثانیه) لازم برای شروع مراحل مختلف تشنج ناشی از پنتیلین ترازول بر اساس معیار راسین در موش سوری

گروه	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳	مرحله ۴	مرحله ۵
کنترل	-	-	-	-	-
پیوگلیتازون (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، خوراکی)	-	-	-	-	-
پنتیلین ترازول (۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی)	۷±۵۸/۴۴	۹۰/۴±۲۱/۶۹	۵±۱۰۴/۸۲	۲۰۳/۷±۶/۲۳	۲۱۶/۴±۶/۳۴
#درمان	۹۱/۳±۲/۳***	۱۱۱/۴±۸/۲۳**	۱۷±۱۶۵/۵۴*	۲۶۹/۲۷±۸/۸۸***	-

مجله  
بیماری‌های التهابی

# گروه درمان: پنتیلین ترازول (۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل پریوتون)، چهار ساعت بعد از تجویز خوراکی پیوگلیتازون (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، خوراکی) تزریق شد.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , اختلاف معنی‌دار با گروه پنتیلین ترازول.

عدم وجود اختلاف بین میانگین نتایج به دست آمده از میزان مالون دی‌آلدئید<sup>۲۶</sup> و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گروه‌های مورد مطالعه، از تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد و  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

نتایج مطالعه نشان داد که تجویز خوراکی پیوگلیتازون (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) یا حامل آن (گروه کنترل) باعث القای تشنج در موش سوری نمی‌شود. تجویز داخل صفاقی PTZ (۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در فواصل زمانی  $۵۸ \pm 7/44$ ،  $۹۰/۴ \pm ۲۱/۶۹$ ،  $۵ \pm ۱۰۴/۸۲$ ،  $۲۰۳/۷ \pm ۶/۲۳$  و  $۲۱۶/۴ \pm ۶/۳۴$  به ترتیب باعث شروع مراحل اول تا پنجم تشنج می‌شود. تجویز خوراکی پیوگلیتازون (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در فاصله زمانی چهار ساعت قبل از تجویز داخل صفاقی PTZ (۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، باعث افزایش معنی‌دار زمان لازم برای شروع تشنج در مرحله یک ( $P < 0.01$ )، مرحله دو ( $P < 0.01$ )، مرحله سه ( $P < 0.05$ ) و مرحله چهار ( $P < 0.01$ ) در مقایسه با گروه PTZ می‌شود. همچنین تجویز پیوگلیتازون باعث پیشگیری از مرحله پنج تشنج ناشی از PTZ می‌شود (جدول شماره ۱).

تشنج ناشی از PTZ به میزان قابل ملاحظه‌ای باعث افزایش میزان لیپید پراکسیداسیون در هیپوکامپ موش سوری می‌شود. به طوری که میزان MDA در نمونه‌های هیپوکامپ در گروه PTZ، به میزان قابل ملاحظه‌ای بیشتر از گروه کنترل است ( $P < 0.001$ )، شکل شماره ۱). علاوه بر این تجویز خوراکی پیوگلیتازون (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در فاصله زمانی چهار ساعت قبل از تجویز PTZ (۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، باعث کاهش قابل ملاحظه در میزان MDA در نمونه‌های هیپوکامپ، به دنبال تشنج ناشی از PTZ می‌شود ( $P < 0.05$ )، شکل شماره ۱). اگرچه تجویز پیوگلیتازون به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر میزان MDA در هیپوکامپ در موش سوری ندارد ( $P < 0.05$ )، شکل شماره ۱).

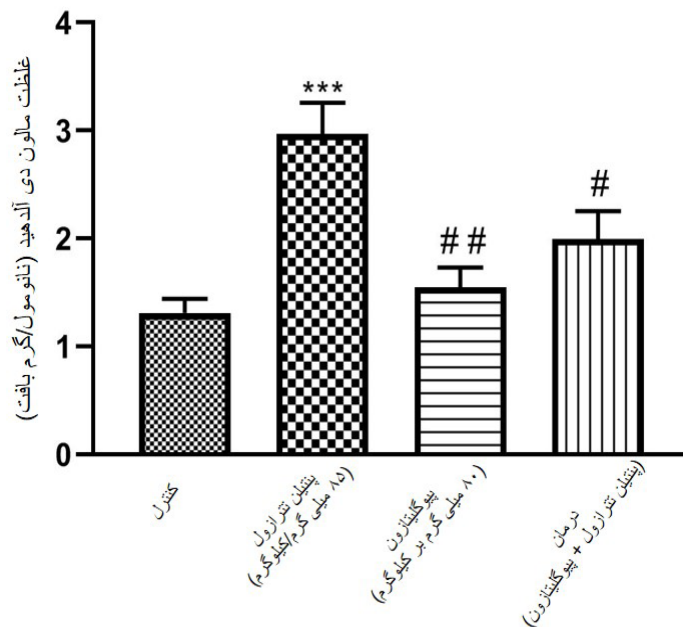
آماده و ۱۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج شد به هموژن اضافه و در سانتریفیوژ یخچال دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بافر واکنش، حاوی فسفات بافر سالین ۵۰ میلی‌مولار و هیدروژن پراکسید<sup>۲۰</sup> ۱۰ میلی‌مولار، تهیه شد و مقدار ۶۰۰ میکرولیتر از آن به ۵ میکرولیتر از عصاره آنزیمی اضافه شد و جذب محلول در طول موج ۲۴۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی کاتالاز به صورت تعداد ماکرومولکول هیدروژن پراکسید تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد [۱۹].

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز<sup>۲۱</sup> در بافت هیپوکامپ از طریق اندازه‌گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیتروبلوترازولیم کلراید<sup>۲۲</sup> اندازه‌گیری شد. بافر استخراج حاوی فسفات بافر ۵۰ میلی‌مولار در pH برابر با ۷/۸ تهیه شد. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج شد به بافت هموژن اضافه و محلول به دست آمده به وسیله سانتریفیوژ یخچال دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بافر واکنش، حاوی فسفات بافر ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر با ۷/۸، NBT ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین<sup>۲۳</sup> ۲ میکرومولار و L-متیونین<sup>۲۴</sup> ۱۳ میلی‌مولار آماده شد و مقدار ۱۵۰۰ میکرولیتر از آن به ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی اضافه شد. محلول به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در معرض نور یکنواخت قرار گرفت. جذب محلول در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، مقدار آنزیمی در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند تا ۵۰ درصد مانع از احیای نوری NBT شود. فعالیت ویژه آنزیم به صورت تعداد واحدهای آنزیم در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد [۲۰، ۲۱].

نتایج بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شدند. برای مقایسه زمان لازم برای شروع مراحل مختلف تشنج از آزمون تی استودنت<sup>۲۵</sup> استفاده شد. همچنین به منظور بررسی وجود یا

20. Hydrogen peroxide
21. Superoxide dismutase
22. Nitroblue tetrazolium chloride (NBT)
23. Riboflavin
24. L-methionine
25. Student t-test

26. Malondialdehyde



مجله  
بیماری‌های التهابی

شکل ۱. اثر پیوگلیتازون بر غلظت MDA (نانومول بر گرم بافت) در هیپوکامپ موش‌های سوری پس از تشنج ناشی از پنتیلین تترازول در گروه‌های کنترل و پیوگلیتازون، به ترتیب ۰/۵ درصد CMC (خوراکی) و پیوگلیتازون (۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم، خوراکی) در فاصله زمانی چهار ساعت قبل از تجویز داخل صفاقی نرمال سالین (۱ میلی لیتر) تجویز شدند. در گروه‌های پنتیلین تترازول و درمان، به ترتیب ۰/۵ درصد CMC (خوراکی) و پیوگلیتازون (۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم، خوراکی) در فاصله زمانی چهار ساعت قبل از تجویز داخل صفاقی پنتیلین تترازول (۸۵ میلی گرم بر کیلوگرم) تجویز شدند.  $P < 0.0001$ : اختلاف معنی دار با گروه کنترل.  $P < 0.05$  و  $P < 0.01$ : اختلاف معنی دار با گروه پنتیلین تترازول.

آسیب به نورون‌ها در قسمت‌های مختلف سیستم عصبی مرکزی از جمله هیپوکامپ می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که پس از تشنج میزان مالون دی آلدئید در هیپوکامپ افزایش پیدا می‌کند که این افزایش با کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز همراه است.

اینترنورون‌ها<sup>۲۸</sup> سلول‌های تولیدکننده گابا<sup>۲۹</sup> هستند که به عنوان نورون‌های مهارتی در سیستم اعصاب مرکزی عمل می‌کنند [۲۲]. مطالعات نشان داده است که استرس اکسیداتیو ناشی از PTZ باعث آسیب به اینترنورون‌ها و در نتیجه ایجاد صرع در حیوانات مورد آزمایش می‌شود [۲۳-۲۵]. بنابراین عوامل آنتی‌اکسیدانت به صورت بالقوه می‌توانند با محافظت از اینترنورون‌ها در پیشگیری از تشنج مؤثر باشند [۲۵]. مطالعات زیادی نشان‌دهنده نقش عوامل آنتی‌اکسیدانت در پیشگیری از تشنج و افزایش مدت زمان لازم برای شروع تشنج است. همچنین عوامل آنتی‌اکسیدانت باعث محافظت از نورون‌ها در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از تشنج می‌شوند [۲۶]. پیوگلیتازون یک آگونیست گیرنده هسته‌ای  $\gamma$ -PPAR است که باعث افزایش حساسیت گیرنده‌های انسولین می‌شود و در دیابت نوع ۲ کاربرد دارد [۱۵]. مطالعات زیادی نشان داده است که پیوگلیتازون از طریق کاهش تولید رادیکال‌های

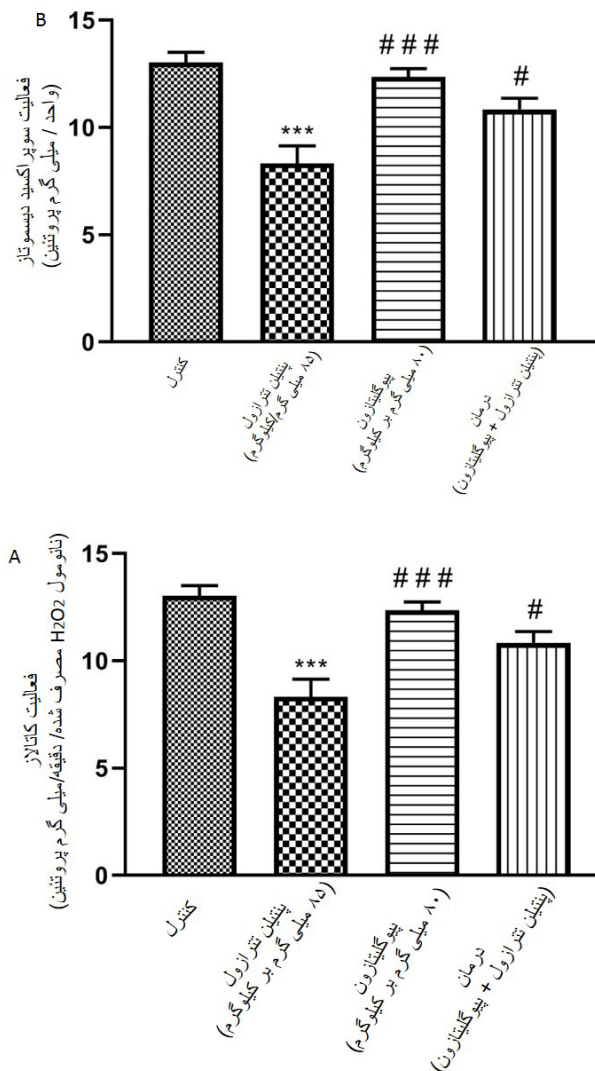
تشنج ناشی از PTZ به میزان قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز ( $P < 0.001$ ) و سوپراکسید دیسموتاز ( $P < 0.001$ ) در هیپوکامپ موش سوری در مقایسه با گروه کنترل شد (شکل شماره ۲). اگرچه تجویز خوراکی پیوگلیتازون (۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم) در فاصله زمانی چهار ساعت قبل از تجویز داخل صفاقی PTZ (۸۵ میلی گرم بر کیلوگرم)، باعث افزایش قابل ملاحظه فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز ( $P < 0.05$ ) و کاتالاز ( $P < 0.05$ ) در نمونه‌های هیپوکامپ به دنبال تشنج ناشی از PTZ می‌شود (شکل شماره ۲). همچنین تجویز پیوگلیتازون به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل، تأثیر قابل ملاحظه‌ای در فعالیت این آنزیم‌ها در هیپوکامپ موش سوری ندارد ( $P < 0.05$ ).

## بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه نشان داد که تجویز پیوگلیتازون در فاصله زمانی چهار ساعت قبل از تجویز PTZ، باعث افزایش مدت زمان لازم برای شروع مراحل یک تا چهار تشنج، بر اساس معیار راسین می‌شود. مطالعات مختلف نشان داده است که استرس اکسیداتیو<sup>۲۷</sup> و تولید رادیکال‌های آزاد در آسیب به نورون‌ها و عوارض ناشی از تشنج نقش مهمی دارد. به دنبال تشنج ناشی از PTZ، لیپید پراکسیداسیون و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت باعث

28. Interneurons  
29. Gamma aminobutyric acid

27. Oxidative stress



مجله  
بیماری‌های التهابی

شکل ۲. اثر پیوگلیتازون بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (A; CAT) و سوپراکسید دیسوماتاز (B; SOD) در هیپوکامپ موش‌های سوری، پس از تشنج ناشی از پنتیلن تترازول در گروه‌های کنترل و پیوگلیتازون، به ترتیب ۰/۵ درصد (خوراکی) و پیوگلیتازون (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، خوراکی) در فاصله زمانی چهار ساعت قبل از تجویز داخل صفاقی نرمال سالین (۱ میلی‌لیتر) تجویز شدند. در گروه‌های پنتیلن تترازول و درمان، به ترتیب ۰/۵ درصد (خوراکی) و پیوگلیتازون (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، خوراکی) در فاصله زمانی چهار ساعت قبل از تجویز داخل صفاقی پنتیلن تترازول (۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تجویز شدند.  $P < 0.001$ : اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل.  $P < 0.05$ <sup>#</sup> و  $P < 0.001$ <sup>###</sup>: اختلاف معنی‌دار با گروه پنتیلن تترازول.

۲۸]. نتایج این مطالعه نشان داد که پیوگلیتازون مدت زمان لازم برای شروع تشنج ناشی از PTZ را به تأخیر می‌اندازد که همسو با مطالعات گذشته است که نشان می‌دهد عوامل آنتی‌اکسیدانت در پیشگیری از تشنج و افزایش مدت‌زمان لازم برای شروع تشنج نقش دارند [۲۶]. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که پیوگلیتازون باعث کاهش لیپید پراکسیداسیون ناشی از PTZ و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسوماتاز در هیپوکامپ می‌شود.

نتایج این مطالعه نشان داد که پیوگلیتازون باعث افزایش آستانه تشنج ناشی از PTZ می‌شود. همچنین در این مطالعه

آزاد و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، باعث محافظت از نورون‌ها در برابر آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو می‌شود [۲۷]. مکانیسم‌های زیادی در توصیف اثرات آنتی‌اکسیدانتی پیوگلیتازون مطرح شده است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به تعدیل بیان تحت واحدهای NADPH اکسیداز<sup>۳۰</sup>، افزایش تولید سوپراکسید دیسوماتاز و مهار مسیر سیگنال‌های فاکتور هسته‌ای کاپا بی<sup>۳۱</sup> و پروتئین کیناز فعال شده میتوژن<sup>۳۲</sup> اشاره کرد [۳۱-۳۲].

30. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase  
31. Nuclear factor-κB (NF-κB)  
32. Mitogen activated protein kinase (MAPKs)



پیوگلیتازون، باعث کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از PTZ، در هیپوکامپ موش‌های سوری شد. بنابراین احتمالاً اثرات آنتی‌اکسیدانت پیوگلیتازون در اثرات محافظتی این دارو در برابر تشنج ناشی از PTZ مؤثر است. با توجه نتایج مطالعات حیوانی می‌توان اثر این دارو را در بیماری صرع در کارآزمایی‌های بالینی مورد مطالعه قرار داد.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد IR.QUMS.REC.1398.004 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین تصویب شد.

#### حامی مالی

بخشی از منابع این پژوهش از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و بخشی دیگر از هزینه شخصی نویسنده مسئول مقاله تأمین شد.

#### مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

#### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

## References

- [1] Stafstrom CE, Carmant L. Seizures and Epilepsy: An overview for neuroscientists. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015; 5(6):a022426. [DOI:10.1101/cshperspect.a022426] [PMID] [PMCID]
- [2] Manford M. Recent advances in epilepsy. *J Neurol*. 2017; 264(8):1811-24. [DOI:10.1007/s00415-017-8394-2] [PMID] [PMCID]
- [3] Ashjazadeh N, Yadollahikhales G, Ayoobzadehshirazi A, Sadraei N, Hadi N. Comparison of the health-related quality of life between epileptic patients with partial and generalized seizure. *Iran J Neurol*. 2014; 13(2):94-100. [PMID] [PMCID]
- [4] Perucca P, Mula M. Antiepileptic drug effects on mood and behavior: Molecular targets. *Epilepsy Behav*. 2013; 26(3):440-9. [DOI:10.1016/j.yebeh.2012.09.018] [PMID]
- [5] Zhu HL, Wan JB, Wang YT, Li BC, Xiang C, He J, et al. Medicinal compounds with antiepileptic/anticonvulsant activities. *Epilepsia*. 2014; 55(1):3-16. [DOI:10.1111/epi.12463] [PMID]
- [6] Kowski AB, Weissinger F, Gaus V, Fidzinski P, Losch F, Holtkamp M. Specific adverse effects of antiepileptic drugs -- A true-to-life monotherapy study. *Epilepsy Behav*. 2016; 54:150-7. [DOI:10.1016/j.yebeh.2015.11.009] [PMID]
- [7] Wahab A. Difficulties in treatment and management of epilepsy and challenges in new drug development. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010; 3(7):2090-110. [DOI:10.3390/ph3072090] [PMID] [PMCID]
- [8] Ono T, Galanopoulou AS. Epilepsy and epileptic syndrome. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 724:99-113. [DOI:10.1007/978-1-4614-0653-2\_8] [PMID] [PMCID]
- [9] Gu B, Daltone KA. Models and detection of spontaneous recurrent seizures in laboratory rodents. *Zool Res*. 2017; 38(4):171-9. [DOI:10.24272/j.issn.2095-8137.2017.042] [PMID] [PMCID]
- [10] Geronzi U, Lotti F, Grosso S. Oxidative stress in epilepsy. *Expert Rev Neurother*. 2018; 18(5):427-34. [DOI:10.1080/14737175.2018.1465410] [PMID]
- [11] Pearson-Smith JN, Patel M. Metabolic dysfunction and oxidative stress in epilepsy. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(11):2365. [DOI:10.3390/ijms18112365] [PMID] [PMCID]
- [12] Martinc B, Grabnar I, Vovk T. Antioxidants as a preventive treatment for epileptic process: A review of the current status. *Curr Neuropharmacol*. 2014; 12(6):527-50. [DOI:10.2174/1570159X12666140923205715] [PMID] [PMCID]
- [13] Shimada T, Yamagata K. Pentylentetrazol-induced kindling mouse model. *J Vis Exp*. 2018; (136):56573. [DOI:10.3791/56573] [PMID] [PMCID]
- [14] Zaitsev AV. The role of GABAergic interneurons in cortex and hippocampus in the development of epilepsy. *Neurosci Behav Physiol*. 2017; 47:913-22. [DOI:10.1007/s11055-017-0491-2]
- [15] Pavlova V, Filipova E, Uzunova K, Kalinov K, Vekov T. Pioglitazone therapy and fractures: Systematic review and meta-analysis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018; 18(5):502-7. [DOI:10.2174/1871530318666180423121833] [PMID] [PMCID]
- [16] Karabas MK, Ayhan M, Guney E, Serter M, Meteoglu I. The effect of pioglitazone on antioxidant levels and renal histopathology in streptozotocin-induced diabetic rats. *ISRN Endocrinol*. 2013; 2013:858690. [DOI:10.1155/2013/858690] [PMID] [PMCID]
- [17] Cela E, McFarlan AR, Chung AJ, Wang T, Chierzi S, Murai KK, et al. An optogenetic kindling model of neocortical epilepsy. *Sci Rep*. 2019; 9(1):5236. [DOI:10.1038/s41598-019-41533-2] [PMID] [PMCID]
- [18] Ghani MA, Barril C, Bedgood DR Jr, Prenzler PD. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chem*. 2017; 230:195-207. [DOI:10.1016/j.foodchem.2017.02.127] [PMID]
- [19] Hadwan MH. Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. *BMC Biochem*. 2018; 19(1):7. [DOI:10.1186/s12858-018-0097-5] [PMID] [PMCID]
- [20] Durak I, Yurtarslan Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to Superoxide Dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of Nitroblue Tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta*. 1993; 214(1):103-4. [DOI:10.1016/0009-8981(93)90307-P] [PMID]
- [21] Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. In: Meister A. Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds. *Methods in Enzymology*. Vol. 113. Academic Press: Cambridge, MA; 1985. p. 484-490. [DOI:10.1016/S0076-6879(85)13062-4] [PMID]
- [22] Katsarou AM, Moshé SL, Galanopoulou AS. Interneuronopathies and their role in early life epilepsies and neurodevelopmental disorders. *Epilepsia Open*. 2017; 2(3):284-306. [DOI:10.1002/epi4.12062] [PMID] [PMCID]
- [23] Gao R, Penzes P. Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Curr Mol Med*. 2015; 15(2):146-67. [DOI:10.2174/1566524015666150303003028] [PMID] [PMCID]
- [24] Dudek FE, Shao LR. Loss of GABAergic interneurons in seizure-induced epileptogenesis. *Epilepsy Curr*. 2003; 3(5):159-61. [DOI:10.1046/j.1535-7597.2003.03503.x] [PMID] [PMCID]
- [25] Faghihi N, Mohammadi MT. Anticonvulsant and antioxidant effects of pitavastatin against pentylentetrazol-induced kindling in mice. *Adv Pharm Bull*. 2017; 7(2):291-8. [DOI:10.15171/apb.2017.035] [PMID] [PMCID]
- [26] Puttachary S, Sharma Sh, Stark S, Thippeswamy T. Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:745613. [DOI:10.1155/2015/745613] [PMID] [PMCID]
- [27] Lee CH, Yi MH, Chae DJ, Zhang E, Oh SH, Kim DW. Effect of pioglitazone on excitotoxic neuronal damage in the mouse hippocampus. *Biomol Ther (Seoul)*. 2015; 23(3):261-7. [DOI:10.4062/biomolther.2014.146] [PMID] [PMCID]
- [28] Chandrasekar T, Muthiah NS, Sandiya R, Sanitha, Aparna. Evaluation of antioxidant activity of pioglitazone: Hydrogen peroxide scavenging activity (in-vitro method). *Res J Pharm Biol Chem Sci*. 2015; 6(5):1492-5. [https://www.rjpbcs.com/pdf/2015\\_6\(5\)/\[206\].pdf](https://www.rjpbcs.com/pdf/2015_6(5)/[206].pdf)

- [29] Pérez-Girón JV, Palacios R, Martín A, Hernanz R, Aguado A, Martínez-Revelles S, et al. Pioglitazone reduces angiotensin II-induced COX-2 expression through inhibition of ROS production and ET-1 transcription in vascular cells from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014; 306(11):H1582-93. [DOI:10.1152/ajpheart.00924.2013] [PMID]
- [30] Wang Sh, Ye SD, Sun WJ, Hu YY. Pioglitazone inhibits the expressions of p22phox and p47phox in rat mesangial cells in vitro. *ISRN Endocrinol.* 2014; 2014:601352 [DOI:10.1155/2014/601352] [PMID] [PMCID]
- [31] Jesse CR, Bortolatto CF, Wilhelm EA, Roman SS, Prigol M, Nogueira CW. The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist pioglitazone protects against cisplatin-induced renal damage in mice. *J Appl Toxicol.* 2014; 34(1):25-32. [DOI:10.1002/jat.2818] [PMID]

---

This Page Intentionally Left Blank

---