مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۴، ۴۹۸-۴۹۱
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2017.239622.2684

تأثیر تجویز حاد دوکوزاهگزانوئیک اسید به موش‌های سوری مقاوم به داروهای ضدصرع در مدل الکتریکی ۶Hz

ملیکا معزی فر[۱،۲] محمد سیاح[۱] مرتضی زنده دل[۲*] وهاب باباپور[۲]
۱) گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور، تهران، ایران
۲) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۲۴ خرداد ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۴ شهریور ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری صرع یک اختلال نورولوژیکی مزمن است که علی‌رغم کشف داروهای مؤثر، هنوز بیش از ۳۰٪ از بیماران نسبت به داروهای ضدصرع رایج مقاوم هستند. **هدف:** بررسی اثر تجویز حاد دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) در پیشگیری از بروز مقاومت به داروهای لاموتریجین و فنی‌توئین در مدل تشنجی ۶Hz. در موش سوری نر. **روش کار:** ابتدا اثرات تجویز داخل بطن مغزی و خوراکی DHA و داروها به‌صورت جداگانه بررسی شد سپس در گروه‌های تست داروی فنی توئین یا لاموتریجین با دوز ۲۵ mg/kg به‌صورت داخل صفاقی تزریق شدند. در مورد فنی‌توئین بعد از یک ساعت و ۴۵ دقیقه و در مورد لاموتریجین بعد از ۴۵ دقیقه، DHA با دوز ۱ mM داخل بطن مغز موش‌ها تزریق شد. در گروه‌های شاهد حلال داروها یا حلال DHA به موش‌ها تجویز گردید. ۱۵ دقیقه بعد از تجویزداخل بطن مغزی DHA یا حلال DHA در تمام گروه‌ها پروتکل ۶Hz اجرا شد و رفتارهای تشنجی ثبت گردید. در گروه‌های تست خوراکی ابتدا داروی فنی‌توئین یا لاموتریجین با دوز ۲۵ mg/kg به‌صورت داخل صفاقی تزریق شدند، در مورد فنی‌توئین بعد از یک ساعت و در مورد لاموتریجین هم‌زمان با تزریق دارو DHA با حجم ۰/۱ ml به موش‌ها گاواژ شد و ۱ ساعت بعد از دریافت DHA پروتکل ۶Hz اعمال گردید. **نتایج:** تجویز حاد DHA به‌تنهایی به‌صورت تزریق داخل بطن مغز یا خوراکی تأثیری در مهار تشنج‌ها نداشت. همراه شدن DHA با داروی لاموتریجین یا فنی‌توئین نیز نتوانست مقاومت به این داروها را مهار کند. **نتیجه‌گیری نهایی:** تجویز حاد DHA نمی‌تواند موجب مهار بروز مقاومت به داروهای لاموتریجین و فنی‌توئین در مدل ۶Hz گردد. همچنین مصرف تک دوز DHA هم‌زمان با داروهای ضدصرع نیز تأثیری در مهار بروز مقاومت دارویی در بیماران مصروع دارای مقاومت دارویی ندارد.

واژه‌های کلیدی: دوکوزاهگزانوئیک اسید، صرع مقاوم به دارو، مدل ۶Hz، موش سوری

مقدمه

بیماری صرع نوعی اختلال نورولوژیکی مزمن بوده که به وسیله تشنج‌های خودبه‌خودی برگشت‌پذیر شناخته می‌شود و باعث اختلال عملکرد مغز می‌گردد (۱۹). این بیماری ۱٪ از جمعیت کل جهان را درگیر کرده است، اگرچه تشنج‌های صرعی تکرارشونده علامت بالینی این بیماری است اما پروسه بیماری قبل از بروز اولین تشنج آغاز می‌گردد (۱۱). در طول ۳ دهه گذشته، با معرفی بیش از ۱۵ داروی ضدصرع نسل سوم، قدرت انتخاب فراوانی برای پزشکان و بیماران فراهم شده است. متاسفانه علی‌رغم این پیشرفت‌ها هنوز ۳۰-۲۰٪ بیماران به داروهای ضدصرع رایج مقام هستند. مقاومت دارویی مشکل اصلی در کنترل این بیماری است که مکانیسم‌های آن هنوز کاملاً روشن نشده است. چند فرضیه برای علت مقاومت دارویی مطرح شده که برخی از آن‌ها دارای شواهد مستدل‌تری بوده است. مهمترین این فرضیات فرضیه ناقل دارو (Transporter) می‌باشد. خلاصه این فرضیه این است که علی‌رغم وجود غلظت درمانی داروی ضدصرع در خون، دارو به‌اندازه لازم در داخل سلول‌های مغزی تجمع نمی‌یابد و این امر عدم کنترل تشنجات را به‌دنبال دارد. علت این پدیده بیان بیش از حد ناقلی بنام گلیکوپروتئین P (pg-p) یا Multidrug Resistance Protein (MDR۱) می‌باشد که دراندوتلیوم عروق مغزی مستقر بوده و با صرف انرژی دارو را از داخل سلول عصبی به بیرون اخراج می‌کند. به هر حال هیچ‌کدام از فرضیه‌های مطرح شده در این رابطه نمی‌تواند ایجاد مقاومت دارویی در انسان را توضیح دهد و مجموعه‌ای از این عوامل مسئول بروز مقاومت دارویی هستند (۱۱)؛ بنابراین، بخشی از تحقیقاتی که در این حوزه صورت می‌گیرد استفاده از داروها برای غلبه بر مقاومت دارویی می‌باشد.

اسیدهای چرب غیراشباع امگا ۳ (Polyunsatyrated Fatty-n۳ acids, PUFA) موجود در غذاهای دریایی و گیاهان به عنوان مکمل به همراه درمان دارویی در بیماران صرعی مطرح هستند (۲۴). PUFAs لیپیدهای مشتق شده از رژیم غذایی هستند که بیش از یک پیوند دوگانه داشته و برای رشد و عمل طبیعی مغز ضروری هستند. ۲ گروه PUFAs به نام‌های گروه امگا ۳ و گروه امگا ۶ وجود دارد که اثرات ضدتشنجی آن‌ها در مدل‌های مختلف حیوانی نشان داده شده است (۱۶). اسیدهای چرب امگا ۳ شامل ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) می‌باشند. از بین تمام ارگان‌های بدن بعد از بافت چربی، سیستم عصبی مرکزی دارای بیشترین محتوای چربی است. حدوداً ۶۰٪ از وزن ماده خشک مغز از چربی تشکیل شده که ۳۰٪ آن PUFAs هستند. برخلاف داروهای ضدصرع موجود، PUFAs سوبسترای MDR۱ نیستند. این پمپ در سد خونی مغزی مستقر بوده و با اخراج فعالانه دارو از مغز به داخل خون

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۰۰-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: zendedel@ut.ac.ir

مانع از رسیدن دارو به غلظت درمانی در سلول‌های عصبی شده و مقاومت دارویی به داروهای ضدصرع را موجب می‌شود (۲۰). PUFAs-n۳ از طریق افزایش آستانه پتانسیل عمل و طولانی‌تر کردن طول دوره تحریک‌ناپذیری نورون‌ها موجب اثر ضدتشنجی می‌شوند (۲،۱۶).

DHA فراوان‌ترین PUFAs-n۳ در مغز است. نورون‌ها آنزیم لازم برای سنتز DHA را ندارند بنابراین این ماده باید بطور مستقیم از رژیم غذایی به دست آید و یا در داخل بدن از آلفالینولئیک اسید (ALA) در کبد سنتز شود و به مغز منتقل گردد (۱۷،۱۸).

پیشنهاد شده است که در صرع مقاوم به دارو احتمالاً نقص در بیوسنتز DHA (نقص آنزیمی) منجر به کاهش غلظت DHA و فسفولیپیدها می‌شود و در نهایت برروی پروتئین‌های غشایی در سد خونی- مغزی تأثیر می‌گذارد. رژیم کتوژنیک می‌تواند منجر به افزایش غلظت استیل کوآنزیم A و در نتیجه افزایش غلظت استیل کارنیتین شود. که افزایش غلظت استیل کارنیتین منجر به افزایش تولید DHA می‌شود و این امر باعث تصحیح عمل فسفولیپیدها در مغز می‌شود (۹). رژیم کتوژنیک یک رژیم غذایی با چربی بالا، پروتئین پایین و کربوهیدرات خیلی کم است، که سال‌های زیادی است برای درمان صرع مقاوم به دارو استفاده می‌شود (۴). مکانیسم‌هایی که این رژیم بر اساس آن عمل می‌کند کاملاً مشخص نیست اما آن‌چه مسلم است این است که بعد از درمان با این رژیم سطح PUFA در خون و مغز افزایش می‌یابد که نقش مهمی در تنظیم تحریک‌پذیری نورون‌ها از طریق تعدیل جریان‌های سدیمی و کلسیمی دارند (۲۳).

شواهد محدودی مبنی بر جلوگیری از بروز مقاومت دارویی در دارودرمانی سرطان‌ها متعاقب اضافه کردن این روغن‌ها به محیط کشت سلول‌های سرطانی وجود دارد (۵،۷). مدل ۶Hz تنها مدل حاد با القا تشنج در حیوانات سالم است که خصوصیات صرع لیمبیک انسان را تداعی می‌کند. این مدل یک مدل مناسب، کاربردی و ارزان در بررسی تشنج‌های مقاوم به داروست. در این مدل پاسخ به دارو به شدت جریان بستگی دارد. در شدت جریان ۲۲ mA تمامی داروهای ضدصرع تست شده در این مدل از جمله فنی-توئین و لاموتریجین اثرات ضدتشنجی خود را حفظ می‌کنند اما زمانی‌که شدت جریان ۴۴ mA افزایش می‌یابد اکثر داروها اثرات ضد-تشنجی خود را از دست می‌دهند به جز لواتیراستام (با دوز بالا)، والپروات و داروهای ضدصرع نسل جدید مانند رتیگابین، بریواراستام و به این ترتیب مقاومت دارویی بروز می‌کند (۱۰،۱۳).

در مطالعه حاضر اثر تجویز حاد DHA در پیشگیری از بروز مقاومت به داروهای لاموتریجین و فنی‌توئین در مدل تشنجی ۶Hz در موش سوری بررسی شد.

مواد و روش کار

حیوانات: در این مطالعه از موش‌های سوری نر نژاد NMRI در محدوده وزنی ۳۰-۲۰ g استفاده گردید. حیوانات از انستیتو پاستور کرج تهیه شدند و در قفس‌های استاندارد با آب و غذای کافی و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی نگهداری می‌شدند و در گروه‌های ۱۰ تایی آزمایش قرار گرفتند. تمامی آزمایشات بر اساس دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران مبنی بر استفاده از حداقل تعداد حیوانات و استفاده از روش‌هایی که منجر به کمترین میزان زجر می‌گردد، صورت پذیرفت.

مواد و داروهای مورد استفاده و نحوه تجویز: دوکوزاهگزائنویک اسید (DHA) (ساخت شرکت سیگما_آلدریچ) ابتدا با هیدروکسی‌پروپیل‌بتاسیکلودکسترین ۴۰٪ (HPB) (ساخت شرکت سیگما_آلدریچ) رقیق شده و سپس جهت تزریق به درون مغز (i.c.v)، مایع مغزی‌نخاعی سنتتیک (aCSF) (شرکت سیگما_آلدریچ) را به محلول حاوی ترکیب DHA -HPB اضافه کردیم به‌طوریکه غلظت HPB در محلول نهایی به ۱۰٪ می‌رسید. DHA و حلال آن به روش Haley and McCormick به داخل بطن جانبی مغز به‌طور یک‌طرفه با کمک سرنگ هامیلتون تزریق شد (۸). تزریق در فاصله ۲ mm در هر دو طرف از تقاطع خط وسط (Midline) و خطی که در فاصله بین پایک قدامی گوش‌ها رسم می‌شود، انجام می‌شد. محافظ یا کپ سرسوزن انسولین به‌نحوی بریده می‌شد که پس از قراردادان سوزن در آن تنها ۳/۵ mm از سوزن بیرون می‌ماند. سپس سرنگ هامیلتون را به سر سوزن متصل کرده و ۱۰ µl از محلول تزریق را بداخل آن می‌کشیدیم. پس از وارد کردن سوزن به ناحیه مربوطه محلول در طی ۲ دقیقه به‌داخل بطن جانبی تزریق می‌شد. جهت اطمینان از تخلیه کامل دارو به‌درون بطن جانبی، پس از تزریق کامل محلول سوزن متصل به سرنگ به‌مدت یک دقیقه در سر حیوان نگه‌داشته می‌شد.

DHA (ساخت شرکت Bizen ژاپن با غلظت ۹۷٪) با حجم ml ۰/۱ به‌صورت خوراکی به موش‌ها گاواژ شد. به این منظور پشت گردن حیوان توسط دو انگشت شست و سبابه گرفته شد و دم حیوان نیز توسط دو انگشت دیگر مقید گردید و لوله مخصوص گاواژ به موازات کام موش به آرامی به‌طرف مری رانده شد. در صورت قرارگیری لوله گاواژ در محل صحیح خود، مشاهده می‌شود که حیوان به راحتی نفس می‌کشد. باید توجه داشت که قرارگیری سر به طرف بالا، خطر ورود لوله گاواژ به نای را به حداقل می‌رساند.

فنی‌توئین سدیم (PHT) (تهیه شده از شرکت دارویی لقمان) در حلال آب مقطر حل شد. سدیم والپروات (VPA) (تهیه شده از شرکت داروسازی دارو پخش) در حلال آب مقطر حل گردید و لاموتریجین (LTG) (تهیه شده از شرکت داروسازی داروپخش) در حلال حاوی اتانول ۹۶٪ گرم شده (۱۰٪)، پروپیلن گلیکول (ساخت شرکت شیمیایی و دارویی باران)(۴۰٪) و نرمال سالین(۵۰٪) حل شد. تمامی این داروها با حجم ml ۰/۱ به ازای هر

۱۰ g وزن بـدن به‌صورت تزریق داخل صفاقی(i.p) تجویز شـدند. تمامی داروها روزانه به‌صورت تازه تهیه می‌شدند.

القاء تشـنج توسـط مدل الکتریکـی ۶Hz: برای القا ایـن مدل ابتدا بی‌حس‌کننده موضعی تتراکائین هیدروکلراید ۱٪ (تهیه شـده از شـرکت سینادارو) در قرنیه موش‌ها ریخته می‌شود. به منظور ایجاد ارتباط الکتریکی بهتر الکترودها درسـت قبل از تحریک با محلول سـالین خیس می‌شوند. تشـنج‌های سـایکوموتور (Psychomotor) از طریـق تحریک قرنیه با مشخصات امواج تحریکی قطاری با پهنای پالس ۰/۲ ms، فرکانس ۶Hz، مدت تحریک ۳ ثانیه و شـدت جریان ۴۴ mA با اسـتفاده از استیمولاتور القا می‌شود. علائم تشنج به شـکل حرکت جهشی دست‌ها (Forelimb Clonus)، حالـت کرخـی (Stun)، تکان دادن سـبیل‌ها (Twitching of Vibrrisae) و قـرار گرفتن حالت عمـودی دم (Straub Tail) ظاهر می‌شوند که حداقل ۱۰ ثانیه طول می‌کشند. حیوانات پس از اتمام تشنج به حالت طبیعی برمی‌گردند (۱).

گروه‌های آزمایش: در این مطالعه ۲۵ گروه آزمایشـی تعریف شد که ۱۹ گروه DHA را به روش i.c.v و ۶ گروه با روش خوراکی دریافت کردند.

گروه کنترل: در این گروه فقط تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال شـد و بروز یا عدم بروز تشنج ثبت گردید.

گروه کنترل مثبت: در این گروه دوزهای مختلف والپروات سدیم (mg/kg ۱۵۰و ۳۰۰) یا حلال آن به روش i.p تزریق شد و ۱۵ دقیقه بعد تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید.

گروه کنترل منفـی: در این گروه حلال DHA: به روش i.c.v. تزریق شـد و پس از ۱۵دقیقه پروتکل ۶Hz اجرا گردید و میزان بروز تشـنج ثبت گردید.

گـروه تزریـق i.c.v. DHA: در ایـن گروه دوزهـای مختلف DHA (۱mM و ۰/۰۳ M) به روش i.c.v. تزریق شد. در زمان پانزده دقیقه پس از تزریق DHA، تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید و بروز یا عدم بروز تشنج ثبت شد. این زمان بر اساس مطالعات قبلی به عنوان پیک اثر DHA مطرح می‌باشد (۶).

گـروه دریافت کننده PHT: در ایـن گروه PHT با دوز ۲۵ mg/kg به روش i.p تزریق شـد و پس از گذشـت ۲ ساعت تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید و میزان بروز تشنج ثبت شد (این زمان پیک اثر دارو می‌باشد) (۱).

گـروه دریافت کننده LTG: در این گـروه LTG با دوز ۲۵ mg/kg به روش i.p تزریق شـد و پس از گذشت ۱ ساعت تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید و میزان بروز تشنج ثبت شد (این زمان پیک اثر دارو می‌باشد) (۱).

در دو گروه دیگر نیز حلال LTG و PHT تزریق شد و به‌ترتیب بعد از گذشـت ۱ ساعت و ۲ ساعت تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال شد و علائم تشنجی ثبت گردید.

گـروه تجویز همزمـان DHA و PHT: در این گروه ابتدا PHT با دوز ۲۵ mg/kg به روش i.p تزریق شد و پس از ۱ ساعت و ۴۵ دقیقه DHA با دوز ۱ mM (i.c.v) تجویز شـد ۱۵ دقیقه بعد تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید و میزان بروز تشنج ثبت شد.

گروه تجویز همزمـان DHA و حلال PHT: در این گروه ابتدا حلال PHT با روش i.p. تزریق شد و پس از ۱ ساعت و ۴۵ دقیقه DHA با دوز ۱ mM به صورت i.c.v. تزریق شد و پس از ۱۵ دقیقه تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید و میزان بروز تشنج ثبت شد.

گروه تجویز همزمان حـلال DHA و PHT: در این گروه ابتدا PHT با دوز ۲۵ mg/kg بصورت i.p. تزریق شـد و پس از ۱ سـاعت و ۴۵ دقیقه HPB با روش i.c.v. تزریق شد و پس از ۱۵ دقیقه تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید و میزان بروز تشنج ثبت شد.

گروه تجویز همزمان حـلال DHA و حلال PHT: در این گروه ابتدا حلال PHT به‌صورت i.p. تزریق شد و پس از ۱ ساعت و ۴۵ دقیقه HPB با روش i.c.v. تزریق شد و پس از ۱۵ دقیقه تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید و میزان بروز تشنج ثبت شد.

گـروه تجویز همزمـان DHA و LTG: در این گروه ابتدا LTG با دوز ۲۵ mg/kg بـه روش i.p تزریـق شـد و پس از ۱ سـاعت DHA با دوز ۱mM به‌صورت i.c.v. تجویز شد و ۱۵ دقیقه بعد تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید و میزان بروز تشنج ثبت شد.

گروه تجویز همزمـان DHA و حلال LTG: در این گروه ابتدا حلال LTG به‌صورت i.p. تزریق شد و پس از ۴۵ دقیقه DHA با دوز ۱ mM با روش i.c.v. تجویز شد و پس از ۱۵ دقیقه تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید و میزان بروز تشنج ثبت شد.

گروه تجویز همزمان حلال DHA و LTG: در این گروه ابتدا LTG با دوز ۲۵ mg/kg بصورت i.p. تزریق شد و پس از ۱ ساعت HPB با روش i.c.v. تزریق شد و پس از ۱۵ دقیقه تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید و میزان بروز تشنج ثبت شد.

گروه تجویز همزمان حـلال DHA و حلال LTG: در این گروه ابتدا حلال LTG به‌صورت i.p. تزریق شـد و پس از ۱ سـاعت HPB با روش i.c.v. تزریق شد و پس از ۱۵ دقیقه تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید و میزان بروز تشنج ثبت شد.

گـروه تجویز خوراکـیDHA: در ایـن گروه DHA بـا غلظت ۹۷٪ به‌میـزان ۰/۱ ml با روش گاواژ به موش‌ها خورانده شـد و ۱ سـاعت بعد تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید و علائم تشنجی ثبت شد.

گروه تجویز خوراکی روغن کنجد: در این گروه روغن کنجد به میزان ۰/۱ ml بـا روش گاواژ به موش‌ها خورانده شـد و ۱ سـاعت بعد تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید و علائم تشنجی ثبت شد.

جدول ۱. اثر تزریق داخل بطنی مغزی دوکزاهگزانوئیک اسید به تنهایی و بهمراه لاموتریجین یا فنی توئین در مدل صرعی ۶- هرتز.

گروه	تعداد حیواناتی که علائم تشنج نشان داده‌اند تعداد کل حیوانات (۱۰)	میزان بروز تشنج (٪)
کنترل	۱۰	۱۰۰
والپروات سدیم (۳۰۰ mg/kg)	۰	۰
والپروات سدیم (۱۵۰ mg/kg)	۲	۲۰
حلال والپروات سدیم	۱۰	۱۰۰
DHA (۱ mM)	۹	۹۰
DHA (۰/۰۳ M)	۹	۹۰
حلال DHA	۹	۹۰
فنی‌توئین (۲۵ mg/kg)	۹	۹۰
حلال فنی‌توئین	۱۰	۱۰۰
لاموتریجین (۲۵ mg/kg)	۷	۷۰
حلال لاموتریجین	۸	۸۰
DHA + فنی‌توئین	۹	۹۰
DHA + حلال فنی‌توئین	۸	۸۰
حلال DHA + فنی‌توئین (۲۵ mg/kg)	۱۰	۱۰۰
حلال DHA + حلال فنی‌توئین	۱۰	۱۰۰
لاموتریجین+ DHA (۲۵ mg/kg)	۹	۹۰
حلال لاموتریجین + DHA	۹	۹۰
لاموتریجین +حلال DHA (۲۵ mg/kg)	۸	۸۰
حلال لاموتریجین + حلال DHA	۹	۹۰
p Value		p<۰/۰۵

جدول ۲. اثر تجویز خوراکی دوکزاهگزانوئیک اسید به تنهایی و بهمراه لاموتریجین یا فنی توئین در مدل صرعی ۶- هرتز.

گروه	تعداد حیواناتی که علائم تشنج نشان داده‌اند تعداد کل حیوانات (۱۰)	میزان بروز تشنج (٪)
DHA خوراکی	۹	۹۰
روغن کنجد	۱۰	۱۰۰
DHA + فنی‌توئین (۲۵mg/kg)	۸	۸۰
DHA + لاموتریجین (۲۵mg/kg)	۹	۹۰
روغن کنجد + فنی‌توئین (۲۵mg/kg)	۱۰	۱۰۰
روغن کنجد + لاموتریجین (۲۵mg/kg)	۱۰	۱۰۰
p Value		p>۰/۰۵

گروه تجویز همزمان DHA خوراکی و PHT: در این گروه ابتدا داروی PHT با دوز ۲۵ mg/kg به‌صورت i.p. تجویز شد و یک ساعت بعد ازتزریق دارو DHA با روش گاواژ به موش‌ها خورانده شد و پس از ۱ ساعت تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید.

گروه تجویز همزمان DHA خوراکی و LTG: در این گروه ابتدا داروی LTG با دوز ۲۵ mg/kg به‌صورت i.p. تجویز شد و همزمان با تزریق دارو DHA با روش گاواژ به موش‌ها خورانده شد و پس از گذشت ۱ ساعت تحریک الکتریکی ۶Hz اعمال گردید. در گروه‌های کنترل موش‌ها به جای DHA روغن کنجد دریافت کردند.

آنالیز آماری: مقایسه درصد اثرات مهاری داروها و DHA بر بروز تشنجات ناشی از مدل ۶Hz توسط آزمون دقیق فیشر انجام شد. در تمام آنالیزها p کمتر از ۰/۰۵ ملاک تفاوت معنی‌داری آماری در نظر گرفته شد.

نتایج

برطبق نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر داروی والپروات سدیم با دوز بالا در مدل الکتریکی ۶Hz مقاوم به‌درمان در کنترل تشنج‌ها مؤثر است (p>۰/۰۵) اما داروهای فنی‌توئین و لاموتریجین نمی‌توانند تشنج‌های مقاوم به درمان را در این مدل مهار کنند (p<۰/۰۵) (جدول۱). در تجویز حاد DHA به‌تنهایی با دوزهای مختلف به‌صورت داخل مغزی در مقایسه با تجویز HPB اثری در مهار تشنج‌های مقاوم دیده نشد (p<۰/۰۵). از طرفی

تجویز حادDHA همراه با داروی فنی‌توئین یا لاموتریجین نیز نتوانست تشنج‌های مقاوم به این داروها را مهار کند (p<۰/۰۵)(جدول ۱).

در گروه‌های خوراکی نیز تجویز DHA به‌تنهایی در مقایسه با گروهی کـه روغن کنجـد دریافت کردند در مهار بروز تشـنج اثر مهاری نداشـت (p<۰/۰۵). همچنین همراه شـدن DHA با داروهای ضدصرع فنی‌توئین یا لاموتریجین نیز نتوانست میزان تشنج‌های مقاوم به این داروها را کاهش دهد (p<۰/۰۵)(جدول ۲).

بحث

در این پژوهش تأثیر تجویز حاد DHA در غلبه بر صرع مقاوم به درمان در مدل الکتریکی ۶Hz در موش سـوری مورد بررسی قرار گرفته است. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر تجویز حاد DHA به تنهایی و یا همراه با داروی فنی‌توئین یا لاموتریجین در مدل الکتریکی ۶Hz مقاوم به درمان نمی‌تواند تشـنج‌های مقاوم به درمان را مهار کند (p<۰/۰۵). این مطالعه اولین مطالعه انجام شده با استفاده از DHA خالص در کنترل صرع مقاوم به درمان می‌باشد.

اسـیدهای چرب غیراشـباع شـامل امـگا ۳ (EPA و DHA)، امگا ۶ (اسـیدلینولئیک و اسید آراشـیدونیک) به میزان بسیار بالایی در مغز وجود دارند. در انسان مصرف اسیدهای چرب غیراشباع امگا ۳ که به‌طور معمول در ماهی و روغن ماهی یافت می‌شود نه‌تنها به رشد مغز کمک می‌کند بلکه ریسک بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی از جمله صرع را کاهش می‌دهد (۱۴). هم‌چنین امگا ۳ آریتمی قلبی و مرگ ناگهانی را کاهش می‌دهد و در بیمارانی با تشنج مقاوم اثرات ضدتشنجی دارد (۲۴).

مدل ۶Hz مدل تشـنجات لیمبیک است و با صرع بالینی تشنج‌های جزئی در انسان مطابقت دارد و برخلاف سایر مدل‌های حاد از جمله MES و PTZ مدل مناسـبی برای آزمایشـات صرع مقاوم به‌درمان است (۱). در مدل الکتریکی ۶Hz الگوی فعال شدن نورون‌ها با آنچه که در مدل PTZ و MES وجود دارد متفاوت اسـت (۱۵) و با افزایش شـدت جریان به mA ۴۴ نواحی بزرگتری از مغز درگیر می‌شـوند و داروهایی هم‌چون فنی‌توئین و لاموتریجین که در شـدت جریـان mA ۲۲ مؤثرند اثر خود را از دسـت می‌دهند و صرع مقاوم بروز می‌کند (۱).

در مطالعه حاضر داروی والپروات سدیم با دوز بالا برای موش‌ها تجویز شـد که بعد از تحریک الکتریکی ۶Hz توانسـت علائم را مهار کند که با نتایج Barton و همکاران در سال ۲۰۰۱ یکسان می‌باشد.

در پژوهـش حاضر تجویز DHA بـه دو طریق خوراکی و داخل بطن مغز و بر اسـاس دوزهای بدسـت آمده از مطالعات قبلی (۳, ۶) انجام شد و به منظور مشـاهده اثر خود مولکول DHA تا قبل از متابولیزه شدن مدت کوتاهـی پس از تجویز (۱۵ دقیقه در مـدل i.c.v) مدل صرعی ۶Hz القا گردید.

در مطالعه Taha و همکاران در سال ۲۰۱۰ تجویز دوز ۴۰۰ از DHA بصورت زیرجلدی درسـت یک سـاعت قبل از تزریـق PTZ باعث تأخیر تشنج‌های حاصل از PTZ شد (۱۸) که انتخاب مدت زمان یک ساعت بعد از تجویز خوراکی در مطالعه حاضر نیز بر این اساس می‌باشد. در مطالعه حاضر تجویز حاد DHA از طریق خوراکی تأثیری در مهار تشـنج‌ها نداشـت که احتمالاً به علت گیرافتادن DHA توسـط شیلومیکرون و LDL در پلاسما بلافاصله بعد از تجویز خوراکی است که بدین ترتیب DHA نمی‌تواند اثر خـود را اعمـال کند و حدود یک هفته زمان لازم اسـت که فرم آزاد آن در خون دیده شـود یعنی تا زمانی‌که شیلومیکرون‌ها و LDL از DHA اشباع شوند(۱۸).

عدم مشـاهده تأثیر DHA برای غلبه بر صرع مقاوم به درمان در این مطالعه، مشابه مطالعه Willis و همکاران در سال ۲۰۰۹ می‌باشد که تأثیر ضدصرعی ترکیب DHA و EPA بر صرع القا شـده توسـط مدل ۶Hz در موش سوری بررسی شد. آن‌ها شدت جریان را تا mA ۳۲ افزایش دادند اما هیچ‌گونه اثر محافظتی مشاهده نکردند که ممکن است به علت نحوه تجویز این ترکیب باشد که به‌صورت پلت از طریق ترکیب با غذای موش‌ها بوده اسـت و غلظت درمانی لازم را ایجاد نکرده اسـت اما در مطالعه حاضر نیز غلظت مناسب DHA نتوانست تشنج‌های مقاوم را مهار کند (۲۲).

البته چنین اثری در مطالعات بالینی نیز گزارش شده است اما به‌طور کلـی در مطالعات بالینی نتایج در صرع مقاوم به‌درمان متفاوت بوده اسـت کـه می‌تواند به علت مصرف ترکیب DHA و EPA باشـد که اگر DHA به‌صورت خالص اسـتفاده می‌شـد ممکن بـود نتایج متفاوتی می‌داشـت هم‌چنین در این مطالعات تعداد بیماران مورد مطالعه کم بوده است و ملاک صرع مقاوم ملاک ثابت و مشخصی نبوده است (۲،۲۴). گاوزن و همکاران در سـال ۲۰۱۵ نتیجـه گرفته‌اند که تجویز DHA بـه تنهایی یا همراه با داروی فنی-توئیـن هیچ‌گونه اثری در مهار تشـنج‌های صرعی حاصل از مدل MES، که همانند مدل ۶Hz یک مدل صرعی حاد است، نداشت اما دارای اثرات وابسته به دوز در مهار تشنجات کلونیک ناشی از PTZ است (۶)؛ همچنین Voskuyl و همکاران نیز در سـال ۱۹۹۸ نتایج مشابهی را در سـایر مدل‌های حیوانی با اسـتفاده از DHA و EPA گرفته‌اند. در مدل الکتریکی ۶Hz الگوی فعال شـدن نورون‌ها با آنچـه که در مدل PTZ و MES وجـود دارد متفاوت اسـت (۱۵) و با افزایش شـدت جریان به mA ۴۴ نواحی بزرگتری از مغز درگیر می‌شـوند و داروهایی هم‌چون فنی‌توئین و لاموتریجین که در شـدت جریـان mA ۲۲ مؤثرند اثر خود را از دسـت می‌دهند (۱). داروی ضدصرع فنی‌توئین و لاموتریجین کانال‌های وابسته به ولتاژ سدیمی را مسدود می‌کنند (۱۲).

لاموتریجین هم‌چنین میزان میانجـی تحریکی گلوتامات را کاهش می‌دهد و از این طریق به‌طور قوی تشـنجات حاصـل از مدل ۶Hz مهار می‌کنند. DHA نیز همانند فنی‌توئین و لاموتریجین قادر به مهار کانال‌های

وابسته به ولتاژ سدیمی می‌باشد. بنابراین در این مطالعه انتظار می‌رفت که در پی تجویز همزمان DHA با داروی ضدصرع فنی‌توئین و لاموتریجین، کانال‌های وابسته به ولتاژ سدیمی با قدرت بیشتری مهار و رابطه هم‌افزایی بین این ترکیبات ضدتشـنج مشاهده شـود. ناتوان بودن DHA در تقویت عملکرد ضدتشنجی فنی‌توئین و لاموتریجین در این مطالعه همانند تجویز آن به‌تنهایی، ممکن است وابسته به ناکافی بودن میزان DHA برای تأثیر مکرر بر روی کانال‌ها و غشا سلول‌ها و تغییر آن‌ها برای اثر مهاری در صرع مقاوم باشد به‌طوریکه ممکن است در تجویز مزمن DHA برای مدت زمان حداقل ۲ هفته نتایج متفاوتی مشاهده شود. همانگونه که در مطالعه موردی بر روی سگ مبتلا به صرع مقاوم به فنوباربیتال، افزودن روزانه g ۲ روغن ماهی به غذای حیوان بعد از ۵۰ روز باعث کاهش تشنج شد و در طول ۱۸ ماه تشنج‌ها ۸۵٪ کاهش یافت (۱۴).

بنابرایـن با توجه به یافته‌های پژوهـش حاضر اگرچه DHA ترکیبی اسـت که می‌تواند در درمان بیماری صرع مؤثر باشـد اما مصرف تک دوز آن هیچ‌گونـه اثر مهاری در صرع مقاوم به درمان در مدل الکتریکی ۶Hz ندارد اما ممکن است در سایر مدل‌های صرعی مقاوم به درمان و یا دریافت طولانی DHA در این مدل نیز مؤثر باشد.

تشکر و قدرانی

این مقاله حاصل بخشی از نتایج پایان نامه دکترای تخصصی می‌باشد و نویسـندگان بر خود لازم می‌دانند تا از حمایت مالی و پژوهشـی موسسه انستیتو پاستور ایران تشکر و قدرانی نمایند.

References

1. Barton, M.E., Klein, B.D., Wolf, H.H., White, H.S. (2001) Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. Epilepsy Res. 47: 217-227.
2. Bromfield, E., Dworetzky, B., Hurwitz, S., Eluri, Z., Lane, L., Replansky, S., Mostofsky, D. (2008) A randomized trial of polyunsaturated fatty acids for refractory epilepsy. Epilepsy Behav. 12: 187-190.
3. Curatolo, N., Lecointe, C., Bordet, R., Vallée, L., Galabert, C., Gressens, P., Auvin, S. (2011) Oral administration of docosahexaenoic acid/eicosapentaeinoic acids is not anticonvulsant in rats: implications for translational research. Pediatr Res. 70: 584-588.
4. Dahlin, M., Hjelte, L., Nilsson, S., Åmark, P. (2007) Plasma phospholipid fatty acids are influenced by a ketogenic diet enriched with n-3 fatty acids in children with epilepsy. Epilepsy Res. 73: 199-207.
5. Das, U.N., Madhavi, N. (2011) Effect of polyunsaturated fatty acids on drug-sensitive and resistant tumor cells in vitro. Lipids Health Dis. 10: 159.
6. Gavzan, H., Sayyah, M., Sardari, S., Babapour, V. (2015) Synergistic effect of docosahexaenoic acid on anticonvulsant activity of valproic acid and lamotrigine in animal seizure models. N-S Arch Pharmacol. 388: 1029-1038.
7. Gelsomino, G., Corsetto, P.A., Campia, I., Montorfano, G., Kopecka, J., Castella, B., Gazzano, E., Ghigo, D., Rizzo, A.M., Riganti, C. (2013) Omega 3 fatty acids chemosensitize multidrug resistant colon cancer cells by down-regulating cholesterol synthesis and altering detergent resistant membranes composition. Mol Can. 12: 137.
8. Haley, T., McCormick, W. (1957) Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. Bri J Pharmacol. 12: 12-15.
9. Krüger, A. (2006) The Role of Fatty Acids in Drug Resistant Epilepsy. Blackwell Sciences Ltd. london, UK.
10. Löscher, W. (2011) Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. Seizure 20: 359-368
11. Löscher, W., Klitgaard, H., Twyman, R.E., Schmidt, D.(2013) New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. Nature reviews. Drug Disc. 12: 757.
12. Łuszczki, J.J., Wlaz, A., Marzeda, E., Durmowicz, D., Florek-Łuszczki, M. (2013) Additive interaction of levetiracetam with lamotrigine in the mouse 6 Hz psychomotor seizure model-an isobolographic analysis. Curr. Issues Pharm Med Sci. 26: 82.
13. Potschka, H. (2012) Animal models of drug-resistant epilepsy. Epileptic Disord. 14: 226-234.
14. Scorza, F.A., Cavalheiro, E.A., Arida, R.M., Terra, V.C., Scorza, C.A., Ribeiro, M.O., Cysneiros, R.M. (2009) Positive impact of omega-3

fatty acid supplementation in a dog with drug-resistant epilepsy: a case study. Epilepsy Behav. 15: 527-528.

15. Shandra, A., Shandra, P., Kaschenko, O., Matagne, A., Stöhr, T. (2013) Synergism of lacosamide with established antiepileptic drugs in the 6-Hz seizure model in mice. Epilepsia. 54: 1167-1175.
16. Taha, A.Y., Ciobanu, F.A., Saxena, A., Burnham, W.M. (2009) Assessing the link between omega-3 fatty acids, cardiac arrest, and sudden unexpected death in epilepsy. Epilepsy Behav. 14: 27-31.
17. Taha, A.Y., Filo, E., Ma, D.W., McIntyre Burnham, W. (2009) Dose-dependent anticonvulsant effects of linoleic and α-linolenic polyunsaturated fatty acids on pentylenetetrazol induced seizures in rats. Epilepsia. 50: 72-82.
18. Taha, A.Y., Jeffrey, M.A., Taha, N.M., Bala, S., Burnham, W. (2010) Acute administration of docosahexaenoic acid increases resistance to pentylenetetrazol-induced seizures in rats. Epilepsy Behav. 17: 336-343.
19. Tao, S., Yang, X., Chen, Y., Wang, X., Xiao, Z., Wang, H., Wu, Q., Wang, X. (2012) Up-regulated methyl CpG binding protein-2 in intractable temporal lobe epilepsy patients and a rat model. Neurochem Res. 37: 1886-1897.
20. Vamecq, J., Vallée, L., Lesage, F., Gressens, P., Stables, J.P. (2005) Antiepileptic popular ketogenic diet: emerging twists in an ancient story. Prog Neurobiol. 75: 1-28.
21. Voskuyl, R.A., Vreugdenhil, M., Kang, J.X., Leaf, A. (1998) Anticonvulsant effect of polyunsaturated fatty acids in rats, using the cortical stimulation model. Eur Jo Pharmacol. 341: 145-152.
22. Willis, S., Samala, R., Rosenberger, T.A., Borges, K. (2009) Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids are not anticonvulsant or neuroprotective in acute mouse seizure models. Epilepsia. 50: 138-142.
23. Xu, X.-p., Erichsen, D., Börjesson, S.I., Dahlin, M., Åmark, P., Elinder, F. (2008) Polyunsaturated fatty acids and cerebrospinal fluid from children on the ketogenic diet open a voltage-gated K channel: a putative mechanism of antiseizure action. Epilepsy Res. 80: 57-66.
24. Yuen, A.W., Sander, J.W., Fluegel, D., Patsalos, P.N., Bell, G.S., Johnson, T., Koepp, M.J. (2005) Omega-3 fatty acid supplementation in patients with chronic epilepsy: a randomized trial. Epilepsy behav. 7: 253-258.

Effect of acute administration of Docosahexaenoic acid in mice drug resistance in 6Hz model of epilepsy

Moezifar, M.[1,2], Sayyah, M.[1], Zendehdel, M.[2*], Babapour, V.[2]

[1]*Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*
[2]*Department of Basic Sciences, Faculty of veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
(Received 14 June 2017, Accepted 26 August 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Epilepsy is a chronic neurological disorder. Despite discovery of effective antiepileptic drugs (AEDs), more than 30% of patients are still resistant to AEDs. **OBJECTIVES:** Evaluation of the effect of acute administration of Docosahexaenoic acid (DHA) in mice resistant to antiepileptic drugs in 6Hz model of epilepsy. **METHODS:** At first intracerebroventricular (i.c.v) injection and oral consumption of DHA alone and intrapritoneal (i.p.) injection of drugs in separate groups were evaluated. In test groups LTG 25 mg/kg or PHT 25mg/kg were injected i.p. 105 min after injection of PHT, 45 min after injection of LTG, DHA (1mM) was injected i.c.v. In control groups drugs solvent or DHA solvent was injected DHA. 15 min after injection of DHA or DHA solvent, in all groups 6 Hz stimulation was exerted and occurrence of limbic seizures was registered. In oral test groups PHT 25 mg/kg or LTG 25 mg/kg was injected i.p. 60 min after injection of PHT and simultaneous injection of LTG, DHA (0.1 ml) was gavaged. 60 minutes after injection of DHA 6 Hz stimulation was exerted. **RESULTS:** Acute administration of DHA alone via i.c.v injection or oral gavage had no protective effect on inhibiting seizures. Administration of DHA with LTG or PHT also could not inhibit drug resistance. 6-Hz seizures when administered chronically. However, chronically administered DHA inhibited limbic seizures resistant to LTG and PHT. **CONCLUSIONS:** Acute administration of DHA could not inhibit resistance to LTG and phenytoin in 6-Hz model of epilepsy. Also, consumption of single dose of DHA with anticonvulsant drugs does not have any effect on prevention of drug resistance in epileptic patients.

Keyword: Docosahexaenoic acid, drug resistant epilepsy, 6-Hz model, mice

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Effect of acute i.c.v injection of DHA with and without Lamotrigine or Phenytoin on 6Hz model of epilepsy.

Table 2. Effect of acute oral administration of DHA alone and with Lamotrigine or Phenytoin on 6Hz model of epilepsy.

***Corresponding author's email: zendedel@ut.ac.ir, Tel: 021-61117000, Fax: 021-66933222**