

## بررسی تاثیرات عصاره ی روغنی رازیانه ی رومی بر هیپوکمپ موش صحرایی به دنبال تشنجات منتشر

## The Effects of Anise Oil on the Rat Hippocampus after Generalized Seizures

فاطمه عطاری<sup>۱</sup>، احمد لطفی نیا<sup>۱،۲</sup>، میلاد احمدی<sup>۱،۲</sup>، علی حافظی<sup>۱</sup>، احمد لطفی نیا<sup>۱،۲</sup>، میلاد احمدی<sup>۱،۲</sup>، علی حافظی<sup>۱</sup>، احمد لطفی نیا<sup>۱،۲</sup>، میلاد احمدی<sup>۱،۲</sup>، علی حافظی<sup>۱</sup>

1. Shefa Neuroscience Research Center, Tehran, Iran.

2. Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Islamic Azad University, Karaj, Iran.

۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، تهران، ایران.  
۲. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران.

## چکیده

اطلاعات مقاله

دریافت: ۳ اسفند ۱۳۹۱

پذیرش: ۱۷ فروردین ۱۳۹۲

## کلید واژه:

صرع،

گیاهان،

تشنج،

مغز.

**مقدمه** امروزه داروهای گیاهی به واسطه ی غیر تهجمی بودن و عوارض جانبی اندک در درمان بیماری های بسیاری استفاده می شوند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر عصاره ی روغنی رازیانه ی رومی بر آسیب های هیپوکمپ به دنبال تشنجات منتشر می باشد. **مواد و روش ها** عصاره ی رازیانه قبل از القا تشنج در موش های صحرایی استفاده شد. دوزهای متفاوت عصاره ی رازیانه قبل از القا حملات تشنجی استفاده شد. **یافته ها** عصاره ی رازیانه علاوه بر کاهش شدت تشنجات، آسیب های هیپوکمپ را در تمام گروه های درمان شده به حداقل رسانید. **نتیجه گیری** یافته های این مطالعه عصاره رازیانه را به عنوان یک درمان بالقوه در صرع منتشر پیشنهاد می نماید.

## Article info:

Received: 21 Feb. 2013

Accepted: 6 Apr. 2013

## ABSTRACT

**Introduction** Today herbal therapy has been developed as a non-invasive and less side effect treat for a variety of diseases. This study was aimed to evaluate the effect of anise oil on the hippocampal damages followed by generalized seizures. **Materials & Methods** Anise oil was applied before seizure induction in rats. Anise oil was administered at different doses before induction of seizure attacks. **Results** Anise oil reduced seizure severity and decreased hippocampal injuries in all treated groups. **Conclusion** our findings suggest that anise oil may be a potential therapy in the generalized epilepsy.

## Key words:

Epilepsy,  
Plants,  
Seizures,  
Brain.

## \* Corresponding Author:

Ali Hafezi

E-mail: hafezia87@yahoo.com

## • نویسنده مسئول:

علی حافظی

Hafezia87@yahoo.com: آدرس الکترونیکی

## مقدمه

طب سنتی بدست آمده از مقالات پزشکی باستانی و قرون وسطی یا طب گیاهی نقش مهمی را در توسعه داروهای جدید بازی می کند (۱). تحقیق در مورد داروهای جدید بدست آمده از گیاهان منجر به کشف تعدادی از داروهای مفید بالینی شده که در طی دو دهه ی اخیر نقش عمده ای را در درمان برخی بیماری ها بازی کرده و به فهم ما از پاتوفیزیولوژی آنها کمک کرده اند (۲).

رازیانه ی رومی (*Pimpinella anisum*) یک گیاه گلدار از خانواده ی چتریان بوده که به عنوان یک دارو، دارای شهرت قابل توجهی در طب سنتی است. رازیانه ی رومی در منطقه ی مدیترانه ی شرقی و آسیای جنوبی یک داروی بومی است و ترکیبات متنوع این گیاه از مناطق جغرافیایی گزارش شده است (۳). ترکیبات عمده ی رازیانه ی رومی ترانس-آنتول، استراگول و پانیس آلدئید می باشد (۴). مصرف مقدار ناچیز روغن دانه ی رازیانه ی رومی باعث تهوع، استفراغ، تشنج و ادم ریوی می شود (۵). عصاره ی رازیانه امروزه به عنوان یک ترکیب در درمان سرفه استفاده می شود و خواص ادرارآور و تعریق زایی آن نیز گزارش شده است. این دارو همچنین به عنوان یک داروی ضد نفخ، ضد عفونی کننده، ضد اسپاسم، خلط آور، محرک و اشتهاآور استفاده شده است (۶). به علاوه این گیاه برای تقویت شیردهی در مادران شیرده و به عنوان یک دارو در برابر استرس، برونشیت و سوء هاضمه استفاده شده است. در طب سنتی ایرانی، گیاه و به ویژه اسانس آن برای درمان بعضی از بیماری های عصبی مثل تشنج و صرع استفاده می شود (۷، ۸). بر اساس طب سنتی ایران، اسانس رازیانه ی رومی همچنین دارای اثرات محافظت کننده در برابر بیماری های مغزی عروقی می باشد (۹).

تنها چند مطالعه به اثرات احتمالی این گیاه روی فعالیت نورونی اشاره کرده است. عصاره ی استخراج شده از برگ ها و ساقه های گیاه رازیانه شروع حمله های تشنجی القا شده به وسیله ی پنتیلن تترازول (PTZ) و یا شوک الکتریکی را در موش های نر به تعویق انداخته است (۱۰). تزریق داخل صفاقی عصاره ی رازیانه ی رقیق شده در روغن کنجد با غلظت ۱ - ۰/۲۵ سی سی به ازای هر کیلوگرم وزن موش، آستانه ی تشنجات کلونیک القا شده با PTZ را بالا برده است (۱۱). همچنین افزایش زمان خواب ایجاد شده با پنتوباریتال در موش های درمان شده با عصاره ی رازیانه گزارش شده است (۵). هدف از مطالعه ی بررسی اثرات ضد تشنجی و محافظتی عصاره ی رازیانه رومی می باشد.

## مواد و روش ها

## حیوانات

موش های صحرایی نر بالغ با وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم در شرایط

استاندارد از نظر دسترسی به آب و مواد غذایی، نور (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)، رطوبت (۵۵-۵۰ درصد) و حرارت  $22 \pm 2$  درجه ی سانتی گراد نگهداری شدند. همه ی آزمایشات بر طبق اساسنامه ی تصویب شده توسط کمیته ی اخلاقی حیوانات مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، تهران، ایران انجام شد.

حیوانات به صورت تصادفی به گروه های زیر تقسیم شدند:

- **گروه کنترل:** در حیوانات این گروه هیچگونه مداخله ی جراحی یا ثبت نوار مغزی (EEG) انجام نشد. مغزها خارج شده و مطالعات بافتی انجام گردید.
- **گروه شم:** حیوانات این گروه جراحی شدند و الکترودها روی لایه ی سخت شامه ی پرده ی مغزی کاشته شدند و نوار مغزی ثبت شد. در پایان کار، مغزها خارج شده و مطالعات بافتی انجام شد.
- **گروه PTZ:** الکترودها به مانند گروه شم کاشته شده و جریان الکتریکی مغزی قبل و بعد از تزریق PTZ ثبت شد. در نهایت مغزها خارج شده و مطالعات بافتی انجام شد.
- **گروه های درمان (Pi 1، Pi 2، Pi 3):** جراحی و کاشت الکترودها مانند گروه PTZ انجام شد. حیوانات این گروه با سه دوز ۱، ۲ و ۳ میلی لیتر بر کیلوگرم از عصاره ی رازیانه ی محلول در اتانول، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق PTZ به صورت تزریق داخل صفاقی درمان شدند.

## ثبت الکتریکی مغز و تزریق PTZ

الکترودهای ثبت از طریق دستگاه استریوتاکس روی سخت شامه ی کورتکس حسی چپ و راست حیوان تحت داروی بیهوشی داخل صفاقی اورتان (1.2 g/kg) کاشته شدند. امواج مغزی دریافت شده توسط آمپلی فایبر (EXT-02F, NPI, Germany) تقویت شده و به وسیله ی یک اسپیلوسکوپ دیجیتال ذخیره شد. ثبت های الکتریکی مغز برای ۳۰ دقیقه قبل (کنترل) و یک ساعت بعد از تزریق (20 mg/kg) PTZ داخل صفاقی محلول در سالین انجام شدند (۱۲). نهفتگی (latency)، استمرار (duration)، دامنه و فرکانس اسپایک ها با استفاده از نرم افزار Axo Scope 10.2 اندازه گیری شدند.

## مطالعات بافتی

یک ساعت بعد از اتمام ثبت نوار مغزی، تمامی موش های صحرایی با دوز بالایی از اورتان بیهوش شدند و با ۱۰۰ سی سی سالین و به دنبال آن محلول فیکساتیو (گلو تار آلدئید ۱/۲۵ درصد و پارا فرمالدهید ۱ درصد در بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=۷/۴ از طریق قلب حیوان پرفیوژ شدند (۱۴، ۱۳). مغزها بعد از پرفیوژن خارج شده و در

۰/۰۵ گزارش شد.

### یافته ها

#### اثر روغن رازیانه بر روی تشنج های ایجاد شده با PTZ

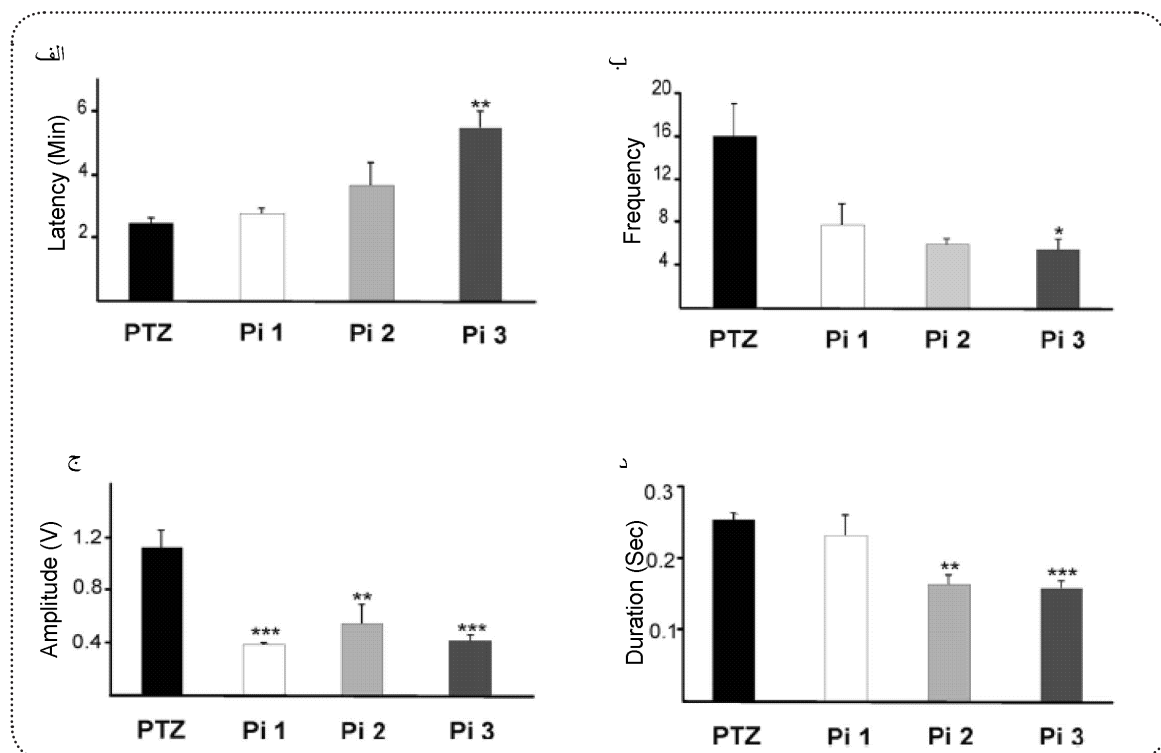
تزریق داخل صفاقی PTZ با غلظت 120 mg/kg تشنج های کلونیک را در تمام موش های صحرایی بیهوش ایجاد کرد. شروع تشنج ها بعد از  $0/18 \pm 2/4$  دقیقه در گروه PTZ رخ داد. تشنج القا شده به وسیله ی PTZ به طور مشخص با لگدهای اندام تحتانی شروع شده و با تشنجات تونیک کلونیک منتشر در تمام بدن موش های صحرایی ادامه یافت. جریان الکتریکی مغز برای تایید رخداد تشنج کنترل می شد. تخلیه های الکتریکی انفجاری صرعی در ضمن حملات تشنجی در نوار مغزی مشاهده شدند. فرکانس، دامنه و استمرار این پتانسیل ها در گروه PTZ به ترتیب  $250 \pm 10$  در هر دقیقه،  $1100 \pm 110$  میکرو ولت و  $10 \pm 250$  میلی ثانیه بودند (نمودار ۱).

محلول فیکساتیو نگهداری شدند. مقاطع کرونال با ضخامت ۱۰ میکرومتر به فاصله ی ۱۰۰ میکرومتر  $2/3$  تا  $4/3$  میلی متر پشت برگما برش داده شدند (۱۵). مقاطع با کریزل ویولت رنگ آمیزی شدند. لام ها با میکروسکوپ نوری مشاهده شده و با دوربین دیجیتال از مناطق CA1 و CA3 هر دو نیمکره عکس گرفته شد. نورون های تیره (Dark neurons) با استفاده از نرم افزار Image Tools 2 شمارش شدند (۱۳).

عصاره رازیانه از شرکت Caelo خریداری شد و در اتانول حل شد. غلظت نهایی اتانول کمتر از ۰/۱ درصد بود. داروی PTZ نیز از شرکت سیگما خریداری شد.

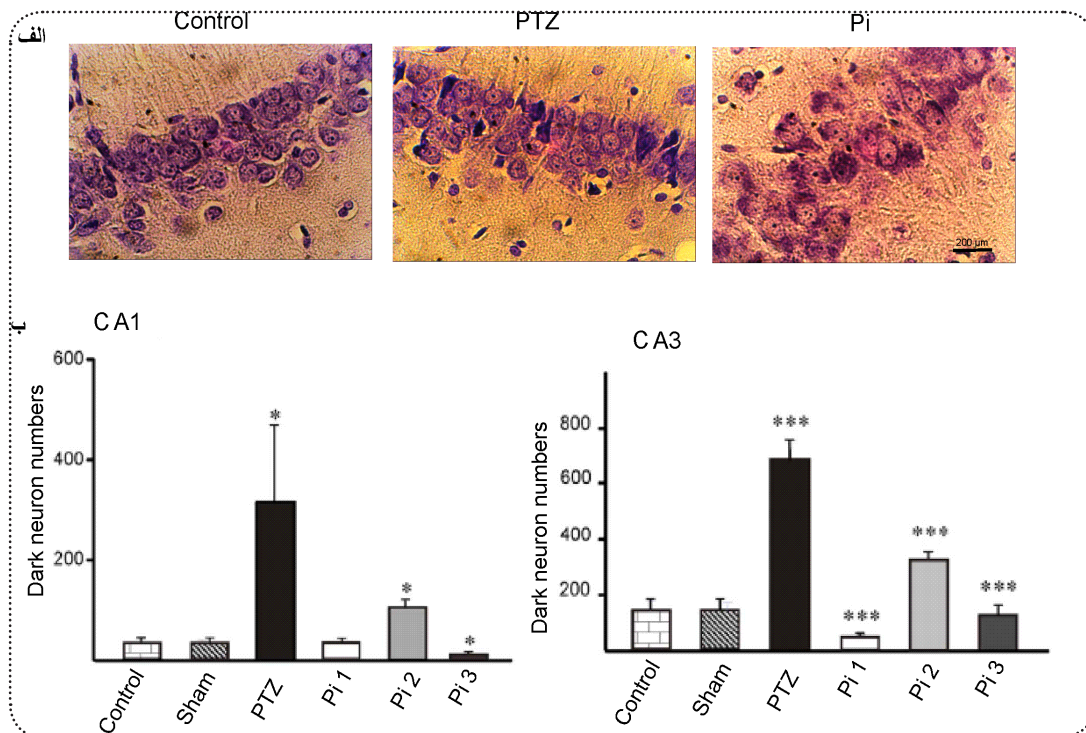
### آنالیز آماری

تمام اطلاعات به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد گزارش شدند. اطلاعات از نظر آماری با استفاده از آزمون ANOVA و تست تعقیبی Tukey آنالیز شدند. معنی داری با ارزش کمتر از



### نمودار

نمودار ۱. تاثیر تزریق عصاره ی رازیانه بر تشنجات القا شده با PTZ. الف) زمان نهفتگی تشنجات در گروه های مختلف به صورت Mean  $\pm$  S.E.M. نمایش داده شده است. همانطور که مشهود است زمان نهفتگی تشنجات در گروه Pi 3 نسبت به گروه PTZ افزایش معنی داری یافته است. ب) فرکانس تشنجات در گروه های مختلف به صورت Mean  $\pm$  S.E.M. نمایش داده شده است. همانطور که مشهود است فرکانس تشنجات در گروه Pi 3 نسبت به گروه PTZ کاهش معنی داری یافته است. ج) دامنه تشنجات در گروه های مختلف به صورت Mean  $\pm$  S.E.M. نمایش داده شده است. دامنه تشنجات در هر سه گروه Pi 1 و Pi 2، نسبت به گروه PTZ کاهش معنی داری یافته است. د) استمرار تشنجات در گروه های مختلف به صورت Mean  $\pm$  S.E.M. نمایش داده شده است. استمرار تشنجات در هر دو گروه Pi 2 و Pi 3 نسبت به گروه PTZ کاهش معنی داری یافته است. \*، \*\* و \*\*\* به ترتیب نمایانگر  $P < 0/05$ ،  $P < 0/01$  و  $P < 0/001$  می باشد.



**تصویر ۱:** تاثیر عصاره ی رازیانه بر حفاظت نورون ها در برابر تشنج القا شده با PTZ. (الف) تصاویر گرفته شده از منطقه هیپوکمپ به کمک میکروسکوپ نوری در گروه های مختلف. (ب) تعداد نورون های تیره در مناطق CA1 و CA3 به صورت  $Mean \pm S.E.M$  نمایش داده شده است. میانگین تعداد نورون های تیره در گروه PTZ افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل و شم یافته است. همچنین میانگین تعداد نورون های تیره در دو گروه Pi نسبت به گروه PTZ کاهش یافته است. \* و \*\*\* به ترتیب نمایانگر  $P < 0.05$  و  $P < 0.001$  می باشد.

معنی داری بعد از تزریق عصاره ی رازیانه در مقایسه ی با گروه های کنترل، شم و PTZ کاهش یافت.

میانگین تعداد نورون های تیره در منطقه ی CA1 گروه کنترل:  $4 \pm 24$ ، گروه شم:  $5 \pm 33$  و گروه PTZ:  $15 \pm 316$  بود (تصویر ۱: ب). تزریق PTZ تراکم نورون های تیره را در منطقه ی CA1 هیپوکمپ افزایش داد ( $P < 0.05$ ). تزریق ۲ و ۳ میلی لیتر بر کیلوگرم عصاره ی رازیانه به طور معنی داری تولید نورون های تیره ی تولید شده با PTZ ( $18 \pm 104$ ) را در این منطقه ی مغزی کاهش داد. میانگین تعداد نورون های تیره در گروه های Pi 2 و Pi 3 به ترتیب  $9 \pm 25$  و  $7 \pm 10$  می باشد.

میانگین تعداد سلول های تیره در منطقه ی CA3 هیپوکمپ در گروه های کنترل، شم و PTZ به ترتیب  $11 \pm 112$ ،  $36 \pm 140$  و  $77 \pm 688$  بود (تصویر ۱: ب). تعداد نورون های تیره در منطقه ی CA3 درمان شده با PTZ به طور معنی داری بالاتر از گروه های کنترل و شم بود. عصاره ی رازیانه از تولید نورون های تیره با تزریق PTZ جلوگیری کرد. تزریق عصاره ی رازیانه در غلظت های ۱، ۲ و ۳ میلی لیتر بر کیلوگرم قبل از تزریق PTZ میانگین

تزریق عصاره ی رازیانه در غلظت های ۱ یا ۲ میلی لیتر بر کیلوگرم تغییری در نهفتگی حمله های تشنجی بعد از تزریق PTZ نداشت. اما عصاره ی رازیانه در غلظت ۳ میلی گرم بر کیلوگرم طول تشنج را به طور معنی داری به  $0.49 \pm 5/43$  بعد از تزریق PTZ می رساند (نمودار ۱: الف).

عصاره ی رازیانه در تمام غلظت های متفاوت به طور معنی داری فرکانس، دامنه و استمرار تخلیه های الکتریکی انفجاری صرعی را به ترتیب به  $0.57 \pm 6$  و  $2/2 \pm 7/66$  و  $2/9 \pm 5/33$  در هر دقیقه کاهش داد. (نمودار ۱: ب-د). دامنه ی پتانسیل های شبه صرعی در هر سه گروه درمان شده با ۱، ۲ و ۳ میلی لیتر بر کیلوگرم عصاره ی رازیانه به ترتیب به  $14 \pm 501$ ،  $11 \pm 298$  و  $30 \pm 318$  میکرو ولت کاهش یافت.

#### اثر عصاره ی رازیانه بر روی تولید نورون های تیره

نورون های تیره با چروکیدگی نورونی، سیتوپلاسم اتوزینوفیلی، از بین رفتن هسته و اسفنجی شدن محیط شناسایی شدند. تراکم نورون های تیره در مناطق CA1 و CA3 هیپوکمپ به طور

وسیع، رهایی گلوتامات و افزایش کلسیم داخل سلولی به دلیل تشنج ایجاد شده با PTZ سبب مرگ سلولی می شود. در مطالعه ی فعلی، عصاره ی رازیانه با مهار حمله های تشنجی از تولید نورون های تیره جلوگیری کرده و به عنوان یک محافظت کننده از سیستم عصبی عمل نموده است (۲۷).

مطالعه ی فعلی نشان می دهد که اثرات محافظت کننده از سیستم عصبی و ضد تشنجی عصاره ی رازیانه احتمالاً از طریق مهار فعالیت های سیناپسی می باشد. مطالعات بیشتری مورد نیاز است تا عامل اصلی این اثرات و مکانیسم دقیق عمل آنها مورد ارزیابی قرار گیرد.

#### منابع

1. Müller M, Pape H-C, Speckmann E-J, Gorji A. Effect of eugenol on spreading depression and epileptiform discharges in rat neocortical and hippocampal tissues. *Neurosci*. 2006; 140(2): 743-5.
2. Gorji A. Pharmacological treatment of headache using traditional Persian medicine. *Trends Pharmacol Sci*. 2003; 24(7): 331-4.
3. Orav A, Raal A, Arak E. Essential oil composition of *Pimpinella anisum* L. fruits from various European countries. *Nat Prod Res*. 2008; 22(3): 227-32.
4. Tabanca N, Ma G, Pasco DS, Bedir E, Kirimer N, Baser K, et al. Effect of essential oils and isolated compounds from *Pimpinella* species on NF- $\kappa$ B: a target for antiinflammatory therapy. *Phytother Res*. 2007; 21(8): 741-5.
5. European Scientific Cooperative on Phytotherapy, *Urticae radi*. Exeter, UK: ESCOP, Monographs on the Uses of Plant Drugs; 1996-1999: Fascicle 1ul-Fascicle 6ul.
6. Simon J, Chadwick A, Craker L. The scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone. *Archon Book Hauden*. 1984; 770.
7. Gorji A, Khaleghi Ghadiri M. History of epilepsy in Medieval Iranian medicine. *Neurosci Biobehav R*. 2001; 25(5): 455-61.
8. Khaleghi Ghadiri M, Tutam Y, Wassmann H, Speckmann E-J, Gorji A. Periodic fasting alters neuronal excitability in rat neocortical and hippocampal tissues. *Neurobiol Dis*. 2009; 36(2): 384-92.

تعداد نورون های تیره در منطقه ی CA3 را به ترتیب  $45 \pm$ ،  $36 \pm 128$  و  $36 \pm 48$  کاهش داد.

#### بحث و نتیجه گیری

یافته های ما تاثیر عصاره ی رازیانه را بر روی محافظت نورون ها در برابر تشنج القا شده با PTZ نشان داد. یافته ها نشان می دهند که درمان با عصاره ی رازیانه، نهفتگی حملات تشنجی را به طور چشمگیری افزایش داده است. همچنین دامنه و استمرار تخلیه های الکتریکی انفجاری صرعی کاهش یافته است. به علاوه درمان با عصاره ی رازیانه، کاهش قابل توجهی را در تولید نورون های تیره به دنبال حملات تشنجی آشکار کرد.

در راستای این نتایج، اثرات ضد صرعی عصاره ی رازیانه در مدل های متفاوت حیوانی مبتلا به صرع گزارش شدند (۱۶). اثرات ضد تشنجی عصاره ی رازیانه در مدل حیوانی PTZ یا شوک الکتریکی نشان داده شده است. همچنین اثرات ضد تشنجی عصاره رازیانه در مدل صرعی پیکروتوکسین گزارش شده است (۱۱). از طرف دیگر بعضی از داروهای ضد تشنجی مثل بنزودیازپین ها تخلیه های الکتریکی انفجاری صرعی را در نورون های حلزون تحریک می کنند (۱۷).

اثرات ضد تشنجی روغن رازیانه ممکن است به علت فعالیت گیرنده های  $GABA_A$  باشد (۱۸). مطالعات نشان داده اند که عصاره ی رازیانه می تواند با تاثیر بر روی گیرنده های اپیوئیدی به واسطه ی فعال کردن گیرنده های  $GABA_A$  اثرات مهاری القا نماید. به علاوه دیده شده که عصاره ی رازیانه سبب تقویت فعالیت پمپ  $Na^+/K^+ ATPase$  می گردد (۲۰، ۱۹). این پمپ نقش مهمی را در تنظیم تحریک پذیری نورونی بازی می کند و کاهش فعالیت پمپ نقش مهمی در ایجاد تخلیه های الکتریکی انفجاری صرعی ایفا می نماید. همچنین مهار فعالیت این پمپ، پتانسیل های پس سیناپسی مهاری گیرنده های  $GABA_A$  و  $GABA_B$  را تغییر می دهد (۲۱).

جزء اصلی عصاره رازیانه آنتول ۴-متوکسی فنیل پروپین ( $90 \leq$  درصد) می باشد (۳، ۴). آنتول همچنین یکی از اجزای اصلی برای سنتز پنتوباریتال که یک داروی قوی ضد تشنج است، به شمار می رود (۲۲).

سلول های تیره در نمونه های نوروپاتولوژی بالینی و آزمایشگاهی از بافت عصبی زنده گزارش شده اند (۲۳). در بافت مغزی فیکس شده نورون های تیره در صرع، ایسکمی، هایپوگلیسمی، در معرض قرارگیری با آمینواسیدهای تحریکی و ترومای مکانیکی نورونی نشان داده شده اند (۲۴). گمان می رود که رهایی نوروترانسمیترهای تحریکی مانند گلوتامات و آسپارات و به دنبال آن عبور جریان های یونی از غشا ممکن است به تخریب بافت و تولید نورون های تیره بیانجامد (۲۵، ۲۶). تحریک پذیری

9. Zargari A. Medicinal plants. Tehran University Pub. Tehran; 1992; 2.
10. Abdul-Ghani A-S, El-Lati S, Sacaan A, Suleiman M, Amin R. Anticonvulsant effects of some Arab medicinal plants. *Pharm Biol.* 1987; 25(1): 39-43.
11. Pourgholami M, Majzoob S, Javadi M, Kamalinejad M, Fanaee G, Sayyah M. The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* exerts anticonvulsant effects in mice. *J Ethnopharmacol.* 1999; 66(2): 211-5.
12. File SE. Tolerance to the anti-pentylentetrazole effects of diazepam in the mouse. *Psychopharmacology.* 1983; 79(2-3): 284-6.
13. Bayat M, Hasanzadeh G, BarzroodIpour M, Javadi M. The effect of low protein diet on thalamic projections of hippocampus in rat. *Neuroanatomy.* 2005; 4: 43-8.
14. Gost J, Insausti R, Gonzalo L. Production and characterization of a monoclonal antibody that selectively marks the astrocyte population in the central nervous system. *Rev Med Univ Navarra.* 1992; 38(2): 9-20.
15. Ooigawa H, Nawashiro H, Fukui S, Otani N, Osumi A, Toyooka T, et al. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. *Acta neuropathologica.* 2006; 112(4): 471-81.
16. Karimzadeh F, Hosseini M, Mangeng D, Alavi H, Hassanzadeh GR, Bayat M, et al. Anticonvulsant and neuroprotective effects of *Pimpinella anisum* in rat brain. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 12: 76
17. Faugier-Grimaud S. Action of anticonvulsants on pentylentetrazol - induced epileptiform activity on invertebrate neurones (*Helix aspersa*). *Neuropharmacol.* 1978; 17(11): 905-18.
18. Sahraei H, Ghoshooni H, Hossein Salimi S, Mohseni Astani A, Shafaghi B, Falahi M, et al. The effects of fruit essential oil of the *Pimpinella anisum* on acquisition and expression of morphine induced conditioned place preference in mice. *J ethnopharmacol.* 2002; 80(1): 43-7.
19. Schultz SG, Curran P. Coupled transport of sodium and organic solutes. *Physiol Rev.* 1970; 50(4): 637-718.
20. Crane RK. Na<sup>+</sup> -dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Fed Proc.* 1965; 24(5): 1000-6.
21. Baptiste SL, Tang HM, Kuzniecky RI, Devinsky O, French JA, Ludvig N. Comparison of the antiepileptic properties of transmeningeally delivered muscimol, lidocaine, midazolam, pentobarbital and GABA, in rats. *Neurosci lett.* 2010; 469(3): 421-4.
22. Waumans D, Bruneel N, Tytgat J. Anise oil as parameoxyamphetamine (PMA) precursor. *Forensic Sci Int.* 2003; 133(1): 159-70.
23. Kherani ZS, Auer RN. Pharmacologic analysis of the mechanism of dark neuron production in cerebral cortex. *Acta neuropathologica.* 2008; 116(4): 447-52.
24. Ishida K, Shimizu H, Hida H, Urakawa S, Ida K, Nishino H. Argyrophilic dark neurons represent various states of neuronal damage in brain insults: some come to die and others survive. *Neurosci.* 2004; 125(3): 633-44.
25. Sloviter RS, Dempster DW. "Epileptic" brain damage is replicated qualitatively in the rat hippocampus by central injection of glutamate or aspartate but not by GABA or acetylcholine. *Brain Res Bull.* 1985; 15(1): 39-60.
26. Ankarcrona M, Zhivotovsky B, Holmström T, Diana A, Eriksson JE, Orrenius S, et al. Lamin and [beta]-tubulin fragmentation precede chromatin degradation in glutamate-induced neuronal apoptosis. *Neuroreport.* 1996; 7(15-17): 2659-64.
27. Pavlova T, Stepanichev M, Gulyaeva N. Pentylentetrazole kindling induces neuronal cyclin B1 expression in rat hippocampus. *Neurosci lett.* 2006; 392(1): 154-8.