

اثر تزریق داخل بطنی سالوبرینال، یک مهار کننده جدید سنتز پروتئین، بر تشنجات ناشی از پنتیلین تترازول در موش صحرایی نر

مهین ایزدی^۱، محمد ابراهیم رضوانی^۲، منصور اسمعیلی^۳ دهج

دریافت مقاله: ۹۲/۰۹/۲۴ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۲/۱۱/۱۲ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۳/۰۱/۲۶ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۲/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: سالوبرینال، که داروی مهارکننده سنتز پروتئین است، نقش مهمی در بهبود خواب و کاهش فعالیت عصبی، با افزایش فعالیت سیستم مهاری گاما آمینوبوتیریک اسید (aminobutyric acid, GABA -) دارد. بر این اساس هدف این مطالعه بررسی اثر این عامل بر تشنجات ناشی از پنتیلین تترازول می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی نخست برای ثبت الکتروانسفالوگرام بوسیله عمل جراحی استریوتاکسی، سه الکتروود روی جمجمه موش‌های صحرایی نر نصب و سپس یک کانول جهت تزریق داخل بطنی در بطن راست کاشته شد. پس از بهبودی، هر حیوان، حلال دارو (دیازپام ۰/۲ میلی‌گرم) به ازاء هر حیوان دوز ۲۵ یا ۵۰ میکروگرم سالوبرینال داخل بطنی و پس از ۱۰ ساعت دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پنتیلین تترازول به شکل زیر پوستی دریافت کرد. برای مدت ۶۰ دقیقه کمیت‌های الکتروفیزیولوژیک و رفتاری تشنج ثبت و ارزیابی شد.

یافته‌ها: سالوبرینال در دوزهای ۲۵ و ۵۰ توانست زمان بروز حملات تونیک - کلونیک را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل به تعویق بیندازد ($p < 0/05$). علاوه بر این، مدت زمان امواج تشنجی مغز (Epileptic Discharge Duration) و مدت زمان امواج تشنجی با دامنه بالا در فاز حمله (Ictal Discharge Duration) را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد ($p < 0/05$). در حیواناتی که سالوبرینال دریافت کرده بودند، مراحل پایین‌تری از حملات تشنجی طبق معیار Racine مشاهده گردید ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد سالوبرینال می‌تواند در زمان کوتاهی پس از تزریق داخل مغزی موجب کاهش حملات صرعی شود و همچنین سنتز پروتئین در هنگام بروز حملات تشنجی امری ضروری است.

واژه‌های کلیدی: تشنج، سالوبرینال، مهار کننده سنتز پروتئین، موش صحرایی، پنتیلین تترازول

۱- کارشناس ارشد گروه آموزشی فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

۲- (نویسنده مسئول) دانشیار گروه آموزشی فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
تلفن: ۰۳۵۱-۸۲۰۳۴۱۰، دورنگار: ۰۳۵۱-۸۲۰۳۴۱۴، پست الکترونیکی: erezvani@yahoo.com

۳- دانشیار گروه آموزشی فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

مقدمه

صرع یکی از شایع‌ترین اختلالات نورولوژیک با شیوع تقریباً ۰/۳٪ تا ۰/۵٪ است [۱]. ایجاد صرع می‌تواند به صورت اکتسابی و یا ژنتیکی باشد، که در مورد اخیر یک استعداد زمینه‌ای ژنتیکی، وقایع شبه صرعی را آغاز می‌کند. وقایعی از قبیل صدمه مغزی ناشی از ضربه، سکتة مغزی، عفونت سیستم عصبی مرکزی، نفوپلاسم، خونریزی داخل مغزی، تشنج‌های ناشی از تب و صرع پایدار موجب صرع اکتسابی می‌شوند. فاکتورهای تشنج، زمینه ارثی و خانوادگی، سن، جنس و بیماری‌های عصبی در پیشرفت صرع مؤثر می‌باشند [۲].

سالوبرینال (Salubrinol) یک مولکول کوچک با وزن مولکولی ۴۷۹/۸۱ و فرمول شیمیایی ۳- فنیل- N-۲، ۲- تری‌کلرو-۱- (۸- کینولنیل آمینو) تیوکسومتیل] آمینو اتیل] -۲- پروپن‌آمید با غلظت کم در آب و با غلظت‌های بالاتر در دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) محلول است و غشای سلول به آن نفوذپذیر است. سالوبرینال، سلول‌ها را در برابر آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول) القا شده به واسطه استرس شبکه آندوپلاسمی حفظ می‌کند. این مولکول از طریق مهار دفسفریلاسیون فاکتور آغازگر ترجمه (eIF-2) و مهار نوعی کمپلکس پروتئینی سرین/ترئونین فسفاتاز عمل می‌کند [۳-۴]. این ماده با متوقف کردن مرحله ترجمه در پروتئین‌سازی، انباشته شدن پروتئین‌های تا نخورده در شبکه آندوپلاسمی را کاهش می‌دهد و می‌تواند عصب‌ها را تحت شرایط ایسکمی و صدمات ناشی از تشنج با کاینیک اسید حفظ کند. کاینیک اسید (Kainic acid) از طریق تحریک گیرنده‌های

گلوتاماتی موجب ایجاد تشنج می‌شود. همچنین، تزریق داخل بطنی سالوبرینال، خواب بدون حرکات سریع چشم [(Non-Rapid Eye Movement NREM)] را افزایش می‌دهد و هموستاز خواب را تعدیل می‌کند و با فعال‌سازی عصب‌های محرک خواب و مهار کردن عصب‌های محرک بیداری، باعث القاء احساس خواب می‌شود. این ماده شدت و عمق خواب Non-REM و شدت امواج دلتا را در الکتروانسفالوگرام [Electroencephalography (EEG)] افزایش می‌دهد [۵].

در گزارش دیگری مشخص شده است که سالوبرینال عصب‌های سازنده گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز [Glutamic acid decarboxylase (GAD)] را در بخش تاجی هسته پری‌آپتیک افزایش می‌دهد. به علاوه این ماده سطح فعالیت عصب‌های کولینرژیک و نیز تعداد عصب‌های کولینرژیک بیان‌کننده کولین استیل ترانسفراز [Choline acetyl transferase (ChAT)] را در بخش ماگنوسولولار مغز قدامی (Magnocellular basal forebrain) کاهش می‌دهد [۶]. از طرف دیگر، فعال شدن سیستم گابارژیک و مهار سیستم کولینرژیک هر دو می‌توانند موجب مهار تشنج شوند [۷-۸].

بر اساس این شواهد فرض مطالعه حاضر این است که، سالوبرینال می‌تواند با افزایش فعالیت سیستم گابارژیک و مهار سیستم کولینرژیک حملات تشنجی را تضعیف یا مهار نماید. طبق این فرضیه، آزمایشی طراحی شد که در آن اثر تزریق داخل بطنی سالوبرینال را بر تشنجات ناشی از پنتیلن تترازول (Pentylentetrazol, PTZ) بررسی شود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه آزمایشگاهی به روش زیر انجام شد:

مواد شیمیایی: انواع نمک‌ها برای ساخت مایع مغزی نخاعی از شرکت کیمیاگستر (تهران، ایران) تهیه شد. دیازپام از شرکت داروسازی ابوریحان (تهران، ایران) و سالوبرینال از شرکت مهسا دارو نمایندگی سانتاکروز (Santa cruz, USA) تهیه شد.

حیوانات: در این تحقیق تجربی از ۲۸ سر موش صحرایی نر، نژاد ویستار در ۴ گروه ۷ تایی و در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات در حیوان‌خانه با درجه حرارت ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعته بوده و با دسترسی آزاد به آب و غذا، نگهداری شدند. پس از جراحی به منظور جلوگیری از آسیب در محل جراحی، حیوانات در قفس‌های جداگانه نگهداری می‌شدند.

تهیه الکتروود و کانول: برای ثبت فعالیت‌های عصبی مغز حیوانات تشنجی از الکتروودهای تک قطبی استفاده شد. جهت تهیه الکتروودهای تک قطبی که به عنوان الکتروودهای Earth, Record و Differential می‌باشند از سیم مسی پوشش دار استفاده گردید. برای این منظور، قطعه‌ای از سیم مسی به طول ۳ الی ۴ سانتی‌متر را قطع کرده و به یک انتهای آن پین سوکت مخابراتی و به انتهای دیگر یک پیچ عینک لحیم گردید. برای تزریق دارو به داخل بطن مغزی از سر سوزن ۳۰ به عنوان کانول تزریق و از سر سوزن ۲۷ به عنوان کانول راهنما استفاده شد. به منظور قرار گرفتن کانول تزریق در محل مورد نظر، کانول راهنما هنگام جراحی، در فاصله یک میلی‌متر بالاتر از بطن جانبی مغز قرار گرفته و توسط سیمان دندانپزشکی ثابت

شد. بعد از جراحی به منظور جلوگیری از ورود مواد خارجی به درون کانول راهنما از سرسوزن ۳۰ به عنوان درپوش استفاده گردید.

جراحی: برای بیهوش کردن حیوان، از مخلوط کتامین و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به صورت تزریق داخل صفاقی استفاده گردید. پس از بیهوش کردن، حیوان به گونه‌ای درون دستگاه استریوتاکسی قرار داده شد، که جمجمه حیوان کاملاً در وضعیت افقی قرار گیرد. پس از ایجاد برش در روی جمجمه، کانول راهنما در بطن جانبی راست مغز کار گذاشته شد که مختصات آن بر اساس اطلس پاکسینوز [۹]، به صورت ۰/۲ میلی‌متر به جلو و ۰/۴ میلی‌متر به سمت راست نسبت به برگما و ۰/۳ میلی‌متر زیر سخت شامه بود.

پس از تعیین دقیق نقاط فوق بر روی جمجمه با استفاده از مته دندانپزشکی، جمجمه را در آن نقطه سوراخ کرده و سپس الکتروود و کانول را در محل‌های مخصوص به خود قرار داده و توسط سیمان دندانپزشکی در محل خود محکم گردید. قبل از کارگذاری کانول، الکتروودهای تک قطبی که به عنوان Earth, Record و Differential استفاده می‌شدند، توسط پیچ‌های متصل به آن‌ها به ترتیب روی استخوان‌های آهیانه راست، چپ و استخوان پیشانی جمجمه محکم شدند.

ایجاد تشنج: به منظور ثبت امواج EEG می‌باشد، الکتروود ثبات و الکتروودهای تک قطبی که روی جمجمه حیوان متصل شده بودند توسط یک سیم شیلددار به آمپلی‌فایر (High gain coupler) در دستگاه PowerLab متصل گردید. خروجی آمپلی‌فایر بوسیله برد A/D به کامپیوتر متصل شده و ثبت توسط برنامه کامپیوتری انجام

۲- مدت زمان تخلیه‌های الکتریکی تشنجی مغز (Epileptic Discharge Duration, (EDD): مدت زمانی که مغز امواج تشنجی نشان می‌دهد.

۳- مدت زمان حمله تشنج در فاز حملات تونیک - کلونیک (Ictal Discharge Duration, (IDD):

برای اندازه‌گیری این کمیت که بیانگر مدت زمانی است که حیوان در مرحله تشنج به سر می‌برد، زمان، بین لحظه تحریک تا لحظه‌ای که حیوان از حالت تشنج خارج می‌شود اندازه‌گیری گردید.

۴- مراحل مختلف تشنج: مراحل مختلف تشنج بر اساس معیار اصلاح شده Racine [۱۰]، به شرح زیر درجه‌بندی می‌شوند:

مرحله ۰: بدون پاسخ، مرحله ۱: تکان‌های (انقباضات) ناگهانی گوش و صورت، مرحله ۲: تکان‌های میوکلونیک بدون بلند شدن روی پاها (Rearing)، مرحله ۳: کلونوس یک طرفه اندام‌های جلویی، مرحله ۴: بلند شدن روی دو پا (Rearing) و کلونوس دست‌ها و گاهی خم شدن حیوان به یک طرف، مرحله ۵: از دست دادن تعادل حیوان و بروز حملات عمومی در همه اندام‌ها (حملات تونیک-کلونیک)

روش تزریق زیر پوستی و داخل مغزی دارو: برای انجام این تزریق دوز مشخصی از دارو را توسط سرنگ انسولین کشیده و با بالا گرفتن پوست پشت گردن حیوان، مثلی در جلوی ناحیه گرفته شده به وجود می‌آید، آنگاه دارو در بخش تحتانی مثلث تزریق می‌شود. برای تزریق دارو به داخل بطن مغزی، از لوله پلی‌اتیلنی (PE-20) ساخت شرکت Stoelting که یک سر آن به سرسوزن ۳۰ متصل شده بود، استفاده گردید. قبل از تزریق دارو، لوله مزبور و سرسوزن که ابتدا با آب مقطر استریل و سپس با داروی استریل شستشو داده شده بود از دارو پر شده، بعد سر آزاد

شد. پس از پایان هر ثبت، کمیت‌های الکتروفیزیولوژیک به وسیله نرم‌افزار EEG/EPG اندازه‌گیری گردید.

پس از دوره بهبودی، هر حیوان جهت انجام مطالعات به شکل جداگانه نگهداری می‌شد. هر حیوان در شروع آزمایش قبل از این که PTZ دریافت نماید، بوسیله رابط سوکت‌دار به PowerLab متصل می‌شد و برای ۲ دقیقه ثبت انسفالوگرام انجام گرفت. این ثبت پایه به دو منظور انجام شد: اول این که از نداشتن اغتشاش الکتریکی و یا سیگنال‌های ناخواسته اطمینان حاصل شود و دیگر این که ثبت پایه به عنوان معیاری برای تغییر آمپلی تود انسفالوگرام در شرایط تزریق دارو و PTZ در نظر گرفته شود.

پس از این مرحله به هر موش نخست، مایع مغزی نخاعی صناعی [artificial cerebrospinal fluid (aCSF)] که محتوی DMSO به میزان ۱/۰٪ بود و یا سالوبرینال تزریق شد و دوباره برای مدت ۵ دقیقه ثبت گرفته شد. این ثبت به منظور دادن فرصت برای اعمال اثر دارو و نیز بررسی اثر دارو بر EEG داده شد. در مرحله بعد، داروی تشنج‌زای PTZ به شکل زیر پوستی (Subcutaneous) تزریق و برای ثبت انسفالوگرام و کمیت‌های تشنجی به مدت ۶۰ دقیقه ثبت انجام شد و رفتار حیوان مورد ارزیابی قرار گرفت. کمیت‌های رفتاری مشاهده شده و نیز الکتروفیزیولوژیک به شرح ذیل اندازه‌گیری شد:

۱- مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع حملات تونیک - کلونیک Generalized Tonic-Clonic Seizures (GTCS): برای اندازه‌گیری این کمیت، فاصله زمانی بین شروع تحریک الکتریکی تا شروع حملات تونیک - کلونیک محاسبه می‌گردید.

محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. بعد از یک هفته از محل کانول، برش‌گیری به عمل آمده تا محل الکترود و کانول مشخص شود. در همه آزمایش‌ها، فقط داده‌های مربوط به موش‌هایی که جایگاه الکترود و کانول طبق مطالعه بافت‌شناسی درست بود، مورد ارزیابی نهایی قرار می‌گرفت.

روش تجزیه و تحلیل آماری: برای مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف سالوبرینال و دیازپام با aCSF در زمان‌های پس از تزریق دارو بر کمیت‌های تشنج، از آزمون ANOVA یک طرفه و پس از آزمون TUKEY استفاده شد. برای یافتن اختلاف معنی دار در درصد بروز تشنج و مرگ‌ومیر در هر دو گروه از پس آزمون multiple comparison استفاده گردید. نتایج مربوط به مراحل تشنجی بوسیله آزمون آنالیز واریانس از نوع ناپارامتری Kruskal-Wallis مقایسه و آزمون آماری Duncan برای مقایسه گروه‌ها با گروه کنترل به کار گرفته شد. ارائه نتایج براساس Median±interquartile و Mean±SEM است.

نتایج

الف- اثر دوزهای مختلف سالوبرینال بر تأخیر در زمان شروع حملات تونیک-کلونیک (GTCS):
نتایج به دست آمده از این گروه نشان می‌دهد که حیوانات گروه کنترل که دوز ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم PTZ دریافت نموده‌اند، مدت زمان تأخیر GTCS بسیار کمتر را نسبت به گروه‌های دیگر نشان می‌دهند. داده‌هایی که در نمودار نشان داده شده است، عکس زمان GTCS یا GTCS/۱ می‌باشند و افزایش آن نشان‌دهنده کوتاه بودن این تأخیر نسبت به سایر گروه‌ها می‌باشد. اثرات

لوله پلی‌اتیلنی به سرنگ همیلتون متصل گردید. در نهایت با استفاده از سرنگ همیلتون و با سرعت تزریق ۲ میکرولیتر در ۵ دقیقه داروها یا حلال در حجم ۲ میکرولیتر تزریق شد.

گروه‌های مورد مطالعه

در این آزمایش از ۴ گروه موش صحرایی نر به شرح زیر استفاده شد:

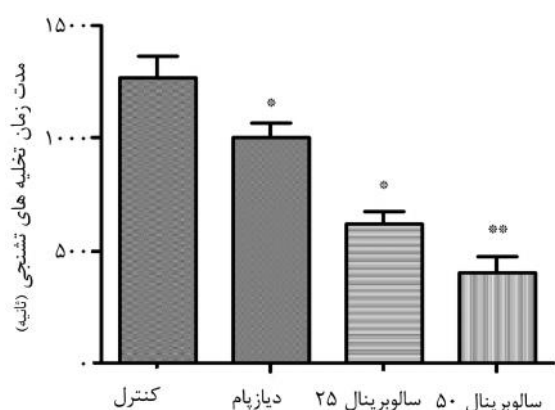
الف- گروه کنترل: از حیوانات این گروه پس از کاشتن الکترود و کانول و طی کردن دوره بهبودی در روز آزمایش، ابتدا ثبت پایه گرفته شد و سپس به هر حیوان ۲ میکرولیتر aCSF به داخل بطن جانبی راست تزریق شد.

ب- گروه کنترل مثبت: موش‌ها در این گروه همان روند موش‌های گروه "الف" را طی می‌کنند، با این تفاوت که در این گروه به جای aCSF، دوز ۰/۲ میلی‌گرم دیازپام به ازای هر حیوان دریافت می‌کنند.

ج- گروه سالوبرینال ۲۵: حیوانات این گروه نیز با گذراندن روشی مشابه گروه کنترل با این تفاوت که به جای aCSF، سالوبرینال در دوز ۲۵ میکروگرم به ازای هر حیوان با مشخصات تزریق فوق (سرعت ۲ میکرولیتر در ۵ دقیقه و حجم تزریق نهایی ۲ میکرولیتر) تیمار شدند.

د- گروه سالوبرینال ۵۰: حیوانات این گروه نیز با گذراندن روشی مشابه گروه کنترل با این تفاوت که به جای aCSF، سالوبرینال در دوز ۵۰ میکروگرم به ازای هر حیوان با مشخصات تزریق فوق (سرعت ۲ میکرولیتر در ۵ دقیقه و حجم تزریق نهایی ۲ میکرولیتر) تیمار شدند.

تأیید بافت‌شناسی: پس از پایان هر آزمایش جهت اطمینان از قرار داشتن الکترود و کانول در جایگاه صحیح، به محل کانول رنگ متیلن بلو (۰/۲۵ میکرولیتر در دقیقه، ۰/۵ میکرولیتر) تزریق شد. سپس مغز حیوانات خارج و در

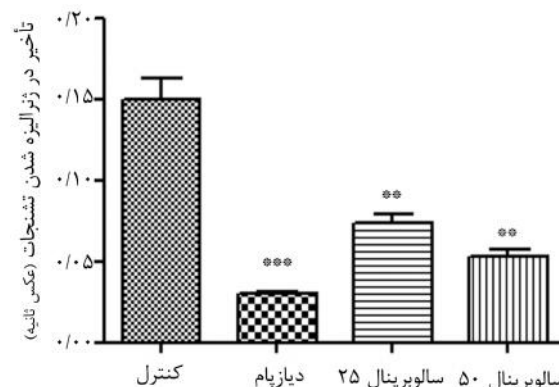


نمودار ۲- اثر تزریق دوزهای مختلف سالوبرینال بر مدت زمان تخلیه های تشنجی مغز به دنبال تزریق PTZ سالوبرینال در هر دو دوز، کاهش معنی داری را در مدت زمان تخلیه های تشنجی مغز ایجاد کرده است. آزمون آماری ANOVA و پس آزمون Dunnett's مورد استفاده قرار گرفته است. * و ** به ترتیب اختلاف معنی داری ($p < 0.05$ و $p < 0.01$) با گروه کنترل را نشان می دهد. * ** نشان دهنده اختلاف معنی داری بین گروه سالوبرینال ۵۰ و دیازپام می باشد. تمامی داده ها بر اساس $Mean \pm SEM$ گزارش شده اند.

ج- اثر دوزهای مختلف سالوبرینال بر مدت زمان امواج تشنجی در فاز حملات تونیک - کلونیک (IDD):

همان طوری که در نمودار ۳ مشاهده می شود، سالوبرینال علاوه بر کاهش مدت زمان تخلیه های متعاقب که در قبل توضیح داده شد، توانسته است در هر دو غلظت استفاده شده تقریباً به یک اندازه بر مدت زمان حملات تشنجی در فاز حمله اثر کرده و آنها را نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش دهد. این نشان می دهد که سالوبرینال می تواند سطح تحریک پذیری عصب های مغزی را به شدت کاهش داده و مانع تخلیه های تشنجی آنها شود. دیازپام هم در این آزمایش اثرات معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داده است. تفاوتی بین گروه های سالوبرینال و دیازپام دیده نشد.

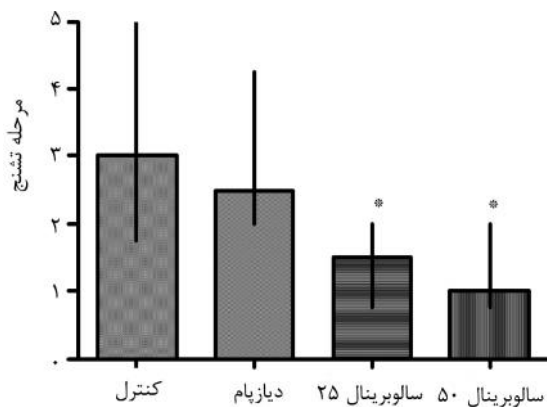
سالوبرینال و دیازپام بر تأخیر از GTCS از لحاظ آماری معنی دار است ($p < 0.01$) (شکل ۱).



نمودار ۱- اثر تزریق داخل بطنی دوزهای مختلف سالوبرینال و دیازپام، تأخیر در شروع حملات ناشی از تزریق زیر پوستی PTZ سالوبرینال در هر دو دوز و دیازپام در دوز ۰/۲ میلی گرم توانسته است GTCS را به تأخیر بیاورد. آزمون آماری مورد استفاده ANOVA و پس آزمون Dunnett's می باشد. * یعنی اختلاف معنی دار با گروه کنترل با $p < 0.05$. Con. کنترل، DZP: دیازپام ۰/۲ میلی ۳ گرم، Salubrinal 25, 50: سالوبرینال دوز ۲۵ و ۵۰ میلی گرم، *generalized tonic - clonic seizure latency: GTCS*

ب- اثر تزریق داخل بطنی دوزهای مختلف سالوبرینال بر مدت زمان تخلیه های الکتریکی تشنجی مغز (EDD):

همان طوری که در نمودار ۲ نشان داده شده است سالوبرینال در دوزهای ۲۵ و ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم، مانند دیازپام توانسته است مدت زمان تخلیه های الکتریکی تشنجی مغز را کاهش دهد. اثر سالوبرینال در کاهش EDD، وابسته به دوز است، به طوری که سالوبرینال با دوز ۵۰ با $p < 0.01$ و با دوز ۲۵ با $p < 0.05$ مدت زمان تخلیه های تشنجی را کاهش داده است. مدت زمان تخلیه های تشنجی در گروه کنترل 1245 ± 45 ثانیه و در گروه سالوبرینال ۵۰، به 400 ± 55 ثانیه می رسد. اثر سالوبرینال بر روی EDD نسبت به سالوبرینال در هر دو دوز به طور معنی داری کمتر بود.

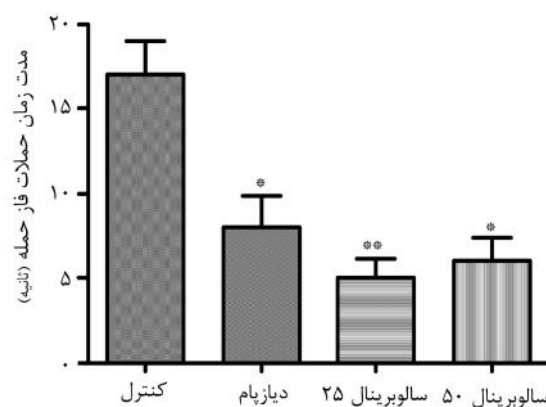


نمودار ۴- اثر تزریق دوزهای مختلف سالوبرینال (۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم) بر بروز مراحل مختلف تشنجی در موش‌های صحرایی دریافت‌کننده PTZ بر خلاف دیازپام، سالوبرینال در هر دو دوز توانسته است مراحل مختلف تشنجی را که حیوانات پس از دریافت PTZ نشان می‌دهند را به تعویق بیاورد. آزمون آماری برای پی بردن به اختلاف بین گروه‌ها *Kruskal-Wallis ANOVA* و پس آزمون تکمیلی *Dunnett* می‌باشد. همه داده‌ها بر اساس $Median \pm interquartile$ نشان داده شده‌اند. * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین هر گروه با کنترل می‌باشد.

۵- اثر دوزهای مختلف سالوبرینال بر درصد حیواناتی که حملات تونیک-کلونیک نشان دادند و همچنین، میزان مرگ و میر در حیوانات. درصد حیواناتی که به واسطه PTZ دچار حملات کامل تشنجی شده‌اند در گروه سالوبرینال کمتر از گروه‌های دیگر بود. به همین شکل حیوانات تحت درمان با سالوبرینال، متعاقب دریافت PTZ هیچ‌گونه مرگ و میری نداشتند و مرگ و میر در گروه سالوبرینال از گروه کنترل کمتر بود ($p < 0.001$) (جدول ۱).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که سالوبرینال به عنوان یک مهارکننده سنتز پروتئین، وقتی به داخل بطن مغزی تزریق می‌شود می‌تواند اثرات ضد تشنجی در مدل حاد با



نمودار ۳- اثر تزریق دوزهای مختلف سالوبرینال (۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم) بر مدت زمان حملات تشنجی در فاز حمله (IDD). همان‌طوری که در شکل مشخص است، سالوبرینال در هر دوز ۲۵ و ۵۰ به ترتیب با $p < 0.01$ و $p < 0.05$ توانسته است مدت زمان این حملات را کاهش دهد. این آثار مانند اثر دیازپام می‌باشد. آزمون آماری *ANOVA* و پس آزمون تکمیلی *TUKEY* برای اختلاف بین هر دو گروه استفاده شده است. * و ** به ترتیب اختلاف معنی‌دار $p < 0.05$ و $p < 0.01$ نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. تمامی داده‌ها بر اساس $Mean \pm SEM$ گزارش شده‌اند.

د- اثر دوزهای مختلف سالوبرینال بر مراحل مختلف تشنج (مقیاس Racine)

نتایج مقایسه بین گروه‌ها نشان داد که مراحل مختلف تشنج در گروه‌های دریافت‌کننده سالوبرینال در دوزهای ۲۵ و ۵۰ به طور معنی‌داری کمتر از گروه دریافت‌کننده حلال است. همان‌طوری که در نمودار ۴ نشان داده شده است، حیوانات گروه کنترل که حلال سالوبرینال دریافت کرده‌اند به طور میانگین مراحل ۳ و ۴ تشنجی را پس از تزریق PTZ نشان داده‌اند. مفهوم این مراحل، توسعه بیشتر تشنج و تکوین مراحل تشنج عمومی است (نمودار ۴).

پنتیلین تترازول (PTZ) داشته باشد. همان طور که در نتایج نیز گزارش شده است، سالوبرینال می تواند بروز حملات تونیک-کلونیک ناشی از PTZ را در حیوانات آزمایشگاهی کاهش دهد. علاوه بر این، مدت زمان حملات تشنجی و به عبارت دیگر مدت زمان تخلیه های الکتریکی تشنجی مغز را در حین حمله تشنجی کاهش می دهد. بر اساس نتایج این مطالعه، سالوبرینال توانسته است حملات تشنجی ناشی از تزریق تک دوز PTZ را کاهش دهد و مانع حملات فاز حاد تشنج شود.

سابقه مصرف مهارکننده های سنتز پروتئین در کنترل صرع به سال ۱۹۷۹ و مطالعه Jones و همکارانش و Cain و همکارانش بر می گردد [۱۱-۱۲] که از Anisomycin و Cycloheximide در دوز ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم موش صحرایی و به صورت داخل صفاقی استفاده کرده اند، هر دوی این داروها، مهار کننده سنتز پروتئین هستند و می توانند موجب مهار پیشرفت تشنج در مدل الکتریکی کیندلینگ شوند. مکانیسم این دو عامل در تعویق حملات تشنجی، مهار سنتز پروتئین های سیناپسی ذکر شده است که در القاء و پیشرفت تشنج دخیل هستند [۱۳]. به هر شکل نتایج پژوهش حاضر با مطالعه Jones و همکارانش همسو بوده و هر دو اثرات ضد تشنجی را نشان داده اند.

مطالعات زیادی، نیاز به سنتز پروتئین در حین ایجاد تشنج را، ثابت کرده است. سازوکارهای یادگیری و حافظه، مانند تقویت دراز مدت فعالیت سیناپسی (Long-term potentiation, LTP) با مکانیسم های شکل گیری تشنج و کیندلینگ مشابه هستند [۱۴-۱۵]. هر دو این پدیده ها می توانند بوسیله تحریک الکتریکی با فرکانس بالا ایجاد

شوند. به هر حال در حین یادگیری و همانند آن در حین کیندلینگ و تشنج به سنتز پروتئین های جدید نیاز است [۱۶-۱۸]. در همین راستا مطالعه ای مشابه با مطالعه حاضر توسط Maciejak و همکارانش در سال ۲۰۱۰ انجام شد. در این مطالعه تزریق داخل مغزی سیکلو هگزامید به عنوان مهار کننده سنتز پروتئین توانست تشنجات ناشی از PTZ را مهار کند [۱۹].

در مطالعات قبلی همچنین اثرات ضد تشنجی سایر مهار کننده های سنتز پروتئین مطالعه شده است [۲۱-۲۰]. در این مطالعات از مدل های تشنجی متفاوت نسبت به مطالعه حاضر استفاده شده است ولی نتایج یکسانی به دست آمده است. تفاوت این مطالعه با مطالعات قبلی در این است که، سالوبرینال یک مهار کننده جدید سنتز پروتئین است که می تواند اثرات خود را حتی در زمان کوتاهی قبل از تجویز PTZ بر جای بگذارد، در حالی که در مطالعه قبل اثرات داروهای مهار کننده سنتز پروتئین حداقل ۴ ساعت قبل از تجویز PTZ آشکار می شدند [۲۲]. مکانیسم های دخیل در اثرات مهاری مهار کننده های سنتز پروتئین مانند سیکلو هگزامید بر تشنج هنوز به خوبی مطالعه نشده است.

در این مدل و مطالعه حاضر از PTZ برای تشنج استفاده شده و PTZ آنتاگونیست خیلی قوی و غیر رقابتی گیرنده های GABA است [۲۳] و این ماده سریعاً در دسترس همه دستگاه های بدن قرار می گیرد و زمان کوتاهی طول می کشد تا حداکثر اثرات خود را نشان دهد. مطالعات پیشین نشان داده است که PTZ سبب افزایش

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد برای تأمین بودجه این تحقیق و همچنین، از آقای علی محمد موحدی برای کمک‌های فنی که انجام داده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

آزادسازی نوروترانسمیترهای تحریکی مانند اسیدهای آمینه گلوتامات و آسپارات نیز می‌شود [۲۴].

نتیجه‌گیری

به طور کلی، این شواهد نشان می‌دهند که تزریق داخل بطنی سالوبرینال به عنوان داروی مهارکننده سنتز پروتئین در مدل آزمایشگاهی تشنج می‌تواند حملات تشنجی را مهار نماید.

References

- [1] Scharfman HE. The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2007; 7(4): 348-54.
- [2] Giblin KA, Blumenfeld H. Is epilepsy a preventable disorder? New evidence from animal models. *Neuroscientist* 2010; 16(3): 253-75.
- [3] Long K, Boyce M, Lin H, Yuan J, Ma D. Structure-activity relationship studies of salubrinal lead to its active biotinylated derivative. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15(17): 3849-52.
- [4] Kessel, D. Protection of Bcl-2 by salubrinal. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346: 1320-3.
- [5] Methippara MM, Bashir T, Kumar S, Alam N, Szymusiak R, McGinty D. Salubrinal, an inhibitor of protein synthesis, promotes deep slow wave sleep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296: 178-84.
- [6] Methippara M, Mitrani B, Schrader Fx, Szymusiak R, McGinty D. salubrinal, an endoplasmic reticulum stress blocker, modulates sleep homeostasis and activation of sleep- and wake-regulatory neurons. *Neuroscience* 2012; 209: 108-18.
- [7] Methippara MM, Alam MN, Kumar S, Bashir T, Szymusiak R, McGinty D. Administration of the protein synthesis inhibitor, anisomycin, has distinct sleep-promoting effects in lateral preoptic and perifornical hypothalamic sites in rats. *Neuroscience* 2008; 151: 1-11.

- [8] Gong H, McGinty D, Guzman-Marin R, Chew KT, Stewart D, Szymusiak R. Activation of c-fos in GABAergic neurones in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation. *J Physiol* 2004; 556: 935-46.
- [9] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA: Academic 1998.
- [10] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32: 281-94.
- [11] Jones V, Claude G, Wasterlain. Effect of inhibitors of protein synthesis on the development of kindled seizures in rats. *Exp Neurol* 1979; 66(3): 524-32.
- [12] Cain DP, Michael EC, William AS. Effects of protein synthesis inhibition on kindling in the mouse. *Exp Neurol* 1980; 68: 409-19.
- [13] Wasterlain CG. Inhibition of cerebral protein synthesis by epileptic seizures without motor manifestations. *Neurology* 1974; 24: 175-5.
- [14] Baudry M. Long-term potentiation and kindling: similar biochemical mechanisms? *Adv Neurol* 1986; 44: 401.
- [15] Pastalkova E, Peter S, Deana P, Emma W, André Antonio F, Todd CS. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 2006; 313: 1141-4.
- [16] Duvarci S, Karim N, and Joseph EL. De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. *Learning Memory* 2008; 15: 10747-55.
- [17] Blundell J, Kouser M, Powell CM. Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem* 2008; 90: 28-35.
- [18] Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Am Neurol* 1989; 26: 321-30.
- [19] Maciejak P, Szyndler J, Lehner M, Turzy ska D, Sobolewska A, Bidzi ski A,etal. The differential effects of protein synthesis inhibition on the expression and reconsolidation of pentylenetetrazol kindled seizures. *Epilepsy Behavr* 2010; 18: 193-200.
- [20] Oretti R, Samina B, Christopher JM, Badawy A, Adrian B, Buckland P, Mcguffin P. Prevention by cycloheximide of the audiogenic seizures and tryptophan metabolic disturbances of ethanol withdrawal in rats. *Alcohol Alcoholism* 1996; 31: 243-7.
- [21] Karasik GI. Effect of puromycin and cycloheximide on the course of audiogenic epileptic seizures in rats. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 1976; 26(3): 633-8.
- [22] Ogata N. Effects of cycloheximide on experimental epilepsy induced by daily amygdaloid stimulation in rabbits. *Epilepsia* 2007; 18(1): 101-8.

- [23] Onozuka M, Kin-Ya K, Ozono S. The molecular mechanism underlying pentylentetrazol-induced bursting activity in Euhadra neurons: involvement of protein phosphorylation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 1991; 100: 423-32.
- [24] Li ZP, Zhang XY, Lu X, Zhong MK, Ji YH. Dynamic release of amino acid transmitters induced by valproate in PTZ-kindled epileptic rat hippocampus. *Em InNeurocht* 2004; 44: 263-70.

Effects of Intracerebroventricular Administration of Salubrinal-A Protein Synthesis Inhibitor-on Epileptic Seizures Induced by Pentylentetrazol in Male Rats

M. Izadi¹, M.E. Rezvani², M. Esmailidehaj³

Received: 15/12/2013 Sent for Revision: 01/02/2014 Received Revised Manuscript: 15/04/2014 Accepted: 21/04/2014

Background and Objective: Salubrinal- a protein synthesis inhibitor- plays a crucial role in sleep and neuronal inhibition through the GABA activation. According to these evidences, the aim of the present study was to determine the effect of salubrinal on epileptic seizures induced by pentylentetrazol (PTZ).

Materials and Methods: In this experimental study under stereotaxical surgery, three monopolar electrodes were fixed on the skull bone of animals and a cannula was implanted in the right cerebral ventricle according to Paxinos coordinates. After 7 days of recovery, each animal received intracerebroventricular (ICV) vehicle, diazepam (0.2 mg/rat) or salubrinal (25 or 50 µg/rat) 10 minutes before Pentylentetrazol injection (subcutaneous, 60mg/kg). Electrophysiological and behavioral parameters of induced seizures were recorded during 60 minutes.

Results : Salubrinal (25 and 50 µg/rat) significantly retarded the onset of generalized tonic-clonic seizures when compared to vehicle treatment ($p<0.05$). Epileptic discharge duration and ictal discharge duration were significantly shortened in salubrinal treated rats ($p<0.05$). Additionally, the rats treated with salubrinal (25 and 50 µg/rat) had lower seizure stage scores, as compared to vehicle treated rats ($p<0.05$).

Conclusion : The findings of this study revealed that shortly after ICV. administration of salubrinal, epileptic seizures can be significantly decreased. Also, the findings suggest that protein synthesis is an essential process during development of epileptic seizures.

Key words : Seizure, Salubrinal, Protein synthesis inhibitor, Rat, Pentylentetrazol

Funding: This research was funded by Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Research Committee of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences approved the study.

How to cite this article: Izadi M, Rezvani ME, Esmailidehaj M. Effects of Intracerebroventricular Administration of Salubrinal-A Protein Synthesis Inhibitor-on Epileptic Seizures Induced by Pentylentetrazol in Male Rats. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2014; 13(3): 281-92. [Farsi]

1- MSc of Dept. of Physiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

2- Associate Prof., Dept. of Physiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
(Corresponding Author) Tel: (0351) 8203410, Fax: (0351) 8203414, Email: erezvani@yahoo.com

3- Associate Prof., Dept. of Physiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran