# Investigation of Anticonvulsant Effects of Concomitant Administration of Melatonin, Magnesium and Zinc in Pentylenetetrazole-Induced Seizures in Mice: With Emphasis on the Path of Oxidative Stress

***Hosseinzadeh A[1], Abbasiyan F[2], Motevalian M[3], Kiani AA[4], Mehrzadi S[5*]***

*1. Assistant Professor, Razi Drug Research Center, Department of Pharmacology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

*2. MD, Department of Pharmacology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

*3. Associate professor, Department of Pharmacology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

*4. Associate Professor, Department of Medical laboratory Sciences ,School of Allied Medical Sciences, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran*

*5. Associate Professor, Razi Drug Research Center, Department of Pharmacology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, sa_mehrzadi@yahoo.com*

Received: *2024/12/24* Accepted: *2025/4/21*

## Abstract

***Background:*** Epilepsy is the second most common neurological disorder globally. Given the high prevalence of epilepsy and its associated challenges, conducting diverse studies to investigate the underlying mechanisms of this disorder is highly valuable and necessary. In this study, the effects of combining melatonin, zinc, and magnesium were investigated for preventing seizures and reducing the duration of seizure attacks.

***Materials and Methods:*** In total, 36 male NMRI mice were randomly assigned to six groups: seizure control, diazepam, melatonin, magnesium, zinc, and the combination of melatonin, zinc, and magnesium. The drugs were administered orally for 14 days. On the 15th day, seizures were induced in the mice using pentylenetetrazol. Latency and duration of seizures were measured in all groups. Mice were euthanized, and their brains were extracted to assess oxidative stress.

***Results:*** The study results indicated that the combination of melatonin, magnesium, and zinc did not significantly increase the latency phase of seizures; however, it significantly reduced the duration of seizures ($P<0.001$). Moreover, this combination significantly prevented the increase in malondialdehyde levels in the brain tissue ($P< 0.05$). It also considerably increased the activity of catalase and superoxide dismutase enzymes, compared to the seizure control group ($P< 0.001$).

***Conclusion:*** Magnesium, zinc, melatonin, and their combination can exert their anti-seizure effects by reducing seizure duration and alleviating seizure–induced oxidative stress in the brain.

***Keywords:*** Magnesium, Melatonin, Oxidative stress, Pharmacology, Seizure, Zinc.

***Citation:*** Hosseinzadeh A, Abbasiyan F, Motevalian M, Kiani AA, Mehrzadi S. Investigation of Anticonvulsant Effects of Concomitant Administration of Melatonin, Magnesium and Zinc in Pentylenetetrazole-Induced Seizures in Mice: With Emphasis on the Path of Oxidative Stress. Yafte. 2025; 27(3):64-77.

***Correspondence Address: Razi Pharmaceutical Sciences Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran.**

**Email: sa_mehrzadi@yahoo.com**

# بررسی اثرات ضدتشنجی تجویز همزمان ترکیب ملاتونین، منیزیم و روی در تشنج ایجاد شده توسط پنتیلن تترازول در موش سوری: با تاکید بر مسیر استرس اکسیداتیو

**اعظم حسین زاده[1]، فائزه عباسیان[2]، منیژه متولیان[3]، علی اصغر کیانی[4]، سعید مهرزادی[5*]**

۱- استادیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲- دکتری عمومی، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳- استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۵- دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

یافته / دوره ۲۷ / شماره ۳ / پاییز ۱۴۰۴ / مسلسل ۱۰۵

## چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۱۴ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۱۲/۱

**مقدمه:** صرع دومین اختلال عصبی شایع در سطح جهان است. با توجه به شیوع بالای صرع و چالش‌های مرتبط با آن، انجام مطالعات مختلف جهت بررسی مکانیسم‌های زیرین این اختلال بسیار ارزشمند و ضروری است. در این مطالعه، اثرات ترکیب ملاتونین، روی و منیزیم بر پیشگیری از تشنج و کاهش مدت زمان حملات تشنج مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** سی و شش موش نر بالغ NMRI به صورت تصادفی به شش گروه تقسیم شدند: گروه کنترل تشنج، دیازپام، ملاتونین، منیزیم، روی و ترکیب ملاتونین، روی و منیزیم. داروها به صورت خوراکی به مدت ۱۴ روز تجویز شدند. در روز ۱۵ام، تشنج‌ها با استفاده از پنتیلن تترازول در موش‌ها ایجاد شد. مدت زمان و تأخیر شروع تشنج‌ها در تمامی گروه‌ها اندازه‌گیری شد. سپس موش‌ها کشته شده و مغز آنها جهت ارزیابی استرس اکسیداتیو استخراج گردید.

**یافته‌ها:** نتایج مطالعه نشان داد که ترکیب ملاتونین، منیزیم و روی تأثیر قابل توجهی بر افزایش مرحله تأخیر تشنج‌ها نداشت، اما مدت زمان تشنج‌ها را به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < ۰/۰۰۱$). علاوه بر این، این ترکیب به طور معنی‌داری از افزایش سطح مالون در الدهید در بافت مغزی پیشگیری کرد ($P < ۰/۰۵$) و همچنین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیس موتاز و کاتالاز را در مقایسه با گروه کنترل تشنج به طور قابل توجهی افزایش داد ($P < ۰/۰۰۱$).

**بحث و نتیجه‌گیری:** منیزیم، روی، ملاتونین و ترکیب آنها می‌توانند اثرات ضد تشنجی خود را با کاهش مدت زمان تشنج‌ها و کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از تشنج‌ها در مغز اعمال کنند.

**واژه‌های کلیدی:** تشنج، ملاتونین، روی، منیزیم، اکسیداتیو استرس، فارماکولوژی.

*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی.

پست الکترونیک: sa_mehrzadi@yahoo.com

## مقدمه

صرع به دلیل فعالیت غیرعادی و زیاد نورون‌ها در مغز رخ می‌دهد. صرع یک وضعیت است که با تشنج‌های مکرر مشخص می‌شود (۱). این بیماری یکی از شایع‌ترین اختلالات عصبی است که شیوع جهانی آن ۰/۶٪ است و سالانه ۴-۱۰ نفر از هر هزار نفر را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲). صرع یک وضعیت مزمن است که می‌تواند در هر سنی و در هر دو جنسیت رخ دهد، اگرچه در مردان و افراد مسن کمتر شایع است (۳). گزارش شده که نرخ شیوع در افراد با شرایط اقتصادی نامساعد در کشورهای توسعه‌یافته بالاتر است، هرچند علت این شیوع بالا مشخص نیست (۴).

تقریباً ۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان از صرع رنج می‌برند و حدود ۹۰٪ از آنها در کشورهای در حال توسعه زندگی می‌کنند، جایی که اکثریت آنها درمان مناسب دریافت نمی‌کنند (۵، ۶). پیامدهای منفی این وضعیت تنها به افراد مبتلا محدود نمی‌شود بلکه بر خانواده‌های آنها و به‌طور غیرمستقیم بر جامعه گسترده‌تر تأثیر می‌گذارد. این وضعیت همراه است با خطرات جسمی غیرقابل پیش‌بینی مرتبط با حملات تشنج ، انزوا اجتماعی و مشکلات در شرکت منظم در مدرسه و کار روزمره. علاوه بر این، صرع معمولاً با چالش‌های قابل توجه بهداشت روانی مانند اضطراب، افسردگی و کاهش عزت نفس همراه است (۷).

صرع علل مختلفی دارد، از جمله اختلالات عصبی متنوع، عفونت‌ها، آسیب‌های فیزیکی، بیماری‌های مادرزادی، تب، عوامل سمی و عوامل متابولیک (۸). انواع مختلفی از انتقال‌دهنده‌های عصبی، به‌ویژه اسید گاما-آمینوبوتیریک (GABA) و گلوتامات، نقش مهمی در پاتولوژی صرع دارند (۹). گلوتامات مهم‌ترین انتقال‌دهنده عصبی تحریکی در سیستم عصبی مرکزی (CNS) است و گیرنده N-methyl-D-aspartate (NMDA) را فعال می‌کند و بر ورود کلسیم تأثیر می‌گذارد. فعال‌سازی گیرنده‌های گلوتامات می‌تواند منجر به استرس اکسیداتیو شود. آنتاگونیست‌های گیرنده NMDA فعالیت ضدصرعی نشان می‌دهند. برخی از داروهای ضدتشنج بر کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ تأثیر می‌گذارند و اختلالات در این کانال‌ها به برخی از صرع‌های ارثی کمک می‌کند (۱۰).

گزینه‌های درمانی برای صرع در دهه‌های اخیر پیشرفت‌های زیادی کرده‌اند که کیفیت زندگی بیماران را بهبود بخشیده‌اند. انتخاب درمان باید به کنترل علائم و پیشگیری از عوارض کمک کند (۱۱). حدود ۷۵-۸۰٪ از بیماران با داروهای ضدتشنج معمولی مانند فنی‌توئین، کاربامازپین و اسید والپروئیک به‌طور مؤثر کنترل می‌شوند. با این حال، بیشتر داروها پنجره درمانی محدودی دارند و نیازمند نظارت دقیق در طول استفاده از دارو توسط بیمار هستند. علاوه بر این، درمان در ۲۰-۲۵٪ از بیماران با وجود داروهای تجویزی شکست می‌خورد (۱۱).

چالش اصلی با رویکردهای درمانی کنونی به عوارض جانبی مزمن آنها مربوط می‌شود. داروهای ضدتشنج می‌توانند منجر به عوارض جانبی مزمن مختلفی شوند، از جمله اختلالات عصبی، کلیوی، کبدی، بینایی، گوارشی، اختلالات الکترولیتی، مشکلات پوستی و تغییرات رفتاری در بیماران. علاوه بر این، این داروها معمولاً تعاملات دارویی زیادی دارند و می‌توانند بر جذب و متابولیسم آنها تأثیر بگذارند (۱۲-۱۴). پنتیلن‌تترازول (PTZ) تشنج‌های دوز وابسته به شدت را در حیوانات ایجاد می‌کند. در این مدل، تزریق یک یا چند دوز PTZ منجر به تشنج‌های تونیک-کلونیک عمومی می‌شود (۹،۱۵).

صرع عمومی یک وضعیت مزمن است که با تشنج‌های مکرر مشخص می‌شود و تشنج‌های مکرر منجر به تولید بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در مغز می‌شود. تشنج‌های طولانی‌مدت در حیوانات منجر به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و القای استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۶). استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتوکندری ممکن است در آسیب مغزی ناشی از تشنج‌ها نقش ایفا

کنند (۱۷). تحقیقات قبلی القای استرس اکسیداتیو در سیستم عصبی مرکزی در مدل‌های مختلف تشنج در حیوانات را نشان داده است، از جمله مدل کیندلینگ (۱۸)، مدل اسید کائینیک (۱۹)، مدل PTZ (۲۰)، مدل تشنج صوتی (۲۱) و مدل شوک الکتریکی (۲۲).

با توجه به شیوع بالای صرع و چالش‌ها و پیچیدگی‌های فراوانی که برای بیماران ایجاد می‌کند، مطالعات مختلف برای بررسی مکانیسم‌های اساسی این اختلال ضروری و مفید به شمار می‌روند. هدف این مطالعات کاهش شیوع صرع، کشف درمان‌های جدید یا پیشگیری از اثرات منفی آن است. بنابراین، مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثربخشی ملاتونین، روی، منیزیم و ترکیب آن‌ها در برابر تشنج‌های القا شده با PTZ در موش‌ها طراحی شده است.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات

در این آزمایش از موش‌های نر موسسه تحقیقاتی پزشکی نیروی دریایی (NMRI) با وزن ۳۰-۲۵ گرم استفاده شد. موش‌ها به جز در مدت زمان کوتاه آزمایش، به غذای استاندارد و آب دسترسی آزاد داشتند. تمامی اقدامات انجام شده طبق پروتکل‌های اخلاقی مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و اصول مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی (انتشار NIH، ویرایش ۱۹۸۵) صورت گرفت.

### مواد شیمیایی

ملاتونین، روی، منیزیم، دیازپام و سایر مواد شیمیایی از شرکت سیگما-آلدریچ (سن لوئیس، میسوری، ایالات متحده) خریداری شد.

### طراحی مطالعه و گروه‌ها

برای بررسی اثر ترکیبی ملاتونین، روی و منیزیم در پیشگیری از تشنج و کاهش مدت زمان حملات تشنجی، ۳۶ موش نر NMRI به طور تصادفی به شش گروه تقسیم و آزمایش شدند. داروها در آب آشامیدنی موش‌ها به مدت دو هفته تجویز شدند و در روز پانزدهم، تشنج‌ها با تزریق داخل صفاقی PTZ القا شدند. گروه‌ها شامل گروه (I) که در روز پانزدهم آزمایش PTZ (۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در ۰/۵ میلی‌لیتر نرمال سالین، تزریق داخل صفاقی (۹)) دریافت کردند، گروه‌های II-VI که به ترتیب دیازپام (۴ میلی‌گرم/کیلوگرم (۹))، روی (۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (۲۴, ۲۳))، ملاتونین (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، منیزیم (۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (۲۵)) و ترکیب روی (۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، ملاتونین (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، منیزیم (۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) قبل از تزریق PTZ (۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، تزریق داخل صفاقی) در روز پانزدهم آزمایش دریافت کردند.

### ارزیابی تاخیر و مدت زمان تشنج

تاخیر و مدت زمان تشنج در روز پانزدهم، بلافاصله پس از تزریق داخل صفاقی PTZ ارزیابی شدند. موش‌ها در جعبه‌های پلکسی‌گلاس قرار گرفتند و برای مدت ۳۰ دقیقه تحت مشاهده قرار گرفتند. برای هر موش، زمان‌ها (به ثانیه) از تزریق PTZ تا بروز کلونوس عمومی (تونوس اندام‌های قدامی و خلفی متقارن، کلونوس اندام‌های خلفی و فعالیت چرخشی) به عنوان تاخیر تشنج ثبت شد. مدت زمان تشنج نیز برای هر موش ثبت گردید (۹).

### تحلیل بیوشیمیایی بافت مغزی

پس از ۳۰ دقیقه، موش‌ها با استفاده از جعبه‌های CO2 کشته شدند و مغزهای آن‌ها استخراج شدند تا نشانگرهای استرس اکسیداتیو تحلیل شوند. هموژنیزاسیون بافت مغز (۱:۱۰ وزنی/حجمی) در بافر یخ‌زده Tris-HCl (۰/۱ مولار، PH ۷/۴) انجام شد و غلظت پروتئین کل با استفاده از روش Bradford تعیین شد.

### آزمایش اسید تیوباربیتوریک (TBA)

به عنوان معیاری از پراکسیداسیون لیپیدها، محتوای مالون دی الدهید (MDA) در بافت مغز با استفاده از آزمایش TBA اندازه‌گیری شد. بوتیله‌شده هیدروکسی‌تولوئن (BHT) به لوله‌هایی که حاوی هموژنه

بافت مغز بودند افزوده شد و سپس لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. سرم‌های نمونه‌ها (۱۰۰ میکرولیتر) به لوله‌هایی که حاوی شوینده (۱۰۰ میکرولیتر) و محلول کروموژن (TBA، قلیا، و اسید استیک؛ ۲۰۰ میکرولیتر) بودند افزوده شدند. لوله‌ها به مدت ۱ ساعت در آب جوش به حرارت رسیدند تا رنگ صورتی ظاهر شود. لوله‌های حاوی نمونه‌ها در حمام یخ سرد شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ g سانتریفیوژ شدند. جذب رنگ صورتی ایجاد شده در سرم نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌خوان (Synergy HT Microplate Reader، BioTek Instruments، Inc، Winooski، VT، USA) اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد MDA برای تعیین سطح MDA استفاده شد.

**ارزیابی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز (SOD)**

هموژن‌های بافت مغز به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند و سرم‌های حاصل جمع‌آوری شدند. سپس، ۱۰ میکرولیتر از سرم نمونه‌ها به هر چاهک پلیت حاوی محلول کروموژن (۲۰۰ میکرولیتر) و محلول آنزیم SOD (۱۰ میکرولیتر) اضافه شد. صفحه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا رنگ زرد تولید شود که جذب آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌خوان (BioTek Instruments، Inc، Winooski، VT، USA) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم SOD به صورت واحدهای آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین (U/mg پروتئین) بیان شد.

**ارزیابی فعالیت کاتالاز (CAT)**

هموژنه به دست آمده از بافت در ۱۴۰۰۰ گرم به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری گردید و روی یخ نگهداری شد. فرمالدئید به عنوان استاندارد استفاده گردید. در چاهک مطابق با استاندارد، ۱۰۰ میکرولیتر بافر سنجش، ۳۰ میکرولیتر متانول و ۲۰ میکرولیتر غلظت‌های مختلف فرمالدئید اضافه گردید بعداز افزودن ۱۰۰ میکرولیتر بافر سنجش، ۳۰ میکرولیتر متانول و ۲۰ میکرولیتر از نمونه در چاهک های مربوط به نمونه ها، واکنش با افزودن ۲۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن به تمام چاهک‌ها آغاز گردید. پلیت را پوشانده و به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار می‌دهیم. سپس ۳۰ میکرولیتر محلول KOH به هر چاهک اضافه شد تا واکنش خاتمه یابد. سپس ۳۰ میکرومولار از محلول ارغوانی آماده شده به هر چاهک اضافه و صفحه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق تکان داده شد. پس از انکوباسیون، ۱۰ میکرولیتر محلول KIO4 به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۵ دقیقه در تاریکی روی شیکر قرار گرفت. میزان جذب روی دستگاه میکروپلیت ریدر (BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA) در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم در نمونه‌های مورد نظر بر اساس منحنی استاندارد محاسبه و به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در نمونه بیان گردید.

**تحلیل داده ها**

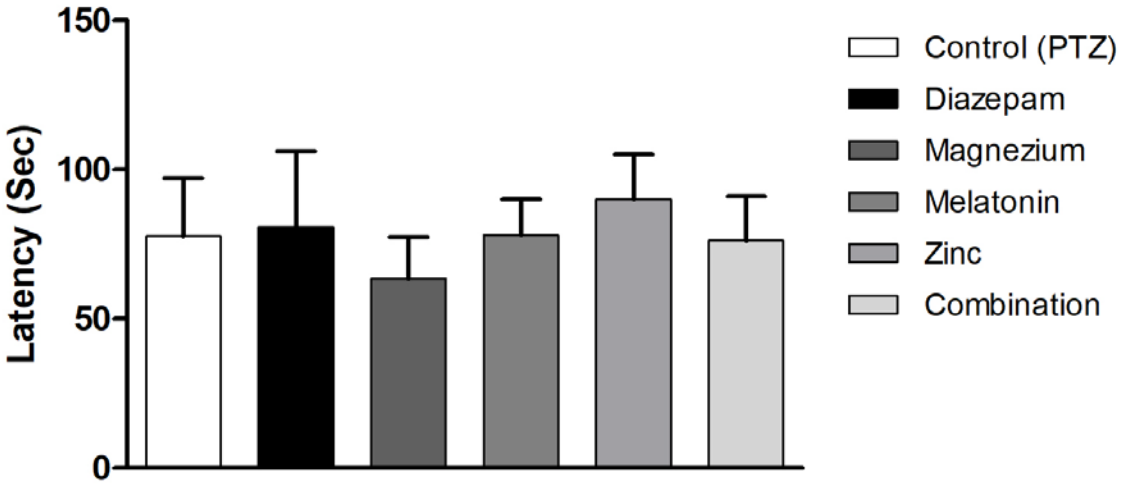
نتایج آزمایش‌ها تحت تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) قرار گرفتند. آزمون Tukey پس از انجام آزمون برای مقایسه‌های چندگانه با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۷ به کار گرفته شد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری از نظر آماری در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

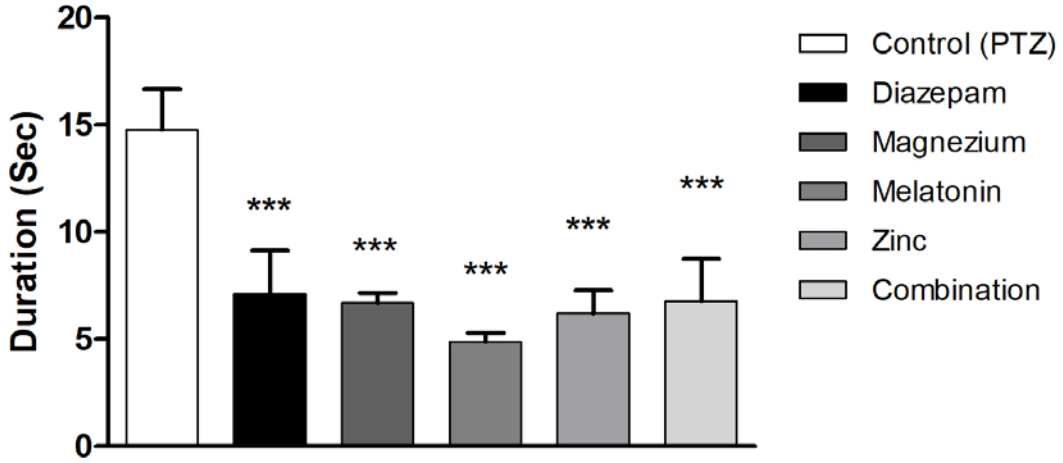
**اثرات ملاتونین، روی، منیزیم و ترکیب آن‌ها بر تاخیر و مدت زمان تشنج**

نتایج مطالعه نشان داد که ملاتونین، منیزیم و روی، چه به تنهایی و چه به صورت ترکیبی، قادر به افزایش معنی‌دار فاز تاخیر تشنج نبودند. علاوه بر این، موش‌های درمان شده با دیازپام کاهش معنی‌داری در فاز تاخیر تشنج نشان ندادند. نتایج مطالعه نشان داد که دیازپام، و همچنین

ملاتونین، منیـزیم و روی بـه طـور فـردی قـادر بـه کـاهش معنی‌دار مدت زمـان تشـنج بودنـد ($P < ۰/۰۰۱$). ترکیـب ملاتونین، منیزیم و روی نیز به طور معنی‌داری مـدت زمـان تشـنج را کـاهش داد ($P < ۰/۰۰۱$)، امـا ایـن اثـر تفـاوت معنی‌داری از نظر آماری با هر یک از گروه‌های درمـان شـده با تک دارو نداشت (شکل‌های ۱ و ۲).



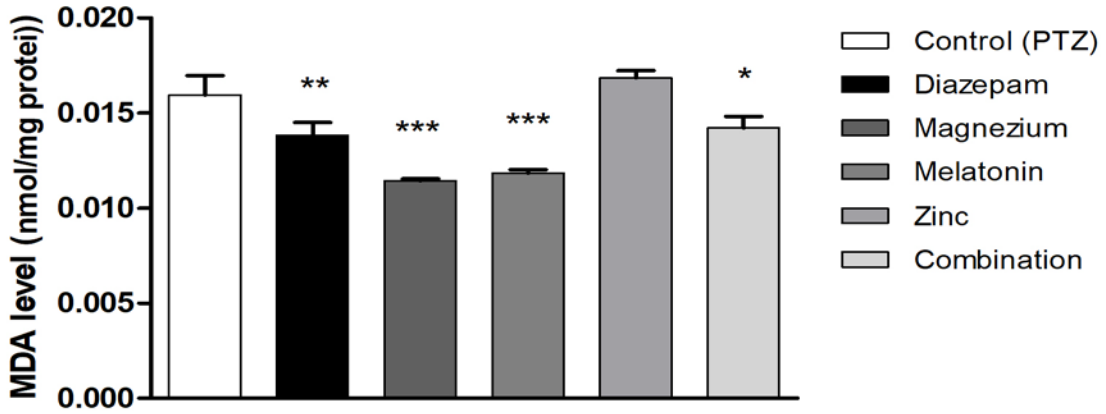

**شکل ۱. تأثیر روی، ملاتونین و منیزیم بر تاخیر بروز تشنج در موش‌های تجویز شده با PTZ. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین ارائه شده است.**




**شکل ۲. تأثیر روی، ملاتونین و منیزیم بر مدت زمان تشنج در موش‌های تجویز شده با PTZ. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین ارائه شده است ***P < ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه درمان شده با PTZ.**

### اثرات ملاتونین، روی، منیزیم و ترکیب آن‌ها بر سطح MDA

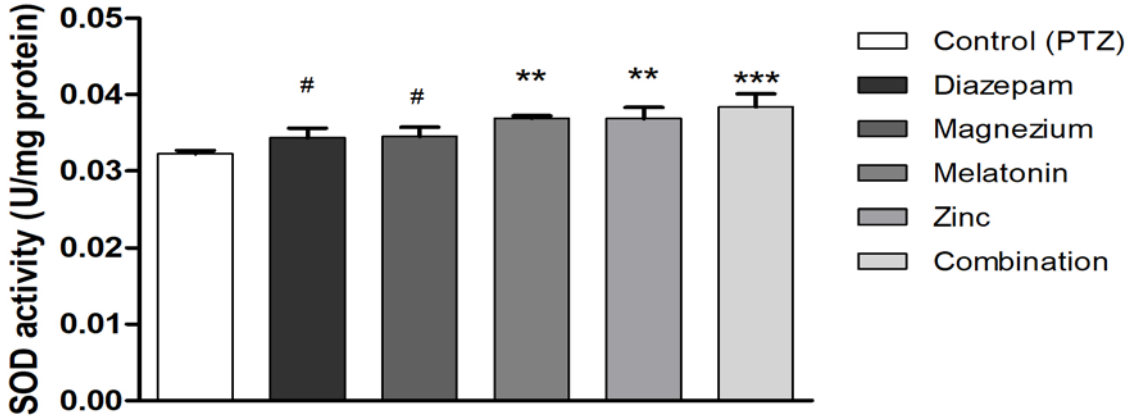
نتایج مطالعه نشان داد که دیازپام، ملاتونین و منیزیم به تنهایی اثر معنی‌داری در کاهش سطح MDA در بافت مغز داشتند ($P < ۰/۰۰۱$). در گروه درمان‌شـده بـا روی، تغییـر معنـی‌داری در سـطح MDA مشـاهده نشـد. ترکیـب ملاتونین، منیزیم و روی نیز به طـور معنـی‌داری از افـزایش سطح MDA در بافت مغز جلوگیری کرد ($P < ۰/۰۵$). بـا این حال، این ترکیب نتوانست بهتر از ملاتونین و منیزیم در جلوگیری از افزایش سطح MDA عمل کند (شکل ۳).




**شکل ۳. تأثیر روی، ملاتونین و منیزیم بر سطح MDA در مغز موش‌های تجویز شده با PTZ. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین ارائه شده است. ۰/۰۰۱ > P*** و ۰/۰۵ > P* در مقایسه با گروه درمان شده با PTZ.**

### اثرات ملاتونین، روی، منیزیم و ترکیب آن‌ها بر فعالیت SOD

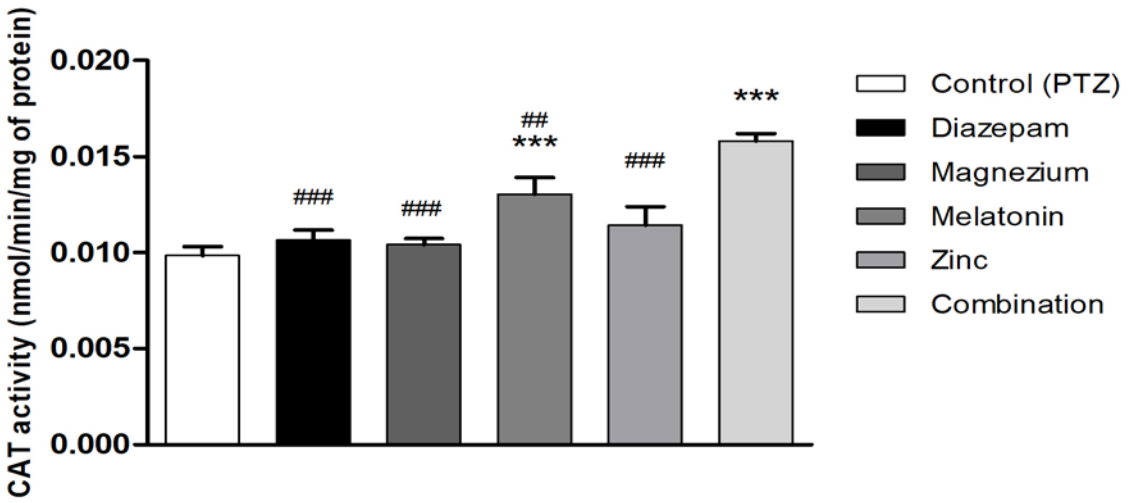
نتایج مطالعه نشان داد که ملاتونین و روی به تنهایی به طور معنی‌داری فعالیت آنزیم SOD در بافت مغز را افزایش دادند (P < ۰/۰۱). در گروه‌های درمان‌شده با دیازپام و منیزیم، تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم SOD مشاهده نشد. ترکیب ملاتونین، منیزیم و روی قادر بود به طور معنی‌داری فعالیت آنزیم SOD را در بافت مغز افزایش دهد (P < ۰/۰۰۱)، که این اثر به طور معنی‌داری بهتر از گروه‌های درمان‌شده با منیزیم و دیازپام بود (شکل ۴).




**شکل ۴. تأثیر روی، ملاتونین و منیزیم بر فعالیت آنزیم SOD در مغز موش‌های تجویز شده با PTZ. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین ارائه شده است. ۰/۰۰۱ > P*** و ۰/۰۱ > P** در مقایسه با گروه درمان شده با PTZ. ۰/۰۵ > P# در مقایسه با گروه ترکیبی.**

### اثرات ملاتونین، روی، منیزیم و ترکیب آن‌ها بر فعالیت CAT

نتایج مطالعه نشان داد که ملاتونین به تنهایی فعالیت آنزیم CAT در بافت مغز را به طور معنی‌داری افزایش داد (P < ۰/۰۰۱). در گروه‌های درمان‌شده با دیازپام، منیزیم و روی، تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم CAT مشاهده نشد. علاوه بر این، ترکیب ملاتونین، روی و منیزیم قادر بود فعالیت آنزیم CAT را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل تشنج افزایش دهد (P < ۰/۰۰۱). ترکیب ملاتونین، منیزیم و روی تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه‌های درمان‌شده با منیزیم (P < ۰/۰۰۱)، دیازپام (P < ۰/۰۰۱)، روی (P < ۰/۰۰۱) و ملاتونین (P < ۰/۰۰۱) در افزایش فعالیت آنزیم CAT نشان داد (شکل ۵).




**شکل ۵. تأثیر روی، ملاتونین و منیزیم بر فعالیت آنزیم CAT در مغز موش‌های تجویز شده با PTZ. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین ارائه شده است. ۰/۰۰۱ > P*** در مقایسه با گروه درمان شده با PTZ. ۰/۰۱ > P## و ۰/۰۱ > P### در مقایسه با گروه ترکیبی.**

## بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه حیوانی، اثرات ملاتونین، روی، منیزیم و ترکیب آن‌ها بر تاخیر شروع تشنج (فاز تاخیر) و مدت زمان تشنج بررسی شد. ملاتونین، منیزیم، روی و ترکیب آن‌ها به‌طور معنی‌داری فاز تاخیر را نسبت به گروه کنترل تشنج (PTZ) طولانی نکردند. علاوه بر این، ملاتونین، منیزیم، روی و ترکیب آن‌ها به‌طور معنی‌داری مدت زمان تشنج را نسبت به گروه PTZ کاهش دادند، اما ترکیب این داروها تاثیر بیشتری در کاهش مدت زمان تشنج نسبت به هر داروی جداگانه نداشت. از آنجایی که تشنج‌ها استرس اکسیداتیو در مغز ایجاد می‌کنند (۲۶،۲۷)، غلظت MDA در مغز به‌عنوان نشانگر استرس اکسیداتیو ارزیابی شد. همچنین وضعیت آنتی‌اکسیدان‌ها در گروه‌های مختلف با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT بررسی شد. همان‌طور که نشان داده شد، سطوح MDA تولید شده در مغز ارتباط مستقیمی با مدت زمان تشنج‌های حیوانات دارد، به‌طوری که گروه PTZ بالاترین غلظت MDA را داشت. گروه درمان‌شده با ملاتونین و منیزیم سطح MDA به‌طور معنی‌داری کمتری نسبت به گروه PTZ نشان دادند که می‌توان آن را به مدت زمان کوتاه‌تر تشنج در این گروه‌ها یا اثرات آنتی‌اکسیدانی ملاتونین و منیزیم نسبت داد (۲۸،۲۹). ترکیب ملاتونین، منیزیم و روی نیز به‌طور معنی‌داری سطح MDA را نسبت به گروه PTZ کاهش داد و میزان این کاهش تفاوت معنی‌داری با هر یک از داروهای جداگانه نشان نداد. سطح MDA در گروه دیازپام نیز کمتر از گروه تشنج بود که رابطه مستقیم بین مدت زمان تشنج و استرس اکسیداتیو را تأیید می‌کند. با این حال، در گروه درمان‌شده با روی، سطح MDA اندازه‌گیری‌شده تفاوت معنی‌داری با گروه PTZ نشان نداد.

منیزیم یک عنصر ضروری است که برای عملکرد صحیح بیش از ۳۰۰ فرآیند وابسته به آنزیم و بسیاری از عملکردهای سلولی، از جمله فسفریلاسیون اکسیداتیو و سنتز پروتئین، مورد نیاز است. مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که کمبود منیزیم آستانه تشنج را کاهش می‌دهد. منیزیم می‌تواند به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA عمل کرده و آن را به یک تعدیل‌کننده بالقوه تشنج تبدیل کند. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که افراد مبتلا به صرع سطوح منیزیم کمتری نسبت به افرادی که صرع ندارند، دارند. گزارش‌های موردی وجود دارد که کنترل تشنج با مکمل‌های منیزیم در افرادی با شرایط خاص را نشان می‌دهند (۳۰). کمبود منیزیم می‌تواند منجر به بروز علائم بالینی شامل تحریک‌پذیری

عصبی-عضلانی، آریتمی‌های قلبی و اختلالات بیوشیمیایی مانند هیپوکالمی و هیپوکلسمی شود (۳۱). کمبود منیزیم با بسیاری از اختلالات عصبی مانند اسپاسم عروقی مغزی، بیماری آلزایمر، سکته مغزی و میگرن مرتبط است (۳۳, ۳۲). منیزیم برای پیشگیری و درمان تشنج‌های پس از اکلامپسی در دوران بارداری استفاده می‌شود (۳۴). علاوه بر این، مطالعاتی که روی موش‌ها انجام شده نشان داده‌اند که کمبود منیزیم احتمال بروز تشنج را افزایش می‌دهد (۳۵). نتایج مطالعه ما نشان داد که منیزیم به‌طور معنی‌داری قادر به کاهش مدت زمان تشنج در موش‌های در معرض PTZ بود.

روی یک عنصر شیمیایی است که برای بسیاری از فرآیندهای متابولیک در بدن ضروری است. تأثیر روی بر تشنج موضوعی است که بحث‌های زیادی را به خود اختصاص داده است زیرا از یک‌سو در تولید و عملکرد GABA که یک نوروترانسمیتر مهاری و ضد تشنج است نقش دارد و از سوی دیگر اثرات مهاری بر GABA دارد که باعث تسهیل تشنج می‌شود (۳۶). یکی از دلایل بروز تشنج التهاب در مغز است و روی، با اثرات ضد التهابی خود، می‌تواند در درمان تشنج مؤثر باشد. مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۲ بر روی موش‌ها انجام شد نشان داد که موش‌هایی که قبل از القای تشنج، روی را به‌صورت داخل صفاقی با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند، کمتر در معرض تشنج قرار گرفتند (۳۷). در مطالعه حاضر، روی به‌صورت خوراکی به موش‌ها داده شد و توانست به‌طور معنی‌داری مدت زمان تشنج را در موش‌های در معرض PTZ کاهش دهد. اگر چه روی نتوانست میزان MDA را به طور معنی داری در مغز موش ها کاهش دهد، ممکن است بر سایر فاکتور های التهابی و اکسیداتی که در این مطالعه اندازه گیری نشده است موثر باشد.

ملاتونین مولکولی است که اثرات تنظیمی بر مسیرهای مختلف سلولی از جمله مسیرهای آپوپتوزی، التهابی و اتوفاژی دارد (۳۹, ۳۸). اثرات ضد تشنج ملاتونین در مدل‌های مختلف تشنج نشان داده شده است. Uz و همکارانش اثر محافظتی ملاتونین را در پیشگیری از آسیب DNA ناشی از اسید کائینیک در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نشان دادند. آنها پیشنهاد کردند که ملاتونین ممکن است آسیب سلولی ناشی از فعال‌سازی گیرنده‌های کائینات را کاهش دهد (۴۰). در مطالعه‌ای دیگر، تزریق همزمان ملاتونین (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و اسید کائینیک به‌صورت داخل بطنی، به‌طور کامل از بروز تشنج و آسیب DNA میتوکندری در ناحیه قشری مغز موش‌ها جلوگیری می‌کند (۴۱). علاوه بر این، تجویز ملاتونین به‌صورت داخل بطنی در مدل تشنج القا شده با PTZ در موش‌ها، با دوزهای ۴۰ و ۸۰ میکروگرم، منجر به طولانی شدن فاز تاخیر در الکتروکورتیکوگرافی و کاهش معنی‌دار فعالیت اسپایک-ویو شد (۴۲). اثرات ضد تشنج ملاتونین ممکن است از طریق مکانیزم‌های مختلفی اعمال شوند. ملاتونین می‌تواند ورود کلسیم به نورون‌ها را کاهش دهد، به کمپلکس کلسیم-کالمودولین متصل شود، فعالیت نیتریک اکسید سنتاز نورونی را کاهش دهد و سطح نیتریک اکسید را پایین بیاورد که در نتیجه منجر به کاهش اثرات تحریکی NMDA می‌شود. علاوه بر این، ملاتونین غلظت GABA و تمایل گیرنده آن را در مغز افزایش می‌دهد. همچنین می‌تواند از طریق گیرنده‌های دوپامینی D1 و D2، فعالیت دوپامینرژیک را کاهش دهد که منجر به مهار آزادسازی گلوتامات می‌شود (۴۳). نتایج مطالعه حاضر یافته‌های تحقیقات قبلی را تایید می‌کند. مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب منیزیم، روی و ملاتونین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و کاتالاز را نسبت به گروه کنترل تشنج افزایش داد. در حالی که منیزیم و روی به‌طور جداگانه نتوانستند فعالیت کاتالاز را افزایش دهند، ترکیب آنها با ملاتونین اثر ملاتونین را بر فعالیت کاتالاز تقویت کرد. ترکیب ملاتونین، روی و منیزیم افزایش معنی‌داری در فعالیت SOD نسبت به گروه‌های منیزیم و دیازپام نشان

داد. با توجه به حضور آنتی‌اکسیدان‌های دیگر در سلول‌ها که ممکن است تحت تأثیر این ترکیبات قرار گیرند، به نظر می‌رسد که ترکیب ملاتونین، روی و منیزیم ممکن است رادیکال‌های آزاد را خنثی کرده و بر کاتالاز و آنتی‌اکسیدان‌های دیگر که در این مطالعه اندازه‌گیری نشده‌اند، تأثیر بگذارد.

مطالعه حاضر نشان داد که ملاتونین، منیزیم، روی و ترکیب آن‌ها مدت زمان فاز تاخیر تشنج را در موش‌های تحت درمان با PTZ به‌طور معنی‌داری طولانی نکردند. علاوه بر این، ملاتونین، منیزیم، روی و ترکیب آن‌ها به‌طور معنی‌داری مدت زمان تشنج را در مقایسه با موش‌های تحت درمان با PTZ کاهش دادند، اگرچه ترکیب این داروها اثری بیشتر از هر داروی تنها در کاهش مدت زمان تشنج نداشت. برای ارزیابی استرس اکسیداتیو، سطح MDA اندازه‌گیری شد و ترکیب ملاتونین، منیزیم و روی سطح MDA را در موش‌های تحت درمان با PTZ به‌طور معنی‌داری کاهش داد. علاوه بر این، ترکیب منیزیم، روی و ملاتونین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و کاتالاز را که نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی درون‌سلولی هستند، افزایش داد. لازم به ذکر است، در حالی که مطالعه ما بینش‌های ارزشمندی در مورد اثرات بالقوه ملاتونین، منیزیم و روی در صرع ارائه می‌دهد، مطالعات تجربی بیشتری برای روشن‌سازی مکانیسم‌های دقیق کاهش تشنج‌های القا شده با PTZ توسط درمان ترکیبی ضروری است.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه علوم پزشکی ایران و تمام کسانی که در این راه ما را یاری کردند، کمال تقدیر و تشکر را دارند.

## تعارض منافع

نویسندگان اعلام میدارند هیچگونه تعارض منافعی در نگارش این پژوهش ندارند

## حمایت مالی

این کار توسط معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران با شماره کمک هزینه ۱۴۰۰-۳-۲۱-۲۰۵۸۷ حمایت شده است.

## مشارکت نویسندگان

مطالعه و طراحی: سعید مهرزادی و منیژه متولیان، انجام آزمایش و جمع‌آوری داده‌ها: فائزه عباسیان، تجزیه و تحلیل داده ها: اعظم حسین زاده، نوشتن مقاله: اعظم حسین زاده، بررسی مقاله: علی اصغر کیانی و سعید مهرزادی.

## ملاحظات اخلاقی

تمام اقدامات انجام شده با رعایت کامل پروتکل‌های مشخص شده برای مراقبت اخلاقی و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد اخلاق (IR.IUMS.REC.1400.1225) صورت گرفته است.

## References


1. Huff J, Murr N. Seizure. Statpearls [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. Link
2. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon C-S, Dykeman J, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis of international studies. Neurology. 2017;88(3):296-303. DOI:10.1212/WNL.0000000000003509
3. Beghi E. The epidemiology of epilepsy. Neuroepidemiology. 2020;54(2):185-91. DOI:10.1159/000503831
4. Heaney DC, MacDonald BK, Everitt A, Stevenson S, Leonardi GS, Wilkinson P, et al. Socioeconomic variation in incidence of epilepsy: prospective community based study in south east England. BMJ. 2002;325(7371):1016-7. DOI:10.1136/bmj.325.7371.1013
5. Reynolds EH. The ILAE/IBE/WHO global campaign against epilepsy: bringing epilepsy “out of the shadows”. Epilepsy Behav. 2000;1(4):S3-S8. DOI:10.1006/ebeh.2000.0104
6. Meinardi H, Scott R, Reis R. The treatment gap in epilepsy: the current situation and ways forward. Epilepsia. 2001;42(1):136-49. DOI:10.1046/j.1528-1157.2001.32800.x
7. De boer HM, Mula M, Sander JW. The global burden and stigma of epilepsy. Epilepsy Behav. 2008;12(4):540-6. DOI:10.1016/j.yebeh.2007.12.019
8. Speckmann EJ, Straub H, Köhling R. Contribution of calcium ions to the generation of epileptic activity and antiepileptic calcium antagonism. Neuropsychobiology. 1993;27(3):122-6. DOI:10.1159/000118966
9. Hosseinzadeh A, Dehdashtian E, Jafari-Sabet M, Mehrzadi S. The effects of vitamin D3 and melatonin combination on pentylenetetrazole-induced seizures in mice. Cent Nerv Syst Agents Med Chem. 2022;22(2):118-24. DOI:10.2174/1871527322666220203122120
10. Mehrzadi S, Dehdashtian E, Karimi MY, Hosseinzadeh A. The anticonvulsant activity of thiamine, vitamin D3, and melatonin combination on pentylenetetrazole-induced seizures in mice. Curr Drug Ther. 2022;17(4):281-8. DOI:10.2174/1574885517666220531104009
11. Rout SK, Kar DM. A review on antiepileptic agents, current research and future prospectus on conventional and traditional drugs. Int J Pharm Sci Rev Res. 2010;3(2):19-23.Link
12. Eddy CM, Rickards HE, Cavanna AE. The cognitive impact of antiepileptic drugs. Ther Adv Neurol Disord. 2011;4(6):385-407. DOI:10.1177/1756285611417920
13. Bosak M, Słowik A, Iwańska A, Lipińska M, Turaj W. Co-medication and potential drug interactions among patients with epilepsy. Seizure. 2019;66:47-52. DOI:10.1016/j.seizure.2019.01.014
14. Johannessen SI, Landmark CJ. Antiepileptic drug interactions - principles

and clinical implications. Curr Neuropharmacol. 2010;8(3):254-67. DOI:10.2174/157015910792246254

15. Mohamed HK, Eltony SA. Effect of acute pentylenetetrazol injection induced epileptic seizures on rat dentate gyrus at different postnatal ages. Anat Cell Biol. 2020;53(1):84-94. DOI:10.5115/acb.19.083
16. Lin T-K, Chen S-D, Lin K-J, Chuang Y-C. Seizure-induced oxidative stress in status epilepticus: is antioxidant beneficial? Antioxidants. 2020;9(11):1029. DOI:10.3390/antiox9111029
17. Waldbaum S, Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: a contributing link to acquired epilepsy? J Bioenerg Biomembr. 2010;42(6):449-55. DOI:10.1007/s10863-010-9262-0
18. Frantseva M, Velazquez JP, Tsoraklidis G, Mendonca A, Adamchik Y, Mills L, et al. Oxidative stress is involved in seizure-induced neurodegeneration in the kindling model of epilepsy. Neuroscience. 2000;97(3):431-5. DOI:10.1016/s0306-4522(00)00041-5
19. Gluck MR, Jayatilleke E, Shaw S, Rowan AJ, Haroutunian V. CNS oxidative stress associated with the kainic acid rodent model of experimental epilepsy. Epilepsy Res. 2000;39(1):63-71. DOI:10.1016/S0920-1211(00)00111-4
20. Patsoukis N, Zervoudakis G, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA, Panagopoulos NT. Thiol redox state and lipid and protein oxidation in the mouse striatum after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. Epilepsia. 2005;46(8):1205-11. DOI:10.1111/j.1528-1167.2005.63704.x
21. Vinogradova LV. Audiogenic kindling in WAG/Rij rats: change in behavioral and electrophysiological responses to repetitive short acoustic stimulation. Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova. 2004;54(5):638-47. Link
22. Rola RA, Swiader M, Czuczwar SAJ. Electroconvulsions elevate the levels of lipid peroxidation products in mice. Pol J Pharmacol. 2002;54(5):521-4. Link
23. Kumar H, Katyal J, Gupta YK. Low dose zinc supplementation beneficially affects seizure development in experimental seizure models in rats. Biol Trace Elem Res. 2015;163(1):208-16. DOI:10.1007/s12011-014-0181-7
24. Chen NN, Zhao DJ, Sun YX, Wang DD, Ni H. Long-term effects of zinc deficiency and zinc supplementation on developmental seizure-induced brain damage and the underlying GPR39/ZnT-3 and MBP expression in the hippocampus. Front Neurosci. 2019;13:920. DOI:10.3389/fnins.2019.00920
25. Moghimi N, Eidi A, Mortazavi P, Rohani AH. Effects of magnesium sulfate on pentylenetetrazole-induced seizures in male Wistar rats. Res Med. 2018;42(2):93-99. Link
26. Puttachary S, Sharma S, Stark S, Thippeswamy T. Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy.

Biomed Res Int. 2015;2015:745613. DOI:10.1155/2015/745613

27. Dehdashtian E, Hosseinzadeh A, Hemati K, Karimi MY, Fatemi I, Mehrzadi S. Anti-convulsive effect of thiamine and melatonin combination in mice: involvement of oxidative stress. Cent Nerv Syst Agents Med Chem. 2021;21(2):125-9. DOI:10.2174/1871524921666210623161212
28. Shahriari M, Mehrzadi S, Naseripour M, Fatemi I, Hosseinzadeh A, Rezaei Kanavi M, et al. Beneficial effects of melatonin and atorvastatin on retinopathy in streptozocin-induced diabetic rats. Curr Drug Ther.2020;15(4):396-403.. DOI:10.2174/1574885514666191204104925
29. Kawasaki K, Kondoh E, Chigusa Y, Kawamura Y, Mogami H, Takeda S, et al. Metabolomic profiles of placenta in preeclampsia: antioxidant effect of magnesium sulfate on trophoblasts in early-onset preeclampsia. Hypertension. 2019;73(3):671-9. DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12389
30. Yuen AW, Sander JW. Can magnesium supplementation reduce seizures in people with epilepsy? A hypothesis. Epilepsy Res. 2012;100(1-2):152-6. DOI:10.1016/j.eplepsyres.2012.02.004
31. Abbott LG, Rude RK. Clinical manifestations of magnesium deficiency. Miner Electrolyte Metab. 1993;19(4-5):314-22. Link
32. Kirkland AE, Sarlo GL, Holton KF. The role of magnesium in neurological disorders. Nutrients. 2018;10(6):730. DOI:10.3390/nu10060730
33. Wenwen X, Jing Y, Yingchao S, Qinglu W. The effect of magnesium deficiency on neurological disorders: a narrative review article. Iran J Public Health. 2019;48(3):379-87. Link
34. Lourenco R, Camilo M. Magnesium: physiological and clinical relevance. 1: homeostasis and alterations in the metabolism of magnesium. Acta Med Port. 2000;13(4):211-20. Link
35. Bac P, Maurois P, Dupont C, Pages N, Stables JP, Gressens P, et al. Magnesium deficiency-dependent audiogenic seizures (MDDASs) in adult mice: a nutritional model for discriminatory screening of anticonvulsant drugs and original assessment of neuroprotection properties. J Neurosci. 1998;18(11):4363-73. DOI:10.1523/JNEUROSCI.18-11-04363.1998
36. Al-Mendalawi MD. Serum levels of zinc and copper in epileptic children during long-term therapy with anticonvulsants. Neurosciences (Riyadh). 2016;21(2):175-6. DOI:10.17712/nsj.2016.2.20160033
37. Mehmet K, Alper EM, Oytun E. Anti-seizure effect of zinc on PTZ-induced epilepsy in rat model. Bratisl Med J. 2022;123(9):648-52. DOI:10.4149/BLL_2022_104
38. Hosseinzadeh A, Kamrava SK, Joghataei MT, Darabi R, Shakeri-Zadeh A, Shahriari M, et al. Apoptosis signaling

pathways in osteoarthritis and possible protective role of melatonin. J Pineal Res. 2016;61(4):411-25. DOI: 10.1111/jpi.12362

39. Dehdashtian E, Mehrzadi S, Yousefi B, Hosseinzadeh A, Reiter RJ, Safa M, et al. Diabetic retinopathy pathogenesis and the ameliorating effects of melatonin; involvement of autophagy, inflammation and oxidative stress. Life Sci. 2018;193:20-33. DOI:10.1016/j.lfs.2017.12.001
40. Uz T, Giusti P, Franceschini D, Kharlamov A, Manev H. Protective effect of melatonin against hippocampal DNA damage induced by intraperitoneal administration of kainate to rats. Neuroscience. 1996;73(3):631-6. DOI: 10.1016/0306-4522(96)00155-8
41. Mohanan P, Yamamoto H-a. Preventive effect of melatonin against brain mitochondria DNA damage, lipid peroxidation and seizures induced by kainic acid. Toxicol Lett. 2002;129(1-2):99-105. DOI: 10.1016/s0378-4274(01)00475-1
42. Yildirim M, Marangoz C. Anticonvulsant effects of melatonin on penicillin-induced epileptiform activity in rats. Brain Res. 2006;1099(1):183-8. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.04.093
43. Banach M, Gurdziel E, Jędrych M, Borowicz KK. Melatonin in experimental seizures and epilepsy. Pharmacol Rep. 2011;63(1):1-11. DOI: 10.1016/s1734-1140(11)70393-0.