



اثر نانوکورکومین خوراکی بر تشنج ناشی از پنتیلین تترازول داخل صفاقی و الگوی فسفوریلاسیون CaMKII در هیپوکامپ موش سوری نر

لیلا معزی^۱، فاطمه پیرسلامی^۱، زهرا اسماعیلی^{۲،۳}، مریم موسوی^{۴*}

۱- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۳- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، انستیتو نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

۴- مرکز تحقیقات نانوفناوری در علوم زیستی و پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۳۱، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۹

چکیده

مقدمه: مطالعات قبلی حاکی از آن است که تبدیل کورکومین به فرم نانو ذره می‌تواند موجب افزایش اثر درمانی آن در مدل‌های تشنج شود. نشان داده شده است که تغییرات پروتئین کیناز II وابسته به کلسیم/کالمودولین (CaMKII) با بعضی از مدل‌های تجربی صرع مرتبط است. مطالعه حاضر با هدف بررسی الگوی CaMKII هیپوکامپ متعاقب اثر درمانی نانوکورکومین در مدل تشنج ناشی از پنتیلین تترازول (PTZ) انجام گردید.

مواد و روش‌ها: نانوکورکومین (با میانگین قطر ذره ۱۵۰ نانومتر) بر مبنای آلبومین سرم گاوی تولید شد و در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت خوراکی (گاواژ) به موش‌های سوری نر نژاد NMRI با وزن ۲۵-۳۰ گرم تجویز گردید. یک ساعت بعد PTZ با دوز ۸۵ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی به حیوان تجویز شد. متعاقب تزریق PTZ داخل صفاقی مدت زمان وقوع میوکلونوس، کلونوس، وقوع تشنج تونیک عمومی و میزان مرگ و میر در موش‌های سوری نر ثبت گردید. پس از بررسی الگوی رفتاری تشنج، حیوانات بیهوش شده کشته شدند و میزان فرم‌های فسفریله و کامل CaMKII هیپوکامپ آنان از طریق روش وسترن بلات تعیین گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که تجویز خوراکی نانوکورکومین تولیدشده با BSA در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، در مقایسه با کورکومین طبیعی به طور قابل توجهی تشنج متعاقب PTZ را بهبود داد. در همه گروه‌ها تشنج موجب افزایش فسفوریلاسیون CaMKII هیپوکامپ شد و نانوکورکومین آن را تعدیل نکرد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که اثر درمانی نانوکورکومین در مدل تشنج ناشی از پنتیلین تترازول ارتباطی با تغییر الگوی فعالیت CaMKII هیپوکامپ ندارد.

واژه‌های کلیدی: تشنج، پنتیلین تترازول، نانوکورکومین، پروتئین کیناز II وابسته به کلسیم/کالمودولین، موش سوری.

*نویسنده مسئول: شیراز- خیابان خلیلی- برج پژوهشی محمد رسول الله- طبقه ۸- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، تلفن: ۰۹۱۷۷۱۲۵۷۳۶، نامبر: ۰۷۱۳۶۲۸۱۵۰۶، Email: maryammoosavi@sums.ac.ir

ارجاع: معزی لیلا، پیرسلامی فاطمه، اسماعیلی زهرا، موسوی مریم. اثر نانوکورکومین خوراکی بر تشنج ناشی از پنتیلین تترازول داخل صفاقی و الگوی فسفوریلاسیون CaMKII در هیپوکامپ موش سوری نر. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۲؛ ۱۸(۳): ۱-۹.



مقدمه

صرع یکی از بیماری‌های عصبی شایع است، که از ویژگی‌های آن تشنجات می‌باشد که این تشنجات منجر به فعالیت غیرطبیعی سلول‌های عصبی مغز می‌گردند (۱). با این وجود داروهای ضدصرع موجود قادر به کنترل صرع فقط در دو سوم از بیماران می‌شوند و سایر بیماران با وجود مصرف دارو همچنان از علائم این بیماری رنج می‌برند (۲). علاوه بر این، داروهای ضدصرع فعلی اثرات جانبی دارند که ممکن است استفاده طولانی مدت از آنها منجر به آثار زیان باری از جمله سمیت کبدی گردد (۳).

مطالعات نشان داده است که تشنجات صرعی می‌تواند منجر به آسیب به نورون‌های هیپوکامپ گردد که به نوبه خود می‌تواند یکی از مهمترین عوامل در بروز تشنجات مکرر گردد (۴). اگرچه مکانیسم‌های زمینه‌ای برای صرع هنوز ناشناخته است، نشان داده شده است که تغییرات پروتئین کیناز II وابسته به کلسیم/کالمودولین (CaMKII) با بسیاری از مدل‌های تجربی صرع مرتبط است (۵ و ۶). با وجود گزارشات مختلف دال بر تغییرات CaMKII در مدل‌های تشنج، یافته‌های موجود در این زمینه متناقض می‌باشند. برخی گزارشات دال بر کاهش فعالیت CaMKII پس از شروع فعالیت صرعی است (۷ و ۸). با این وجود مطالعات دیگر افزایش بیان و فعالیت CaMKII را در پی تشنج گزارش نموده‌اند (۹-۱۱). در مدل صرع ایجاد شده به واسطه پیلوکارپین مهار CaMKII می‌تواند شدت تشنج و استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از آن را کاهش دهد (۱۲). در اسالیس‌های کشت داده شده کورتکس تشنج ایجاد شده به واسطه بیکوکولین و AP-4 توأم با افزایش میزان CaMKII همراه است (۱۳). در مغز بیماران مبتلا به صرع لوب تمپورال افزایش میزان CaMKII توأم با کاهش کالسیونین در هیپوکامپ گزارش شده که می‌تواند دال بر عدم تعادل سیستم‌های فسفوریلاسیون/دفسفوریلاسیون Ca²⁺/کالمودولین باشد (۱۴). بنابراین، به نظر می‌رسد بسته به علت و یا شدت تشنج فعال یا غیرفعال شدن CaMKII متفاوت می‌باشد.

عصاره‌های گیاهی می‌توانند به‌عنوان درمان‌های بالقوه در درمان بیماری صرع در نظر گرفته شوند. کورکومین یک ترکیب پلی فنلیک استخراج شده از گیاه *Curcuma longa* (زردچوبه) می‌باشد (۱۵). اخیراً گزارش شده است که کورکومین دارای اثرات درمانی بر صرع می‌باشد، به‌عنوان مثال، در مدل‌های مختلف صرع از جمله تشنج ناشی از آهن (۱۶)، تشنج ناشی از تزریق حاد داخل صفاقی PTZ (۱۷ و ۱۸)، مدل کیندلینگ مزمن داخل صفاقی PTZ (۱۹) تشنج ناشی از kinat (۲۰) و همچنین تشنج ناشی از پیلوکارپین (۲۱) نشان داده شده است که کورکومین اثر محافظتی ایجاد می‌کند. با این حال، برخی مطالعات دیگر گزارش کرده‌اند که کورکومین در تشنج ناشی از PTZ (۲۲) تشنج ناشی از کاینیک اسید (۲۳) و بر تعداد فرکانس‌های تشنج پس از صرع پایدار در لوب تمپورال (۲۴) اثر قابل توجهی نداشته است. از آنجا که کورکومین حلالیت کمی در آب دارد عدم اثر

ضد تشنجی آن در برخی از مطالعات می‌تواند به دلیل محدودیت دسترسی آن به بافت مغز باشد (۲۵). در بسیاری از مطالعات حیوانی و بالینی درجوندگان و انسان گزارش شده است که کورکومین دارای فراهم زیستی پایینی می‌باشد (۲۶ و ۲۷). بنابراین اثرات درمانی کورکومین می‌تواند به دلیل حلالیت کم آن در آب و همچنین فراهم زیستی پایین آن به‌صورت خوراکی محدود می‌شود (۲۸). به همین منظور جهت بهبود جذب کورکومین استراتژی‌های مختلفی به کار برده شده است، که از جمله می‌توان به فرمولاسیون نانوذرات برای افزایش حلالیت‌پذیری در آب و همچنین افزایش قابلیت عبور آن از سد خونی مغزی اشاره کرد (۲۹). در همین راستا نشان داده شده است که نانو کورکومین با پایه کیتوزان-آلژینات-سدیم تری پلی فسفات منجر به کاهش اختلال در حافظه و مرگ سلولی در مدل صرع ناشی از کیندلینگ با پنتیلن تترازول می‌گردد (۲۹). علاوه بر این نشان داده شده است که فرمولاسیون لیپوزومی از کورکومین منجر به کاهش تشنج در مدل‌های مختلف صرع از جمله تشنج ناشی از PTZ، تشنج ناشی از الکتروشوک و همچنین صرع پایدار در موش سوری می‌گردد (۳۰). مطالعات اخیر ما نشان داده است که نانو کورکومین ساخته شده بر پایه آلومین سرم گاوی اثر مؤثرتری نسبت به کورکومین طبیعی در مدل تشنج ناشی از PTZ دارد (۳۱). آلومین به دلیل غیرآنتی ژنیک و غیر سمی بودن، به‌عنوان یک حامل مناسب برای کورکومین در نظر گرفته می‌شود (۳۲ و ۳۳). در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است که نانو کورکومین با پایه آلومین در مقایسه با کورکومین طبیعی از فراهمی زیستی بالاتری برخوردار است (۳۳ و ۳۴).

با توجه به نتایج متناقض در رابطه با تغییرات CaMKII هیپوکامپ متعاقب تشنج در مطالعه حاضر هدف آن است که میزان فسفوریلاسیون (فعال شدن) CaMKII هیپوکامپ متعاقب تزریق PTZ داخل صفاقی بررسی شده و افزایش یا کاهش آن تعیین گردد. به علاوه با در نظر گرفتن اثر حفاظتی گزارش شده از نانو کورکومین در این مدل تشنج، نقش سیگنال CaMKII هیپوکامپ در این اثر حفاظتی تعیین می‌گردد.

مواد و روش‌ها

PTZ از شرکت سیگما آلدریج آمریکا و کورکومین از شرکت Exir اتریش تهیه شدند. فرم فسفریله و توتال آنتی‌بادی CaMKII، آنتی‌بادی beta-actin و آنتی‌بادی ثانویه کانژوگه شده با پراکسیداز از شرکت Cell signaling تهیه شد. کیت ECL Select از شرکت Amersham آمریکا و کاغذ پی وی دی اف از شرکت Millipore خریداری شدند. سایر مواد مصرفی نیز از کمپانی‌های رایج خریداری گردید.

برای تهیه نانو ذره کورکومین طبق مطالعات قبلی از روش حل‌زدایی (Desolvation) استفاده گردید که براساس آن از آلومین به‌عنوان پلیمر تهیه نانو کورکومین استفاده می‌شود (۳۲ و ۳۵) مطابق این روش کورکومین ابتدا به‌صورت یک محلول ۲/۵ درصد در استون حل شد و سپس به‌صورت قطره‌ای و متناوب به محلول آلومین سرم گاوی ۳ درصد در آب مقطر که

کلونوس تشنج تونیک و میزان مرگ و میر مورد ارزیابی قرار گرفتند (۴۲) و (۴۳) و فاصله زمانی بین شروع تزریق داخل صفاقی PTZ تا بروز تشنج ثبت شد. در این مطالعه حیوانات مطابق گروه‌های زیر به ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند:

- I. گروه کنترل: گروه دریافت‌کننده آب مقطر (حلال نانو کورکومین) به صورت خوراکی (گاواژ)، یک ساعت قبل از تزریق نرمال-سالین صفاقی
 - II. گروه دریافت‌کننده PTZ: گروه دریافت‌کننده آب مقطر (حلال نانو کورکومین) به صورت خوراکی (گاواژ)، یک ساعت قبل از تزریق دوز ۸۵ میلی گرم/کیلوگرم PTZ حل شده در نرمال سالین
 - III. گروه دریافت‌کننده PTZ + نانو کورکومین ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم: گروه دریافت‌کننده نانو کورکومین ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم خوراکی یک ساعت قبل از دوز ۸۵ میلی گرم/کیلوگرم PTZ
 - IV. گروه دریافت‌کننده PTZ + نانو کورکومین ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم: گروه دریافت‌کننده نانو کورکومین ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم خوراکی یک ساعت قبل از دوز ۸۵ میلی گرم/کیلوگرم PTZ
 - V. گروه دریافت‌کننده PTZ + کورکومین ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم: گروه دریافت‌کننده کورکومین ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم خوراکی یک ساعت قبل از دوز ۸۵ میلی گرم/کیلوگرم PTZ
 - VI. گروه دریافت‌کننده PTZ + کورکومین ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم: گروه دریافت‌کننده کورکومین ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم خوراکی یک ساعت قبل از دوز ۸۵ میلی گرم/کیلوگرم PTZ
- پس از انجام آزمایشات رفتاری تشنج حیوانات با گاز CO₂ خفیف بیهوش شده و بعد از جدا کردن سر حیوانات هیپوکامپ آنها بر روی یخ جدا گردید، نمونه‌های جدا شده بلافاصله درون میکروتیوب قرار داده شده و در تانک نیتروژن مایع فریز شده و سپس تا روز آزمایش وسترن بلات در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با توجه به اینکه تعداد ۳ تا ۵ نمونه جهت ارزیابی وسترن بلات کافی است (۴۷-۴۴)، در مطالعات وسترن بلات به صورت راندوم تعداد ۴ مغز به هر گروه اختصاص یافت.
- از بافر لیز RIPA (Radio immunoprecipitation assay buffer) حاوی مهارکننده‌های پروتئاز و فسفاتاز به منظور هموژنیزه کردن بافت‌های هیپوکامپ حیوانات استفاده شد. سپس نمونه‌های لیز شده به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به منظور جداسازی مایع شفاف رویی نمونه‌ها سانتریفوژ گردیدند، در نهایت بقایای سلول جدا و دور ریخته شد و پروتئین‌ها به همراه سایر ترکیبات، به صورت محلول در مایع رویی (supernatant) باقی ماندند (۴۸). از روش لوری به منظور اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌های مایع شفاف جدا شده از نمونه‌ها استفاده گردید (۴۸).
- تکنیک وسترن بلات به شیوه‌ای که در مطالعات قبلی ما شرح داده شده است انجام گرفت (۴۹ و ۵۰). جهت تفکیک و شناسایی پروتئین‌های نمونه لیز شده مقدار مساوی از پروتئین نمونه‌ها (۴۰ میکروگرم) به روش SDS-

بر روی همزن الکتریک است افزوده شد. پس از کامل شده این مرحله به محلول به دست آمده ۱۱۰ میکرولیتر گلوکار آلدئید ۸ درصد افزوده شد تا اتصال عرضی نانو ذرات صورت گیرد و سپس این محلول ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. به منظور جدا کردن نانو ذرات محلول به دست آمده طی ۵ مرحله به منظور جداسازی و تعلیق مواد موجود در سوسپانسیون با ۳۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. و در نهایت، ترکیب باقی مانده از سوسپانسیون سانتریفوژ شده در فریزر خشک قرار گرفت تا نانو کورکومین تولید شده به شکل پودری درآورده شود. نانو کورکومین تولید شده تا زمان استفاده در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. تولید نانو کورکومین با این روش در مطالعات قبلی نویسندگان و از طریق بررسی میکروسکوپ الکترونی تأیید شده است که طبق آن سایز نانوذرات به دست آمده با این روش به صورت میانگین ۱۵۰ نانومتر می‌باشد (۳۹-۳۷). در مطالعات میکروسکوپ الکترونی نمونه‌ای از پودر به دست آمده را در آب مقطر حل کرده بر روی لامل برای میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) تهیه می‌گرد. این نمونه با طلا پوشانده شد و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بررسی می‌گردد.

به صورت کلی در روش حل‌زدایی ذرات با استفاده از افزودن قطره‌ای یک عامل حل‌زدایی (اتانول یا استون) به محلول آلبومین آبی در pH بین ۷ تا ۹ و به دنبال آن اتصال عرضی گلوکار آلدئید تهیه می‌شوند. گلوکار آلدئید به طور کلی برای اتصال عرضی و تثبیت نانوذرات مشتق از آلبومین استفاده می‌شود. اتصال عرضی یک مرحله ضروری برای آماده‌سازی نانوذرات است که بر تجزیه‌پذیری زیستی و رهاسازی دارو از سیستم حامل تأثیر می‌گذارد (۳۶). این مطالعه به صورت تجربی و بر روی موش‌های سوری نر نژاد NMRI با سن ۱۰-۸ هفته و محدوده وزنی ۳۰-۲۵ گرم (تهیه شده از دانشگاه علوم پزشکی شیراز) انجام گرفت. حیوانات با دسترسی آزادانه به آب و غذا و شرایط روشنایی کنترل شده (صبح ۷ تا عصر) و دمای اتاق ۲۰±۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حیوانات به طور تصادفی به ۶ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. کلیه اصول اخلاقی مطالعه منطبق بر اصول اظهارنامه Helsinki بود. اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شیراز و با کد اخلاق IR.SUMS.REC.1400.049 انجام گرفت. در طول مطالعه هر حیوان یک بار مورد بررسی قرار گرفت و محدودیت‌های مطالعه شامل مرگ و میر حیوانات بود که با حیوانات جدید جایگزین می‌شدند.

در این آزمایش PTZ با دوز ۸۵ میلی گرم/کیلوگرم و به صورت داخل صفاقی (محلول در نرمال سالین تزریقی) ۶۰ دقیقه بعد از تجویز نانو کورکومین، کورکومین یا حلال آنها تزریق شد. تجویز این دوز به صورت داخل صفاقی موجب تشنجات تونیک-کلونیک ژنرالیزه شده که شبیه به تشنج تونیک-کلونیک در انسان می‌باشد (۴۰ و ۴۱). بلافاصله پس از تجویز داخل صفاقی PTZ حیوانات به منظور ظاهر شدن علائم میوکلونوس،

کیلوگرم ($P < 0.0001$) به‌طور قابل توجهی سبب افزایش تأخیر در وقوع تشنج کلونیک ناشی از PTZ نسبت به گروه کنترل شد. کورکومین طبیعی نیز در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب افزایش معنی‌داری در تأخیر وقوع تشنج کلونیک نسبت به گروه کنترل شد در حالی که دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کورکومین تأثیر معنی‌داری نسبت به گروه PTZ نداشت (شکل ۲). همچنین تفاوت معنی‌داری بین اثر درمانی نانوکورکومین ۱۰۰ و کورکومین ۱۰۰ در تأخیر زمانی جهت تشنج کلونیک عمومی وجود داشت.

شکل ۱-C وقوع یا عدم وقوع تشنج تونیک را در گروه‌های مختلف نمایش می‌دهد که به‌صورت اعداد ۰ (عدم وقوع) و ۱ (وقوع) نشان داده شده است. همان‌گونه که نمایش داده شده است نانوکورکومین در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی‌داری در میزان وقوع تشنج کلونیک ایجاد کرده است. نانوکورکومین در دوز ۵۰ و کورکومین در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیر معنی‌داری بر میزان وقوع تشنج کلونیک متعاقب PTZ درون صفاقی نداشتند.

شکل ۱-D میزان مرگ و میر حیوانات متعاقب تزریق PTZ درون صفاقی را نشان می‌دهد. عدم بروز مرگ و میر با عدد صفر و وقوع آن با عدد ۱ نمایش داده شده است. همان‌گونه که در شکل مذکور قابل مشاهده است نانوکورکومین ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب کاهش معنی‌داری در میزان بروز مرگ و میر در حیوانات شد. نانوکورکومین در دوز ۵۰ و کورکومین طبیعی در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیر معنی‌داری بر میزان بروز مرگ و میر متعاقب دریافت PTZ درون صفاقی نداشتند.

PAGE تحت شرایط احیا در ژل ۱۰ درصد پلی‌آکریل آمید الکتروفورز شد، باندهای جدا شده روی ژل پلی‌آکریل آمید با استفاده از سیستم انتقال بایو راد (Bio-RAD، آمریکا) به غشای PVDF (Millipore, Burlington, MA، ایالت متحده آمریکا) منتقل شد.

از محلول بلوک‌کننده شامل BSA (سرم آلبومین گاوی) ۵ درصد در TBST (بافر تریس نمکی حاوی توین) برای بلوک کردن مناطق آزاد غشا استفاده گردید. سپس غشای PVDF به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در آنتی‌بادی‌های اولیه p-CaMKII با رقت (۱/۲۰۰۰)، t-CaMKII (3000/1) و beta-actin (2000/1) قرار گرفتند. بعد از شسته شدن غشا با TBST، غشاها به مدت ۱ ساعت در آنتی‌بادی ثانویه بر ضد IgG انسانی در خرگوش کثرت‌دهنده شده با پراکسیداز (۱/۵۰۰۰) انکوبه شدند. سپس غشاها ۳ مرتبه در TBST شسته شدند. غشاها در معرض مقدار کافی از محلول سوپسترا chemiluminescence (ECL select; GE Healthcare) قرار داده شد و باندها در اتاق تاریک به فیلم رادیولوژی انتقال داده شد، در نهایت فیلم‌های رادیولوژی اسکن شده و با استفاده از نرم‌افزار (Image J (Bethesda, MD، تراکم باندها اندازه‌گیری گردید.

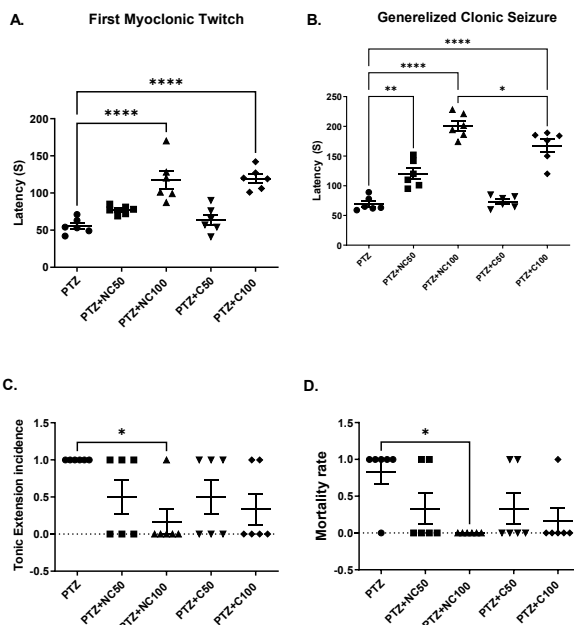
جهت بررسی داده‌ها از نرم‌افزار Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA) استفاده شد و نتایج به‌صورت میانگین \pm خطای استاندارد بیان شد. همچنین از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و متعاقب آن آزمون توکی جهت مقایسه گروه‌های کنترل و آزمایش استفاده و سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نانوکورکومین سبب افزایش تأخیر در وقوع تشنج ناشی از تزریق داخل صفاقی PTZ می‌شود.

شکل ۱ نتایج بررسی تشنج حیوانات در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. پس از تزریق PTZ داخل صفاقی تأخیر زمانی اولین تشنج میوکلونیک (A)، تشنج کلونیک (B)، تشنج تونیک (C) و نیز میزان مرگ و میر (D) در گروه‌های مختلف ثبت گردید. همان‌گونه که در شکل ۱-A نشان داده شده است تست آنوای یک طرفه تفاوت معنی‌داری در تأخیر زمانی برای ایجاد اولین تویچ میوکلونیک نشان داد ($F(4,25) = 17.54, P < 0.0001$). نانوکورکومین در دوز ۱۰۰ و نه ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب افزایش معنی‌دار تأخیر زمانی برای ایجاد اولین تویچ میوکلونیک شد. کورکومین نیز در دوز ۱۰۰ و نه ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأخیر زمانی برای ایجاد اولین تویچ میوکلونیک را افزایش داد.

شکل ۱-B تأخیر زمانی برای وقوع تشنج کلونیک عمومی متعاقب تزریق داخل صفاقی PTZ را نشان می‌دهد. طبق نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه تغییر معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی وجود داشت ($F(4,25) = 52.02, P < 0.0001$). تزریق حاد نانوکورکومین به‌صورت خوراکی در هر دو دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P < 0.01$) و ۱۰۰ میلی‌گرم بر



شکل ۱- اثر تجویز خوراکی نانوکورکومین (NC) و کورکومین (C) در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر تأخیر در وقوع اولین تویچ میوکلونیک (A) و تأخیر

شکل ۲- بررسی اثر PTZ به تنهایی و در حضور نانو کورکومین در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر سطح پروتئین کیناز II وابسته به کلسیم/کالمودولین در هیپوکامپ داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نمایش داده شده‌اند. $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.001$ نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل می‌باشد (n=4).

بحث

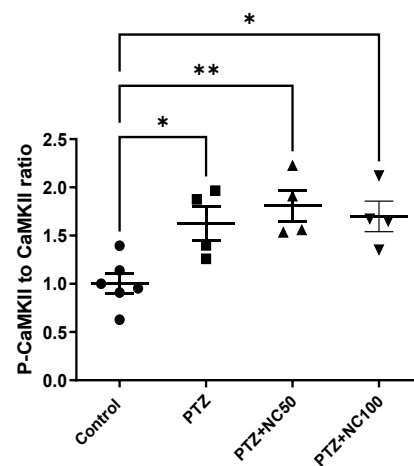
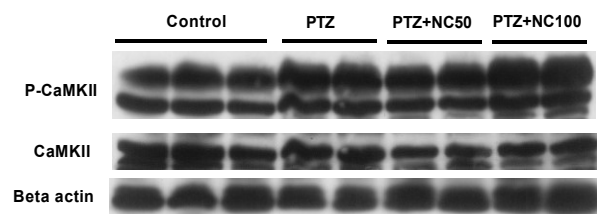
تجویز خوراکی دارو به عنوان یکی از راحت‌ترین روش‌ها برای مصرف دارو در نظر گرفته می‌شود (۵۱ و ۵۲). با این وجود کورکومین به دلیل حل‌الیت‌پذیری پایینی که دارد ۷۵ درصد آن بعد از تجویز خوراکی، از طریق مدفوع دفع می‌گردد (۵۳). بنابراین در مطالعه حاضر با استفاده از آلبومین سرم گاوی کورکومین به فرم نانو کورکومین تبدیل شد.

در تحقیقات مربوط به صرع مدل‌های حیوانی تشنج به طور گسترده‌ای برای بررسی اثر ضدصرعی مواد جدید به کار می‌رود (۵۴). PTZ دارویی است که به محل اتصال بنزودیازپینی گیرنده‌های گابا متصل و باعث مهار گابا و افزایش فعالیت تحریکی نورونی می‌گردد (۵۵). PTZ آنتاگونیست رسپتورهای گابا است و برای القای مدل صرع غیابی و منتشر مناسب است. تزریق این دارو با دوز ۷۰-۸۵ mg/kg به ازای یک کیلوگرم در موش صحرایی موجب تشنج کلونیک در ۹۷٪ از حیوانات می‌شود (۵۶). در مطالعه حاضر از یک دوز ثابت از PTZ به صورت داخل صفاقی برای اندازه‌گیری مدت زمان تأخیر در وقوع تشنج استفاده شد (۵۷). در بخش آنالیز رفتاری مشاهدات دال بر آن بود که نانو کورکومین در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم زمان وقوع تشنج کلونیک را به صورت معنی داری طولانی کرد در حالی بود که دوز ۵۰ کورکومین طبیعی چنین اثری را از خود نشان نداد. همچنین نانو کورکومین در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم اثرات مؤثرتری نسبت به کورکومین طبیعی در همان دوز ایجاد می‌کند به گونه‌ای که تأخیر زمانی برای ایجاد تشنج کلونیک در گروه دریافت‌کننده نانو کورکومین ۱۰۰ تفاوت معنی داری نسبت به گروه دریافت‌کننده کورکومین ۱۰۰ داشت. به علاوه در حالی که نانو کورکومین در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم توانست میزان وقوع تشنج تونیک و مرگ متعاقب PTZ داخل صفاقی را در حیوان کاهش دهد کورکومین طبیعی در همان دوز تأثیر معنی داری نسبت به گروه دریافت‌کننده PTZ نشان نداد. این یافته‌ها پیشنهادکننده آن است که نانو کورکومین اثر درمانی قوی‌تری نسبت به کورکومین در مدل تشنج ناشی از PTZ دارد. این اثر قوی‌تر مشاهده شده توسط نانو کورکومین ممکن است به دلیل فراهمی زیستی بالاتر آن باشد، که طبق مطالعات قبلی نانو کورکومین تولید شده با این روش دارای قطر حدود ۱۵۰ نانومتر دارد (۳۷-۳۹). در مطالعات قبلی گزارش شده است که تزریق داخل صفاقی مکمل نانوذرات کورکومین C3 در دوز (۵۰ میلی گرم/کیلوگرم/روزانه) به مدت ۴ روز متوالی سبب کاهش صرع پایدار ناشی از پیلوکارپین در موش صحرایی گردید (۵۸). در مدل صرع

در وقوع تشنج کلونیک عمومی (B)، میزان وقوع تشنج تونیک (C) و میزان بروز مرگ (D) ناشی از تزریق داخل صفاقی پنتیلن تترازول (PTZ). داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نمایش داده شده‌اند. $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.001$ نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به گروه PTZ می‌باشد.

تأثیر نانو کورکومین بر میزان CaMKII هیپوکامپ متعاقب تزریق داخل صفاقی PTZ

با توجه به اثر نانو کورکومین بر الگوی تشنج ناشی از PTZ و نقش پروتئین CaMKII در روند تشنج، الگوی تغییرات این پروتئین متعاقب تجویز PTZ در گروه‌های درمان شده با نانو کورکومین بررسی شد. شکل ۲ نتایج میزان پروتئین CaMKII هیپوکامپ را نمایش می‌دهد. شکل 2A نمونه ای از تغییرات فرم فسفوریله (فعال) و فرم کامل CaMKII هیپوکامپ در کنار پروتئین کنترل داخلی بتا اکتین را نشان می‌دهد. شکل 2B نتایج آماری نسبت فسفوریله به تام پروتئین CaMKII را نمایش داده است. آزمون آنالیز واریانس یکطرفه، تفاوت معنی داری را بین گروه‌ها نشان داد ($P < 0.0034$). $F(3, 14) = 7.631$. همچنین آزمون تعقیبی توکی نشان داد که میزان CaMKII فسفوریله در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده PTZ نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. این بدان معناست که پیش درمان با نانو کورکومین در مدل تشنج PTZ نتوانست در سطح p-CaMKII/CaMKII هیپوکامپ تغییر معنی داری ایجاد کند.



مجاور و فعال سازی هولوآنزیم CaMKII می شود (۶۵). بنابراین این احتمال مطرح می شود که افزایش سطح CaMKII به دنبال تزریق حاد PTZ به صورت داخل صفاقی به دلیل تأثیر آن بر فعال شدن گیرنده های NMDA و به دنبال آن افزایش کلسیم از طریق این گیرنده و بالا رفتن فعالیت CaMKII باشد (۶۶).

با وجودیکه در مطالعات قبلی گزارش شده است که کورکومین سبب مهار کینازهای وابسته به کلسیم از جمله CaMKII می گردد (۶۶) در مطالعه ما تزریق نانوکورکومین نتوانست سطح افزایش یافته CaMKII ناشی از PTZ را تعدیل نماید. بنابراین به نظر می رسد تعدیل تشنج در مدل PTZ توسط نانوکورکومین ارتباطی به تعدیل میزان CaMKII هیپوکامپ ندارد. همچنین در مطالعه حاضر نانوکورکومین تأخیر زمانی برای رسیدن به تشنج را افزایش داد. با این وجود حیوان تجربه تشنج را داشت و نهایتاً پس از دوره تشنج مغز حیوان جهت آنالیز وسترن بلات جدا شد. بنابراین اگرچه نانوکورکومین تشنج را تعدیل نمود ولی نهایتاً تشنج اتفاق افتاد که طبق مباحث مطرح شده روند تشنج و تحریک هیپوکامپ به نوبه خود می تواند موجب فسفوریلاسیون CaMKII گردد.

به عنوان نتیجه گیری نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان می دهد که تجویز خوراکی نانوکورکومین تولید شده با BSA سبب کاهش شدت تشنج و مرگ ناشی از تزریق داخل صفاقی PTZ در موش های سوری به صورت قوی تری نسبت به کورکومین طبیعی می گردد. به علاوه مطالعه حاضر دال بر آن بود که PTZ سبب افزایش فسفوریلاسیون CaMKII در هیپوکامپ می شود و نانوکورکومین با وجود تعدیل تشنج تأثیری بر سطح افزایش یافته CaMKII ناشی از PTZ ندارد.

تشکر و قدردانی

این کار با کمک مالی (شماره ۲۲۷۵۷) از دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران انجام شد. مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق (کد اخلاقی: IR.SUMS.REC.1400.049) تأیید گردید.

مشارکت نویسندگان

لیلا معزی: ایده پردازی - نظارت بر طرح - تأمین امکانات - مشارکت در نوشتن مقاله.

فاطمه پیرسلامی: انجام آزمایشات - جمع آوری داده ها - مشارکت در نوشتن مقاله.

زهرا اسماعیلی: انجام آزمایشات - جمع آوری داده ها - مشارکت در نوشتن مقاله. مریم موسوی: ایده پردازی - نظارت بر طرح - آنالیز آماری - نوشتن مقاله.

References

- Györfy B, Kovács Z, Gulyássy P, Simor A, Völgyi K, Orbán G, et al. Brain protein expression changes in WAG/Rij rats, a genetic rat model of absence epilepsy after peripheral lipopolysaccharide treatment. *Brain Behav Immun* 2014;35:86-95. doi: 10.1016/j.bbi.2013.09.001

پایدار ناشی از کیندلینگ PTZ در موش سوری، تجویز نانوکورکومین تولید شده با کیتوزان-آلژینات-سدیم تری پلی فسفات به مدت ۲۰ روز یک اثر ضد تشنجی از خود نشان داد (۲۹). همچنین در مدل داخل وریدی و درون صفاقی PTZ نیز نانوکورکومین اثرات ضد تشنجی مشابهی داشته است (۳۱).

در مطالعات قبلی گزارش شده است که حملات صرعی می تواند موجب آسیب به هیپوکامپ شود که این آسیب می تواند یکی از فاکتورهای مهم در ایجاد صرع پایدار راجع گردد (۴). مطالعه مدل های مختلف تشنج نشان می دهد که فعال شدن گیرنده های مختلف در سطح سلول های عصبی می تواند باعث صرع شود. این گیرنده ها شامل گیرنده های یونوتروپیک و متابوتروپیک گلوتامات هستند. فعال سازی هر یک از این گیرنده ها منجر به افزایش غلظت یون کلسیم در سلول می شود. بنابراین آنزیم های مختلف قابل تنظیم شده با یون کلسیم می توانند در صرع دخیل باشند (۵۹). بنابراین یکی از اهداف این مطالعه بررسی فرم فسفریله CaMKII در هیپوکامپ موش های سوری بود. در این مطالعه هیپوکامپ حیواناتی که یک دوز ثابت از PTZ را دریافت کردند، گروه کنترل که حلال PTZ را دریافت نمود، همچنین گروه های دریافت کننده PTZ و نانوکورکومین به منظور بررسی اثر PTZ بر سطح فسفریله CaMKII به وسیله تکنیک وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تجویز تک دوز PTZ با دوز ۸۵ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی سبب افزایش معنی داری در نسبت p-CaMKII/CaMKII می شود که نشان دهنده فعال شدن قوی CaMKII می باشد. این نتایج در تأیید بعضی مطالعات قبلی می باشد. در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است که در افراد مبتلا به اسکروز هیپوکامپ ناشی از صرع لوب گیجگاهی سطح CaMKII در سلول های گرانولر جاپروس دندان های هیپوکامپ افزایش یافته است (۶۰). همچنین مطالعات حیوانی نشان داده است که تغییر بیان و فعالیت این آنزیم می تواند در بروز صرع نقش داشته باشد (۱۴). همچنین تشنج کلونیک ناشی از PTZ به مدت ۳۰ تا ۴۰ ثانیه موجب تغییر در سطح فسفریله CaMKII گردید (۷). در سیستم عصبی مرکزی یون کلسیم به عنوان یکی از پیامبرهای ثانویه مهم در تنظیم بسیاری از فرآیندهای سلولی از جمله توسعه، نگهداری و انعطاف پذیری عملکرد فعالیت های عصبی نقش ایفا می کند (۶۱)، با وجود نقش فیزیولوژیکی آن در عملکردهای سلولی، ورود بیش از حد کلسیم سبب آسیب پذیری سلول های عصبی می گردد (۶۲) از جمله تغییر در هومئوستازی کلسیم که در طول القا و ماندگاری تشنجات صرعی مشاهده می گردد (۶۳) که به گیرنده NMDA نیز مربوط می شود، بنابراین یکی از مکانیسم های پیشنهادی در بروز صرع، آسیب سلول های عصبی ناشی از فعال شدن گیرنده NMDA وابسته به کلسیم می باشد که سبب تداوم تغییرات پاتوفیزیولوژیک زمینه ساز صرع می گردد (۶۴). از طرفی افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی و اتصال کلسیم به کالמודولین سبب فعال سازی خودکار حوزه خودمهاری

2. Tang F, Hartz AMS, Bauer B. Drug-Resistant Epilepsy: Multiple Hypotheses, Few Answers. *Front Neurol* 2017;8:301. doi: [10.3389/fneur.2017.00301](https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00301)
3. Vidaurre J, Gedela S, Yarosz S. Antiepileptic drugs and liver disease. *Ped Neurology* 2017;77:23-36. doi: [10.1016/j.pediatrneurol.2017.09.013](https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2017.09.013)
4. Buckmaster PS, Wen X, Toyoda I, Gulland FM, Van Bonn W. Hippocampal neuropathology of domoic acid-induced epilepsy in California sea lions (*Zalophus californianus*). *J Comp Neurol* 2014;522:1691-1706. doi: [10.1002/cne.23509](https://doi.org/10.1002/cne.23509)
5. Blair RE, Churn SB, Sombati S, Lou JK, DeLorenzo RJ. Long-lasting decrease in neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity in a hippocampal neuronal culture model of spontaneous recurrent seizures. *Brain Res* 1999;851:54-65.
6. Bronstein J, Farber D, Wasterlain C. Decreased calmodulin kinase activity after status epilepticus. *Neurochem Res* 1988;13:83-6.
7. Dong Y, Rosenberg HC. Brief seizure activity alters Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II dephosphorylation and subcellular distribution in rat brain for several hours. *Neurosci Lett* 2004;357:95-8. doi: [10.1016/j.neulet.2003.11.069](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.11.069)
8. Yamagata Y, Imoto K, Obata K. A mechanism for the inactivation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II during prolonged seizure activity and its consequence after the recovery from seizure activity in rats in vivo. *Neuroscience* 2006;140:981-92. doi: [10.1016/j.neuroscience.2006.02.054](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.054)
9. Lee MC, Ban SS, Woo YJ, Kim SU. Calcium/calmodulin kinase II activity of hippocampus in kainate-induced epilepsy. *Neuroscience* 2001;116:643-8. doi: [10.3346/jkms.2001.16.5.643](https://doi.org/10.3346/jkms.2001.16.5.643)
10. Weeber EJ, Jiang YH, Elgersma Y, Varga AW, Carrasquillo Y, Brown SE, et al. Derangements of hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in a mouse model for Angelman mental retardation syndrome. *Neuroscience* 2003;23:2634-44. doi: [10.1523/jneurosci.23-07-02634.2003](https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-07-02634.2003)
11. Zha X-m, Dailey ME, Green SH. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spine remodeling during epileptiform activity in vitro. *J Neurosci Res* 2009;87:1969-79. doi: [10.1002/jnr.22033](https://doi.org/10.1002/jnr.22033)
12. Ebrahimi F, Sadr SS, Roghani M, Khamse S, Haftcheshmeh SM, Mojdeh Navid Hamidi, et al. Assessment of the protective effect of KN-93 drug in systemic epilepsy disorders induced by pilocarpine in male rat. *J Cell Biochem* 2019;120:15906-14. doi: [10.1002/jcb.28864](https://doi.org/10.1002/jcb.28864)
13. Liu X-B, Murray KD. Neuronal excitability and calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II: Location, location, location. *J. Cell. Biochem* 2012;53:45-52. doi: [10.1111/j.1528-1167.2012.03474.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03474.x)
14. Lie AA, Blümcke I, Beck H, Schramm J, Wiestler OD, Elger CE. Altered patterns of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and calcineurin immunoreactivity in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 1998;57:1078-88. doi: [10.1097/00005072-199811000-00011](https://doi.org/10.1097/00005072-199811000-00011)
15. Kocaadam B, Sanlier N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017;57:2889-95. doi: [10.1080/10408398.2015.1077195](https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077195)
16. Kumar V, Prakash C, Singh R, Sharma D. Curcumin's antiepileptic effect, and alterations in Na(v)1.1 and Na(v)1.6 expression in iron-induced epilepsy. *Epilepsy Res* 2019;150:7-16. doi: [10.1016/j.eplepsyres.2018.12.007](https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.12.007)
17. Akula KK, Kulkarni SK. Effect of curcumin against pentylenetetrazol-induced seizure threshold in mice: possible involvement of adenosine A1 receptors. *Phytother Res* 2014;28:714-21. doi: [10.1002/ptr.5048](https://doi.org/10.1002/ptr.5048)
18. Arbabi Jahan A, Rad A, Ghanbarabadi M, Amin B, Mohammad-Zadeh M. The role of serotonin and its receptors on the anticonvulsant effect of curcumin in pentylenetetrazol-induced seizures. *Life Sci* 2018;211:252-60. doi: [10.1016/j.lfs.2018.09.007](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.09.007)
19. Choudhary KM, Mishra A, Poroikov VV, Goel RK. Ameliorative effect of Curcumin on seizure severity, depression like behavior, learning and memory deficit in post-pentylenetetrazole-kindled mice. *Eur J Pharmacol* 2013;704:33-40. doi: [10.1016/j.ejphar.2013.02.012](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.02.012)
20. Kiasalari Z, Roghani M, Khalili M, Rahmati B, Baluchnejadmojarad T. Antiepileptogenic effect of curcumin on kainate-induced model of temporal lobe epilepsy. *Pharm Biol* 2013;51:1572-8. doi: [10.3109/13880209.2013.803128](https://doi.org/10.3109/13880209.2013.803128)
21. Du P, Tang HY, Li X, Lin HJ, Peng WF, Ma Y, et al. Anticonvulsive and antioxidant effects of curcumin on pilocarpine-induced seizures in rats. *Chin Med J* 2012;125:1975-9. doi: [10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.11.025](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.11.025)
22. Kaur H, Bal A, Sandhir R. Curcumin supplementation improves mitochondrial and behavioral deficits in experimental model of chronic epilepsy. *Pharmacol Biochem Beha* 2014;125:55-64. doi: [10.1016/j.pbb.2014.08.001](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.08.001)
23. Sumanont Y, Murakami Y, Tohda M, Vajragupta O, Watanabe H, Matsumoto K. Effects of manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin on kainic acid-induced neurotoxic responses in the rat hippocampus. *Biol Pharm Bul* 2007;30:1732-9. doi: [10.1248/bpb.30.1732](https://doi.org/10.1248/bpb.30.1732)
24. Drion CM, Borm LE, Kooijman L, Aronica E, Wadman WJ, Hartog AF, et al. Effects of rapamycin and curcumin treatment on the development of epilepsy after electrically induced status epilepticus in rats. *Epilepsia* 2016;57:688-97. doi: [10.1111/epi.13345](https://doi.org/10.1111/epi.13345)
25. Tønnesen HH. Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactant solutions. *Studies of curcumin and curcuminoids, XXVIII. Pharmazie* 2002;57:820-4. doi: [10.1007/978-0-387-46401-5_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_1)
26. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Bio* 2007;595:1-75. doi: [10.1007/978-0-387-46401-5_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_1)
27. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 2008;75:787-809. doi: [10.1016/j.bcp.2007.08.016](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.08.016)
28. Flora G, Gupta D, Tiwari A. Nanocurcumin: a promising therapeutic advancement over native curcumin. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2013;30:331-68. doi: [10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.2013007236](https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.2013007236)
29. Hashemian M, Anissian D, Ghasemi-Kasman M, Akbari A, Khalili-Fomeshi M, Ghasemi S, et al. Curcumin-loaded chitosan-alginate-STPP nanoparticles ameliorate memory deficits and reduce glial activation in pentylenetetrazol-induced kindling model of epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2017;79:462-71. doi: [10.1016/j.pnpbp.2017.07.025](https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.07.025)
30. Agarwal NB, Jain S, Nagpal D, Agarwal NK, Mediratta PK, Sharma KK. Liposomal formulation of curcumin attenuates seizures in different experimental models of epilepsy in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2013;27:169-72. doi: [10.1111/j.1472-8206.2011.01002.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2011.01002.x)
31. Moezi L, Ashjazadeh N, Rezapanah S, Pirsalami F, Esmaili Z, Soukhaklari R, et al. Anticonvulsant effect of acute curcumin nanoparticle on pentylenetetrazole-induced seizures in mice: non-involvement of jnk restoration. *Physiology and Pharmacology (Iran)* 2021;25:36-46. doi: [10.32598/ppj.25.1.80](https://doi.org/10.32598/ppj.25.1.80)
32. Aniesrani Delfiya DS, Thangavel K, Amirtham D. Preparation of Curcumin Loaded Egg Albumin Nanoparticles Using Acetone and Optimization of Desolvation Process. *Protein n* 2016;35:124-35. doi: [10.1007/s10930-016-9652-3](https://doi.org/10.1007/s10930-016-9652-3)
33. Jithan A, Madhavi K, Madhavi M, Prabhakar K. Preparation and characterization of albumin nanoparticles encapsulating curcumin intended for the treatment of breast cancer. *Int J Pharm Investig* 2011;1:119-25. doi: [10.4103/2230-973x.82432](https://doi.org/10.4103/2230-973x.82432)
34. Kim TH, Jiang HH, Youn YS, Park CW, Tak KK, Lee S, et al. Preparation and characterization of water-soluble albumin-bound curcumin nanoparticles with improved antitumor activity. *Int J Pharm* 2011;403:285-91. doi: [10.1016/j.ijpharm.2010.10.041](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.041)

35. SoukhakLari R, Moezi L, Pirsalami F, Moosavi M. The Effect of BSA-Based Curcumin Nanoparticles on Memory and Hippocampal MMP-2, MMP-9, and MAPKs in Adult Mice. *J Mol Neurosci* 2018;65:319-26. doi: 10.1007/s12031-018-1104-4
36. Niknejad H, Mahmoudzadeh R. Comparison of Different Crosslinking Methods for Preparation of Docetaxel-loaded Albumin Nanoparticles. *Iran J Pharm Res.* 2015;14:385-94. doi :
37. Sookhaklari R, Geramizadeh B, Abkar M, Moosavi M. The neuroprotective effect of BSA-based nanocurcumin against 6-OHDA-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Avicenna J Phytomed* 2019;9:92-100. doi: 10.32598/bcn.9.10.255
38. SoukhakLari R, Moezi L. Curcumin-Loaded BSA Nanoparticles Protect More Efficiently Than Natural Curcumin Against Scopolamine-Induced Memory Retrieval Deficit. *Basic Clin Neurosci* 2019;10:157-64. doi: 10.32598/bcn.9.10.255
39. SoukhakLari R, Moezi L, Pirsalami F, Moosavi M. The Effect of BSA-Based Curcumin Nanoparticles on Memory and Hippocampal MMP-2, MMP-9, and MAPKs in Adult Mice. *J Mol Neurosci* 2018;65:319-26. doi: 10.1007/s12031-018-1104-4
40. Kupferberg H. Animal models used in the screening of antiepileptic drugs. *Epilepsi* 2001;42 Suppl 4:7-12.
41. Löscher W, Fiedler M. The role of technical, biological, and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. VII. Seasonal influences on anticonvulsant drug actions in mouse models of generalized seizures. *Epilepsy Res* 2000;38:231-48. doi: 10.1016/s0920-1211(99)00095-9
42. Löscher W, Lehmann H. L-deprenyl (selegiline) exerts anticonvulsant effects against different seizure types in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277:1410-7.
43. Shafaroodi H, Moezi L, Ghorbani H, Zaeri M, Hassanpour S, Hassanipour M, et al. Sub-chronic treatment with pioglitazone exerts anti-convulsant effects in pentylenetetrazole-induced seizures of mice: The role of nitric oxide. *Brain Res Bull* 2012;87:544-50. doi: 10.1016/j.brainresbull.2012.02.001
44. Nam SM, Kwon HJ, Kim W, Kim JW, Hahn KR, Jung HY, et al. Changes of myelin basic protein in the hippocampus of an animal model of type 2 diabetes. *Lab. Anim. Res* 2018;34:176-84. doi: 10.5625/lar.2018.34.4.176
45. Xu B, Lang L-M, Li S-Z, Guo J-R, Wang J-F, Wang D, et al. Cortisol Excess-Mediated Mitochondrial Damage Induced Hippocampal Neuronal Apoptosis in Mice Following Cold Exposure. *Cells* 2019;8:612. doi: 10.3390/cells8060612
46. Yun D, Jeon M-T, Kim H-J, Moon GJ, Lee S, Ha CM, et al. Induction of GDNF and GFR α -1 Following AAV1-Rheb(S16H) Administration in the Hippocampus in vivo. *Exp Neurobiol* 2020;29:164-75. doi: 10.5607/en19075
47. Zhu Y, Zhang Q, Zhang W, Li N, Dai Y, Tu J, et al. Protective Effect of 17 β -estradiol upon hippocampal spine density and cognitive function in an animal model of vascular dementia. *Sci Rep* 2017;7:42660-. doi: 10.1038/srep42660
48. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
49. Amiri E, Ghasemi R, Moosavi M. Agmatine Protects Against 6-OHDA-Induced Apoptosis, and ERK and Akt/GSK Disruption in SH-SY5Y Cells. *Cell Mol Neurobiol* 2016;36:829-38. doi: 10.1007/s10571-015-0266-7
50. Moosavi M, Abbasi L, Zarifkar A, Rastegar K. The role of nitric oxide in spatial memory stages, hippocampal ERK and CaMKII phosphorylation. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;122:164-72. doi: 10.1016/j.pbb.2014.03.021
51. Rein MJ, Renouf M, Cruz-Hernandez C, Actis-Goretta L, Thakkar SK, da Silva Pinto M. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br J Clin Pharmacol* 2013;75:588-602. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x
52. Scheepens A, Tan K, Paxton JW. Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. *Genes Nutr* 2010;5:75-87. doi: 10.1007/s12263-009-0148-z
53. Wahlstrom B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1978;43:86-92. doi: 10.1111/j.1600-0773.1978.tb02240.x
54. Rogawski MA. Molecular targets versus models for new antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res* 2006;68:22-8. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2005.09.012
55. Huang RQ, Bell-Horner CL, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, Dillon GH. Pentylenetetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:986-95.
56. Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 2011;20:359-68. doi: 10.1016/j.seizure.2011.01.003
57. Mandhane SN, Aavula K, Rajamannar T. Timed pentylenetetrazol infusion test: a comparative analysis with s.c.PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice. *Seizure* 2007;16:636-44. doi: 10.1016/j.seizure.2007.05.005
58. Khadrawy YA, Sawie HG, Hosny EN. Neuroprotective effect of curcumin nanoparticles against rat model of status epilepticus induced by pilocarpine. *J Complement Integr Med* 2018;15. doi: 10.1515/jcim-2017-0117
59. McNamara JO, Huang YZ, Leonard AS. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Sci STKE* 2006;2006:re12. doi: 10.1126/stke.3562006re12
60. Lie AA, Sommersberg B, Elger CE. Analysis of pThr286-CaMKII and CaMKII immunohistochemistry in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 2005;67:13-23. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2005.06.009
61. Ghosh A, Greenberg ME. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 1995;268:239-47. doi: 10.1126/science.7716515
62. Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 1988;11:465-9. doi: 10.1016/0166-2236(88)90200-7
63. Delorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther* 2005;105:229-66. doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.10.004
64. Carter DS, Haider SN, Blair RE, Deshpande LS, Sombati S, DeLorenzo RJ. Altered calcium/calmodulin kinase II activity changes calcium homeostasis that underlies epileptiform activity in hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319:1021-31. doi: 10.1124/jpet.106.110403
65. Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* 2012;13:169-82. doi: 10.1038/nrn3192
66. Mayadevi M, Sherin DR, Keerthi VS, Rajasekharan KN, Omkumar RV. Curcumin is an inhibitor of calcium/calmodulin dependent protein kinase II. *Bioorg Med Chem* 2012;20:6040-7. doi: 10.1016/j.bmc.2012.08.029



The Effect of Oral Nanocurcumin on Intraperitoneal Pentylentetrazole-Induced Convulsion and CaMKII Phosphorylation Pattern in the Hippocampus of Male Mice

Leila Moezi (Ph.D.)¹, Fatema Pirsalami (Ph.D.)¹, Zahra Esmaili (Ph.D.)^{2,3}, Maryam Moosavi (Ph.D.)^{4*}

1- Dept. of Pharmacology, Medical School, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

2- Shiraz Neuroscience Research Centre, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

3- Neuroscience Research Centre, Neuropharmacology Institute, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

4- Nanomedicine and Nanobiology Research Centre, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Received: 22 August 2022, Accepted: 31 October 2023

Abstract:

Introduction: Previous studies have shown that converting curcumin into nanoparticles can enhance its therapeutic effect in models of convulsion. Changes in calmodulin-dependent Ca²⁺/protein kinase (CaMKII) are associated with some experimental models of epilepsy. This study aimed to evaluate the hippocampal CaMKII phosphorylation following the therapeutic effect of nanocurcumin in a model of pentylentetrazole (PTZ)-induced convulsion.

Methods: Nanocurcumin (with an average particle diameter of 150 nm) was produced using bovine serum albumin and was administered orally (gavage) to male NMRI mice weighing 25-30 g at doses of 50 and 100 mg/kg. One hour later, PTZ at a dose of 85 mg/kg was administered intraperitoneally to the animal. Following intraperitoneal PTZ injection, the latency of myoclonus, clonus, general tonic convulsion, and mortality rate were recorded in male mice. After behavioral testing, the anesthetized animals were euthanized, and the levels of phosphorylated and total forms of hippocampal CaMKII were determined by Western blotting technique.

Results: The results showed that oral administration of nanocurcumin at doses of 50 and 100 mg/kg significantly improved convulsion induced by PTZ compared with natural curcumin. In all groups, convulsion increased hippocampal CaMKII phosphorylation, and nanocurcumin did not modulate it.

Conclusion: The findings of this study showed that the therapeutic effect of nanocurcumin in a model of pentylentetrazole-induced convulsion was not associated with a change in hippocampal CaMKII activity pattern.

Keyword: Convulsion, Pentylentetrazole, Nanocurcumin, Calcium-dependent protein kinase II / calmodulin, Mice.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: M. Moosavi, Email: maryammoosavi@sums.ac.ir

Citation: Moezi L, Pirsalami F, Esmaili Z, Moosavi M. The effect of oral nanocurcumin on intraperitoneal pentylentetrazole-induced convulsion and CaMKII phosphorylation pattern in the hippocampus of male mice. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;18(3):1-9.

