



اثر آمی‌تریپتیلین بر استرس اکسیداتیو ناشی از القاء پنتیلین تترازول در موش‌های صحرایی نر صرعی نژاد ویستار

ناصر میرازی^۱ (PhD)*، سهیلا نیازی^۱ (MSc)، عبدالکریم حسینی^۲ (PhD)، زهرا ایزدی^۳ (PhD)

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

^۲ گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

^۳ گروه علوم و مهندسی باغبانی، مجتمع آموزش عالی نهاوند، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۱۷ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۳/۲۲)

چکیده

زمینه: صرع دارویی می‌تواند بر اثر برخی از داروها و عوامل شیمیایی ایجاد گردد. مواد اکسید کننده از جمله ترکیبات شیمیایی ایجاد کننده صرع محسوب می‌گردند. هدف از این بررسی اثرات ضد تشنجی و آنتی‌اکسیدانی آمی‌تریپتیلین در موش‌های صحرایی نر القاء شده با پنتیلین تترازول (PTZ) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی ۲۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم مورد استفاده قرار گرفت. موش‌ها در ۴ گروه ۷ سری به‌طور تصادفی تقسیم شدند: کنترل بکر (۵/۵ میلی‌لیتر نرمال سالین)، گروه کنترل تشنج (PTZ، ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، گروه تجربی ۱ (PTZ + آمی‌تریپتیلین، ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، گروه تجربی ۲ (PTZ + آمی‌تریپتیلین، ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن). تمامی تزریقات به صورت داخل صفاقی انجام شد. در پایان آزمایش، موش‌ها توسط کتامین و زایلازین بیهوش گشته و بطور مستقیم نمونه‌های خون تهیه و سپس سرم آن‌ها جدا گردید. نشانگرهای استرس اکسیداتیو مانند GPx، MDA، NO و GSH اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست آمده آزمون‌ها با استفاده از تست آماری ANOVA یک طرفه و آزمون Tukey برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که تأخیر در حرکات میوکلونیک در گروه‌های درمان شده با آمی‌تریپتیلین نسبت به گروه PTZ افزایش پیدا کرد. همچنین تأخیر تشنج عمومی تونیک کلونیک در گروه‌های درمان شده نسبت به گروه PTZ افزایش پیدا کرد. علاوه بر این، سطح سرمی GSH و GPx در گروه PTZ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد. سطح سرمی MDA و NO در گروه PTZ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: آمی‌تریپتیلین قادر است میزان تشنجات ناشی از تزریق PTZ در موش‌ها کاهش دهد. همچنین این دارو تأثیر مثبتی بر جلوگیری از عوامل اکسید کننده در موش‌ها دارد.

واژگان کلیدی: آمی‌تریپتیلین، آنتی اکسیدان، پنتیلین تترازول، صرع، گلوکاتیون پراکسیداز، مالون دی آلدئید

* همدان، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

مقدمه

صرع یک اختلال بسیار پیچیده نوروزنیک مزمن می باشد که تقریباً بیش از یک درصد از جمعیت جهان از آن رنج می برند. این بیماری با فعالیت خود به خودی و برگشتی مشخص می شود که ناشی از فعالیت های بیش از حد مغز است (۱). در بیماری صرع تشنج های صرعی ظاهر می شود. این تشنجه ها به عنوان یک عملکرد غیرطبیعی و ناگهانی در بدن دیده می شود و غالباً با از دست دادن هوشیاری، افزایش در فعالیت عضلات، اختلال حافظه، اختلالات عصبی و احساسات غیرطبیعی همراه است (۲). تشنج های صرعی ممکن است بعد از آسیب های حاد دستگاه عصبی مرکزی ایجاد شود (مثل آسیب های ساختاری، سیستمی، سمی یا متابولیکی). این تشنج های حاد علامتی یا تحریک شده به عنوان تظاهرات آسیب های حاد در نظر گرفته شده است (۳). بر اساس علائم بالینی و ناهنجاری های موجود در نوار مغز، تشنج های منتشر به انواع غیابی (Absence seizure)، تونیک - کلونیک، میوکلونیک، آتونیک، تونیک و کلونیک تقسیم می شوند (۴).

اعتقاد بر این است که کاربامازپین و فنی توئین که جزو داروهای رایج ضد صرعی (Anti Epilepsy Drugs, AEDs) هستند، باعث بلوکه شدن بلند مدت کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ و یا حفظ حالت غیرفعال بودن این کانال ها، می شوند. مرسوم ترین داروهایی که برای کنترل تشنج در اختلال صرع به کار می روند والپروات سدیم و فنی توئین می باشد. اما این داروها باعث اختلال حافظه و یادگیری می شوند (۵). در مطالعات بسیاری پیشنهاد شده است که اختلالات میانجی های عصبی مانند گلوتامات و گابا و یا گیرنده های آن ها، در آسیب شناسی صرع نقش بسزایی

دارند (۶ و ۷). جدیدترین و متداول ترین داروهای ضدصرع که انواع مختلف تشنج با آن ها کنترل می شود، نه تنها قادر به کنترل تشنج در برخی از بیماران نیستند، بلکه باعث بروز عوارض جانبی هم می شوند (۸). آمی تریپتیلین (Amitriptyline, AMT) داروی مورد تأیید سازمان غذا و داروی آمریکا (Food and Drug Administration, FDA) بوده که برای درمان افسردگی در بزرگسالان مصرف می گردد. این دارو دارای اثرات فارماکولوژیک فراوانی می باشد (۹). این دارو در طبقه بندی داروهای ضدافسردگی سه حلقه ای قرار می گیرد. این داروها از جذب مجدد انتقال دهنده های عصبی مانند سروتونین و نوراپی نفرین جلوگیری می کند. ساختار مرکزی سه حلقه ای ها، همراه با یک زنجیره ی جانبی، ساختار اصلی داروهای ضدافسردگی سه حلقه ای ها را تشکیل می دهد. در کل جمعیت طبیعی بشر، شیوع اختلال یادگیری ۵ درصد می باشد. درحالی که شیوع اختلال یادگیری در افراد مبتلا به صرع در حدود ۲۰ تا ۲۵ درصد می باشد (۱۰). به صورت عمده AMT به انتقال دهنده های سروتونین و نورآدرنالین متصل می شود. خواص فارماکولوژیک دیگر این دارو در اعصاب مرکزی و محیطی شامل آگونیست گیرنده آلفا آدرنژیک، فعال سازی سیستم اویپوئیدی درونزاد، آنتاگونیست گیرنده NMDA، فعال سازی گیرنده GABA، کاهش تولید $TNF-\alpha$ و پروستاگلاندین E2 است (۱۱).

پنتیلن تترازول (Pentylentetrazole, PTZ)، یک آنتاگونیست گیرنده های گابا می باشد و برای القای تشنج های غیابی و منتشر کاربرد دارد. تزریق زیرجلدی پنتیلن تترازول با دوز ۸۵-۷۰ میلی گرم بر کیلوگرم در موش های صحرایی باعث تشنج های کلونیک در ۹۷ درصد از حیوانات می گردد و می تواند حداقل به مدت

در ممانعت از بروز صرع و تثبیت حافظه و یادگیری در مدل‌های حیوانی صرعی شده با پنتیلین تترازول تحقیقی صورت نگرفته است تصمیم گرفته شد تا با این پژوهش به بررسی چنین اثراتی پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه با رعایت کلیه موارد اخلاقی در پژوهش و رعایت دستورالعمل‌های اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مورد تأکید کمیته اخلاق دانشگاه بوعلی سینا و با مصوبه و کد ۰۰۲، ۱۴۰۰، IR.BASU.REC به انجام رسید. تمامی اعمال جراحی و نمونه برداری‌ها در حیوانات، تحت بیهوشی کامل آن‌ها صورت گرفت. در این پژوهش تجربی تعداد ۲۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. موش‌ها به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط و با دمای 20 ± 2 درجه سانتی‌گراد و با چرخه روزانه ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. همه آزمایشات برای کاهش اثر چرخه نور بر حساسیت به تشنج بین ساعت ۹-۱۲ صبح انجام شد. روش انجام شده بر روی حیوانات مورد آزمون، روش استریوتایپینگ می‌باشد (۱۷). در این روش رفتار حرکتی حیوانات در هر گروه با انتقال موش‌ها به جعبه پلاستیکی شفاف، توسط دوربین متصل به کامپیوتر به مدت نیم ساعت پس از تزریق (Sigma-Aldrich, Kimia Zistgostar Novin PTZ (Co. ثبت و ذخیره شد. تأخیر و تعداد تکان‌های میوکلونیک، همچنین تأخیر و مدت زمان تشنج تونیک - کلونیک ژنرالیزه (GTCS) در حیوانات بر اساس جدول مقیاس راسین ارزیابی شدند (جدول ۱). پس از ثبت نتایج مربوط به تشنجات تونیک و کلونیک، حیوانات توسط داروی کتامین هیدروکلراید (ALMANIA،

پنج ثانیه ادامه داشته باشد. با تزریق این دارو بادوزهای پایین (۳۵-۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) می‌توان تشنج‌های غیابی را القا کرد. پنتیلین تترازول تعادل بین نوروترانسمیترهای تحریکی و مهارتی را برهم می‌زند و این اتفاق به کمک انسداد گیرنده‌های گابا صورت می‌گیرد (۱۲). استفاده بلند مدت از پنتیلین تترازول می‌تواند باعث تغییر آرایش فضایی کمپلکس گیرنده گابا شود. این تغییرات در فعالیت کانال‌های کلری و اتصال گابا به گیرنده اختلالاتی را ایجاد می‌کند. استرس اکسیداتیو به عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و عوامل آنتی‌اکسیدانی در بدن طلاق می‌گردد. گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) توسط برخی داروها و مواد شیمیایی تولید شده و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل استرس اکسیداتیو موجب آسیب به بافت‌های بدن می‌شود (۱۳). پنتیلین تترازول می‌تواند در مدل‌های حیوانی صرعی موجب افزایش عوامل استرس اکسیداتیو بشود. حاصل این اثرات افزایش نشانگرهای پلاسمایی مانند مالون د آلدئید (MDA) و کاهش گلوتاتیون (GSH) گردد (۱۴). اکثر تشنجات ناشی از صرع در اثر اختلال در ساختارهای قشری و هیپوکمپی تولید شده و این امر موجب اختلال در حافظه فضایی کاری جوندگان و حافظه اظهاری انسان گردد (۱۵). داروهای ضدافسردگی به‌خصوص ضدافسردگی‌های سه حلقه‌ای، برای کاهش شدت درد از جمله دردی‌هایی که بر اثر آسیب بافتی ناشی از محرک‌های مکانیکی، فیزیکی، گرمایی، توکسیک یا غیرتوکسیک ایجاد می‌شود و دردهای نوروپاتیک ناشی از فشار بر روی عصب یا ریشه‌ی آن، یا دردهای حاد و مزمنی که پس از قطع یا التهاب عصب (در اثر ضایعات التهابی و پلی نورپاتی) ایجاد می‌شود به کار می‌روند (۱۶). از آنجائی که تاکنون در ارتباط با اثر داروی آمی تریپتیلین

تزریق داخل صفاقی پنتیلن تترازول به میزان ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ایجاد شد (۱۵). سپس محلول‌های ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن آمی‌تریپتیلین تهیه و به صورت تزریق داخل صفاقی (با حجم ۰/۵ میلی لیتر) صورت گرفت. به منظور ثبت و اندازه‌گیری رفتار تشنجی، حیوانات به صورت انفرادی به جعبه‌های شفاف پلاستیکی منتقل شدند و به سرعت بعد از تزریق پنتیلن تترازول رفتار تشنجی به مدت ۱ ساعت مشاهده و ثبت شد. تظاهرات ثبت شده با مقیاس راسین (Racine's Scale) پس از تزریق پنتیلن تترازول در شش مرحله مورد بررسی قرار گرفت (۱۶). این مراحل در جدول ۱ مشاهده می‌گردد.

جدول ۱) مقیاس راسین برای تشنج ناشی از تزریق PTZ در موش‌های صحرایی	
نمره	تظاهرات رفتاری
۰	۱) علامت رفتاری ندارد
۱	۲) انقباض گوش و صورت
۲	۳) تکان دادن سر و تکان‌های میکرونیکی
۳	۴) کلونوس یک طرفه پیشانی با حالت لوردیک
۴	۵) کلونوس دوطرفه با رشد و سقوط
۵	۶) تشنج عمومی تونیک کلونیک با از دست دادن حالت وضعیتی

تجزیه و تحلیل آماری

در این بررسی شاخص‌های توصیفی خطای معیار $\pm$ میانگین به صورت نمودار نشان داده شده است. با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk نرمال بودن داده‌ها مورد آزمون و صحت آن‌ها مورد تأیید قرار گرفت. با توجه به نرمال بودن داده‌ها، از ANOVA یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار GraphPad Prism استفاده شد. در همه تجزیه و تحلیل‌ها، سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

BREMER PHARMA، Ketamin 10%) با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن و گزیلازین هیدروکلراید (Xylazine 2%, alfasan, Netherland) با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند. سپس اقدام به تهیه نمونه خون به طور مستقیم از قلب حیوانات شد و پس از سانتریفیوژ، سرم نمونه‌ها جدا گردید. برای اندازه‌گیری گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)، مالون دی آلدئید (MDA)، از کیت‌های نوین نوند سلامت ایران استفاده شد. مقادیر آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) و گلوکاتایون (GSH) با توجه به دستورالعمل موجود در کیت‌ها و در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. همچنین جهت اندازه‌گیری مقدار مالون دی آلدئید در طول موج ۵۳۲ نانومتر و مقدار نیتریک اکساید (NO) در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. تمامی آزمون‌ها توسط دستگاه میکروپلیت خوان (Biote Tek, USA, ELx808) صورت گرفت.

گروه‌بندی حیوانات

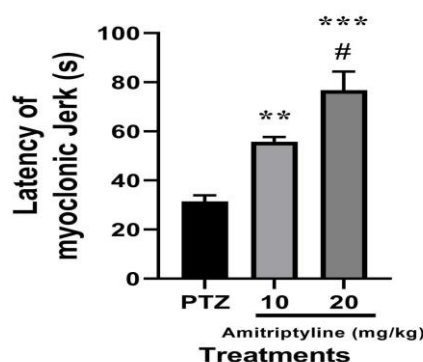
موش‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه ۷ سری به صورت زیر تقسیم‌بندی شدند:

- ۱- گروه کنترل بکر: (۰/۵ میلی لیتر، سالین نرمال داخل صفاقی)
- ۲- گروه کنترل تشنج: (گروه دریافت کننده پنتیلن تترازول): دریافت کننده پنتیلن تترازول (۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، داخل صفاقی)
- ۳- گروه تجربی ۱: دریافت کننده پنتیلن تترازول (۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن + آمی‌تریپتیلین ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، داخل صفاقی)
- ۴- گروه تجربی ۲: دریافت کننده پنتیلن تترازول (۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن + آمی‌تریپتیلین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) تشنج در موش‌ها به صورت

یافته‌ها

– تأثیر آمی‌تریپتیلین بر تشنج ناشی از تزریق داروی پنتیلین تترازول (تأخیر در بروز تشنج انقباضات میوکلونیک)

نتایج تأخیر انقباض میوکلونیک در گروه‌های مورد آزمایش نشان داد که تأخیر در حرکات میوکلونیک در گروه‌های درمان شده با آمی‌تریپتیلین نسبت به گروه کنترل تشنج افزایش معنی‌داری را پیدا کرده است. در گروه درمانی با مقدار کم آمی‌تریپتیلین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، تأخیر در حرکات میوکلونیک نسبت به کنترل تشنج با افزایش معنی‌دار ($p=0/009$) و در گروه درمانی با مقدار زیاد آمی‌تریپتیلین (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، با افزایش معنی‌داری ($p<0/001$) همراه بود. تأخیر در حرکات میوکلونیک در گروه درمانی با مقدار کم نسبت به مقدار زیاد اختلاف معنی‌داری ($p=0/023$) همراه بود (نمودار ۱).

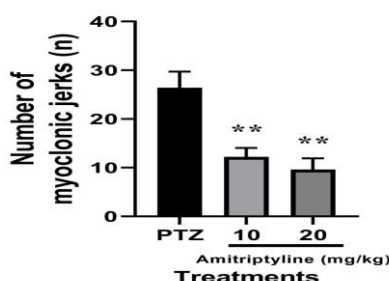


نمودار ۱) مقایسه میانگین زمان تأخیر انقباضات میوکلونیک (Latency of myoclonic jerks) در گروه‌های مورد آزمون. * نشانگر اختلاف معنی‌دار نسبت به کنترل تشنج. # نشانگر اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه درمانی با مقدار کم آمی‌تریپتیلین ($p<0/05$).

Fig 1) Comparison of mean delay time of myoclonic contractions (Latency of myoclonic jerks) in the test groups. * Indicates a significant difference in seizure control. # Indicates a significant difference compared to treatment group with low dose of amitriptyline ($*p < 0.05$).

– تعداد حرکات میوکلونیک (Number of Myoclonic Jerk)

در گروه‌های مورد آزمون نتایج حاصل شده از تعداد حرکات میوکلونیک نشان داد که در گروه‌های درمان شده با آمی‌تریپتیلین کاهش معنی‌داری در تعداد حرکات نسبت به کنترل تشنج ایجاد شد ($p=0/005$). تعداد حرکات در بین گروه‌های درمانی با مقادیر کم و زیاد فاقد اختلاف معنی‌دار شد ($p=0/759$)، (نمودار ۲).



نمودار ۲) مقایسه میانگین تعداد حرکات میوکلونیک (Number of myoclonic jerks) در گروه‌های مورد آزمون. * نشانگر اختلاف معنی‌دار نسبت به کنترل تشنج ($p<0/05$).

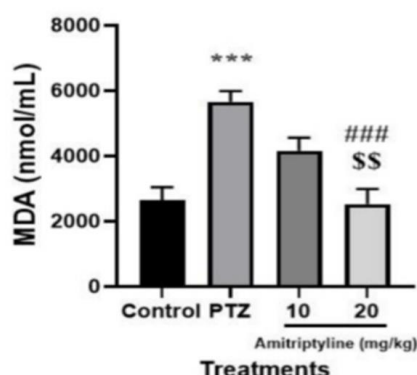
Fig 2) Comparison of the average number of myoclonic movements (Number of myoclonic jerks) in the test groups. * Indicates a significant difference compared to seizure control ($*p < 0.05$).

– نشانگرهای استرس اکسیداتیو

– اثر آمی‌تریپتیلین بر سطح سرمی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز

در گروه‌های مورد آزمون نتایج مقدار سطح سرمی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نشان داده شد که میزان آنزیم فوق در گروه دریافت‌کننده پنتیلین تترازول نسبت به گروه کنترل از کاهش معنی‌داری ($p<0/001$) برخوردار است. در گروه‌های درمان شده با آمی‌تریپتیلین میزان سطح سرمی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز افزایش پیدا کرد. در گروه درمان شده با مقدار کم آمی‌تریپتیلین افزایش سطح سرمی آنزیم

آلدئید نسبت به گروه کنترل تشنج ($p < 0.001$) و نسبت به گروه مقدار کم آمی‌تریپتیلین کاهش معنی‌داری ($p = 0.046$) را نشان داد (نمودار ۴).

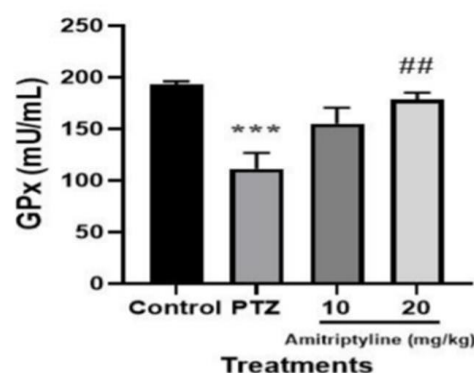


نمودار ۴) مقایسه میانگین سطح سرمی مالون دی آلدئید (MDA) در موش‌های مورد آزمون. * نشانگر اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل، # نشانگر اختلاف معنی‌دار نسبت به کنترل تشنج و \$ نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه درمانی با مقدار کم آمی‌تریپتیلین. ($*p < 0.05$).

Fig 4) Comparison of mean serum malondialdehyde (MDA) levels in rats tested. *Indicates a significant difference compared to the control group. # Indicates a significant difference compared to seizure control and \$ indicates a significant difference with the treatment group with low dose of amitriptyline. ($*p < 0.05$).

– اثر آمی‌تریپتیلین بر سطح سرمی نیتریک اکسید (NO)
سطح سرمی نیتریک اکساید در گروه کنترل تشنج به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد ($p < 0.001$). در گروه درمان شده با آمی‌تریپتیلین با مقادیر کم، سطح سرمی نیتریک اکساید نسبت به گروه کنترل از افزایش معنی‌داری برخوردار بود ($p = 0.036$). اما در گروه نسبت به گروه دریافت کنترل تشنج از کاهش معنی‌داری برخوردار شد ($p < 0.001$). سطح سرمی نیتریک اکساید در گروه درمان شده با مقدار زیاد آمی‌تریپتیلین نسبت به گروه کنترل فاقد اختلاف معنی‌دار بود (نمودار ۵).

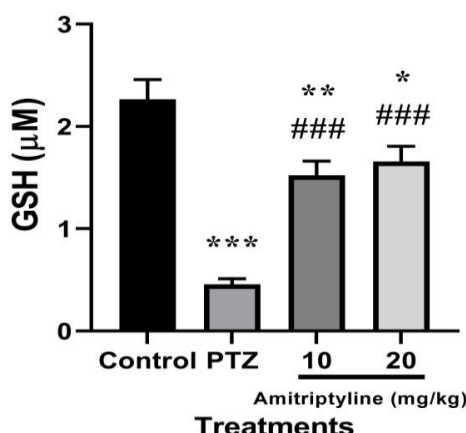
گلوکاتایون پراکسیداز نسبت به گروه کنترل و گروه دریافت کننده پنتیلن ترازول فاقد اختلاف معنی‌دار بود. اما در گروه درمانی با مقدار زیاد آمی‌تریپتیلین افزایش سطح سرمی آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز نسبت به گروه کنترل فاقد اختلاف معنی‌دار شد ولی نسبت به گروه کنترل تشنج دارای افزایش معنی‌دار بود ($p = 0.004$) (نمودار ۳).



نمودار ۳) مقایسه میانگین سطح سرمی آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) در موش‌های مورد آزمون. * نشانگر اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل. # نشانگر اختلاف معنی‌دار نسبت به کنترل تشنج. ($*p < 0.05$).

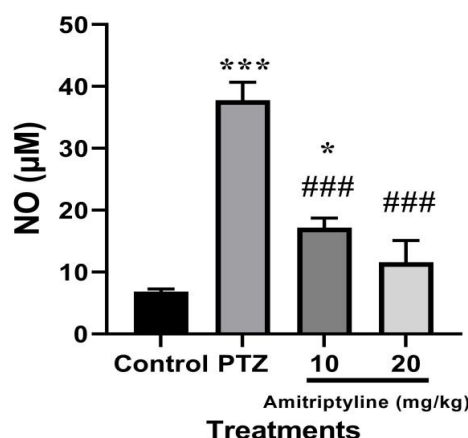
Fig 3) Comparison of mean serum levels of glutathione peroxidase (GPx) in rats. * Indicates a significant difference compared to the control group. # Indicates a significant difference compared to seizure control. ($*p < 0.05$).

– اثر آمی‌تریپتیلین بر سطح سرمی مالون دی آلدئید (MDA)
در گروه‌های مورد آزمون سطح سرمی مالون دی آلدئید نشان داد که میزان مالون دی آلدئید در گروه کنترل تشنج نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.001$). میزان مالون دی آلدئید در گروه درمانی با مقدار کم آمی‌تریپتیلین نسبت به گروه کنترل و همچنین گروه کنترل تشنج تفاوت معنی‌داری نداشتند. اما در گروه درمانی با مقدار زیاد آمی‌تریپتیلین سطح سرمی مالون دی



نمودار ۶) مقایسه میانگین سطح سرمی گلوپتاتیون (GSH) در موش‌های مورد آزمون. * نشانگر اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل. # نشانگر اختلاف معنی‌دار نسبت به کنترل تشنج. (* $p < 0.05$).

Fig 6) Comparison of mean serum glutathione (GSH) levels in rats tested. *Indicates a significant difference compared to the control group. #Indicates a significant difference compared to seizure control. (* $p < 0.05$).



نمودار ۵) مقایسه میانگین سطح سرمی نیتریک اکساید (NO) در موش‌های مورد آزمون. * نشانگر اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل. # نشانگر اختلاف معنی‌دار نسبت به کنترل تشنج. (* $p < 0.05$).

Fig 5) Comparison of mean serum nitric oxide (NO) levels in rats tested. *Indicates a significant difference compared to the control group. #Indicates a significant difference compared to seizure control. (* $p < 0.05$).

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که پتیلین تترازول موجب بروز تشنج در مدل‌های حیوانی صرع می‌شود. آمی‌تریپتیلین تا حد قابل قبولی از بروز تشنج در حیوانات مورد آزمون کاهش ایجاد کرد. تصور می‌شود آمی‌تریپتیلین احتمالاً توانسته باشد در رقابت با پتیلین تترازول بر سر اشغال کانال‌های یونی گابارژیکی، موجب بی‌اثر شدن اثرات پتیلین تترازول گردد. از عوامل ایجاد تشنج و همچنین تغییرات رفتاری ناشی از آن، استرس اکسیداتیو و انحراف گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) از حالت عادی آن است (۱۸). مغز به‌طور خاص، به دلیل مصرف بالای اکسیژن و همچنین وجود اسیدهای چرب غیراشباع در برابر استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیر است. گلوپتاتیون در سلول‌های مغزی سنتز می‌شود و نقش‌های متعددی از جمله پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد، تعدیل‌کننده ردوکس و انتقال‌دهنده عصبی را در سیستم عصبی مرکزی ایفا می‌کند. کاهش سرمی گلوپتاتیون

- اثر آمی‌تریپتیلین بر سطح سرمی گلوپتاتیون (GSH)

سطح سرمی گلوپتاتیون در خون موش‌های گروه‌های مورد آزمون نشان داد که میزان گلوپتاتیون در خون موش‌های گروه کنترل تشنج نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($p < 0.001$). میزان گلوپتاتیون در گروه درمان شده با مقادیر کم و زیاد آمی‌تریپتیلین نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.001$). اما در گروه‌های درمان شده سطح سرمی گلوپتاتیون نسبت به گروه کنترل از کاهش معنی‌داری برخوردار بودند ($p = 0.009$). سطح سرمی گلوپتاتیون در گروه‌های درمان شده نسبت به هم فاقد اختلاف معنی‌دار بود. (نمودار ۶).

می‌تواند استرس اکسیداتیو را افزایش دهد. سطوح فیزیولوژیکی گونه‌های اکسیژن فعال در سلول‌ها، توسط سیستم‌های آنزیمی نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD، Superoxide dismutase)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)، گلوکاتایون ردوکتاز (GR) و کاتالاز (CAT) و سیستم‌های غیرآنزیمی مانند ویتامین C، ویتامین E، کاروتن، سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی کوآنزیم Q، ملاتونین و اشکال احیا شده گلوکاتایون کاهش پیدا می‌کند (۱۹). در مطالعه‌ای که توسط انوشا و همکاران انجام شد سمیت نانوذره نیکل بر میزان آنتی اکسیدان کل و همچنین سطح سرمی مالون دی آلدئید و گلوکاتایون بررسی شد. نانوذره نیکل باعث افزایش مالون د آلدئید و کاهش سطح سرمی آنتی اکسیدان تام و گلوکاتایون شد که نشان دهنده تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو می‌باشد (۲۰). در مطالعه حاضر، نتایج نشان دهنده کاهش سطح سرمی گلوکاتایون و افزایش نیتریک اکساید بعد از تزریق پنتیلن تترازول بود. نتایج این مطالعه، همسو با نتایج حاصل از تحقیقات اخیر است که نشان می‌دهد تزریق پنتیلن تترازول در مدل‌های حیوانی سبب افزایش استرس اکسیداتیو و افزایش سطح سرمی نیتریک اکساید و کاهش سطوح آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۲۱). داروهای ضد صرع جدید بیشتر متمرکز بر کاهش روند اکسیداسیون در مغز و نوروها هستند. در مطالعه نازیروگلو (Naziroglu) و همکاران، مشخص شد که داروهای جدید ضد صرع (مانند توپیرامات و زونیسامید) اثرات پاک‌کننده‌ای بر تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال در انسان و حیوانات دارند (۲۲).

نتایج این پژوهش نشان داد که سطح سرمی مالونیل دی آلدئید افزایش و گلوکاتایون پراکسیداز کاهش پیدا نمود. این نتایج مشابه با بسیاری از نتایجی است که

نشان دادند متعاقب تزریق پنتیلن تترازول در مدل‌های حیوانی در اثر افزایش استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی افزایش و سطح آنتی‌اکسیدانی کاهش پیدا کرده‌اند (۲۳). مشخص شده است که استرس اکسیداتیو در تغییر مسیر سیگنالینگ نیتروژن واکنش‌پذیر (RNS، Reactive Nitrogen signaling)، گونه‌های اکسیژن فعال و نیتریک اکساید شرکت دارد (۲۴).

تاکنون اثرات آمی‌تریپتیلین بر نیتریک اکسید و گلوکاتایون احیا در وضعیت صرع گزارش نشده است. با توجه به یافته‌ها در مطالعه حاضر، اثرات مثبت آمی‌تریپتیلین بر تشنج را می‌توان تا حدی به خواص آنتی‌اکسیدانی آن نسبت داد. مطالعه حاضر برای اولین بار اثرات آنتی‌اکسیدانی آمی‌تریپتیلین را مورد بررسی قرارداد. گلوکاتایون نقش مهمی در کاهش استرس اکسیداتیو، حفظ تعادل ردوکس، افزایش سم زدایی متابولیک و تنظیم سیستم ایمنی بدن را دارد. گلوکاتایون در داخل سلول‌ها در حالت‌های کاهش یافته یا احیا شده و یا اکسید شده که به آن فرم دی سولفید (GSSG) نیز می‌گویند، وجود دارد. در سلول‌ها و بافت‌های سالم بیش از ۹۰ درصد کل گلوکاتایون در فرم کاهش یافته است. در حالی که کمتر از ۱۰ درصد در فرم دی سولفید گلوکاتایون وجود دارد. کاهش گلوکاتایون می‌تواند استرس اکسیداتیو را افزایش دهد. همچنین ممکن است سطح سمیت تحریکی مولکول‌ها را افزایش دهد. هر دو عمل می‌توانند مرگ سلولی را در سلول‌های عصبی مشخص در پی داشته باشند (۲۵).

رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط واکنش‌های آنزیمی خارج از میتوکندری نظیر گزانتین اکسیداز، نیتریک اکسید سنتتاز، سیکلواکسیژناز، لیپواکسیژناز، سیتوکروم p450 و NADPH اکسیداز هم تولید می‌شوند. برای

کنترل نورورژنر ناشی از تشنج می‌توان آنزیم‌های فوق را مورد هدف قرار داد (۲۶). میزان بیش از حد نیتریک اکساید در مغز با آسیب بافتی و فرآیندهای تحلیل عصبی مرتبط است. در سیستم عصبی مرکزی و محیطی، نیتریک اکساید از طریق اثر آنزیم nNOS بر آرژنین تولید می‌شود. مهار آنزیم nNOS از طریق تولیدات دارویی می‌تواند درمانی امیدوارکننده برای برخی از انواع بیماری‌های عصبی باشد (۲۷). نیتریک اکساید در مغز از L- آرژنین توسط نیتریک اکساید سنتاز تولید می‌شود و در تنظیم عملکردهای متعدد در اندام‌های مختلف شرکت می‌کند. از واکنش نیتریک اکساید با رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، پراکسی نیتریت تشکیل می‌شود که در نهایت در طول استرس اکسیداتیو به DNA، لیپید و پروتئین آسیب می‌رساند (۲۸). همچنین گزارش شده است که نیتریک اکساید در تشنج‌های ناشی از پتیلین ترازول افزایش می‌یابد (۲۹). هم راستا با مطالعه حاضر، در پژوهش انجام شده توسط تاسکیران (Taskiran) و همکاران، که به بررسی اثرات لیکوپن بر میزان نیتریک اکساید پرداخته است، مشخص شد که لیکوپن، میزان iNOS، nNO و نیتریک اکساید را در قشر و هیپوکامپ پس از تشنج‌های صرعی ناشی از تزریق پتیلین ترازول کاهش داده است (۳۰).

در این تحقیق با استفاده از مقادیر کم و زیاد آمی‌تریپتیلین، سطح سرمی نیتریک اکساید در گروه‌های درمان شده با آمی‌تریپتیلین به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. به نظر می‌رسد که آمی‌تریپتیلین توانسته باشد در مهار آنزیم‌های مؤثر در سنتز نیتریک اکساید نقش تأثیرگذاری داشته باشد. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که آمی‌تریپتیلین از نظر آماری تأثیر قابل توجهی در تظاهرات رفتاری تشنجی در مقایسه با

گروه دریافت کننده پتیلین ترازول داشت. علاوه بر این نشان داده شده که درمان موش‌های صرعی شده با آمی‌تریپتیلین سبب می‌شود که سطح سرمی آنزیم گلوکاتیون پراکسیداز در مقایسه با گروه دریافت کننده پتیلین ترازول به تنهایی افزایش پیدا کند. این آنزیم نقش مهمی در محافظت ارگان‌های سلولی در برابر استرس اکسیداتیو دارد. بنابراین می‌توان چنین احتمال داد که آمی‌تریپتیلین در مهار مسیرهای اکسیدانی داخل سلولی مداخله نموده و تولید گونه‌های فعال اکسیژنی را مهار می‌کند. اینکه چگونه آمی‌تریپتیلین توانسته باشد در افزایش گلوکاتیون پراکسیداز و کاهش مالونیل دی‌آلدهید نقش داشته باشد گزارشی در دست نیست و لذا نیاز به مطالعات بیشتری در این خصوص می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر نشان داده شد که اثرات محافظت‌کنندگی عصبی داروی آمی‌تریپتیلین در موش‌های صرعی شده توسط پتیلین ترازول وجود دارد. این دارو قادر است در برابر استرس اکسیداتیو ایجاد شده در حین تشنج نقش محافظت‌کنندگی داشته باشد.

سپاس و قدردانی

این مقاله بر گرفته شده از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی با گرایش فیزیولوژی جانوری می‌باشد که در دانشگاه بوعلی سینا همدان بانجام رسیده است. نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا بابت کمک‌های مالی که در قالب گرنت پژوهشی صورت پذیرفته است نهایت تشکر و قدردانی را نمایند.

تضاد منافع

بیان نشده است.

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان مقاله

References:

1. Kumar A, Lalitha S, Mishra J. Possible Nitric Oxide Mechanism In The Protective Effect Of Hesperidin Against Pentylentetrazole (PTZ)-Induced Kindling And Associated Cognitive Dysfunction In Mice. *Epilepsy Behav* 2013; 29(1): 103-11.
2. Sunhaya S, Manimegalai P. Detection Of Epilepsy Disorder in EEG Signal. *Int J Emerg Develop* 2012; 2(2): 473-9.
3. Beghi E, Carpio A, Forsgren L, et al. Recommendation For A Definition Of Acute Symptomatic Seizure. *Epilepsia* 2010; 51(4): 671-5.
4. Davidson L, Derry C. Seizure Classification Key To Epilepsy Management. *Practitioner* 2015; 259(1785): 13-9.
5. Mishra A, Goel RK. Adjuvant Anticholinesterase Therapy For The Management Of Epilepsy-Induced Memory Deficit: A Critical Pre-Clinical Study. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2014; 115(6): 512-7.
6. Rico-Villademoros F, Slim M, Calandre EP. Amitriptyline For The Treatment Of Fibromyalgia: A Comprehensive Review. *Expert Rev Neurother* 2015; 15(10): 1123-50.
7. Akyuz E, Polat AK, Eroglu E, et al. Revisiting The Role Of Neurotransmitters In Epilepsy: An Updated Review. *Life Sci* 2021; 265: 118826.
8. Perucca P, Gilliam FG. Adverse Effects Of Antiepileptic Drugs. *Lancet Neurol* 2012; 11(9): 792-802.
9. Kazmi Z, Zeeshan S, Khan A, et al. Anti-Epileptic Activity Of Daidzin in PTZ-Induced Mice Model By Targeting Oxidative Stress and BDNF/VEGF Signaling. *Neurotoxicology* 2020; 79: 150-63.
10. Reuber M, Gore J, Wolstenhome J, et al. Examining A Community Model Of Epilepsy Care For People With Learning Disabilities. *Seizure* 2008; 17(1): 84-91.
11. Sazhina TA, Sitovskaya DA, Zabrodskaya YM, et al. Functional Imbalance Of Glutamate- and GABAergic Neuronal Systems in the Pathogenesis of Focal Drug-Resistant Epilepsy in Humans. *Bull Exp Biol Med* 2020; 168(4): 529-32.
12. Karimzadeh F, Jafarian M, Gharakhani M, et al. Behavioural And Histopathological Assessment Of The Effects Of Periodic Fasting On Pentylentetrazol-Induced Seizures In Rats. *Nutr Neurosci* 2013; 16(4): 147-52.
13. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, et al. Oxidative Stress And Oxidative Damage In Chemical Carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 254(2): 86-99.
14. Shehta N, Kamel AE, Sobhy E, et al. Malondialdehyde and superoxide dismutase levels in patients with epilepsy: a case –control study. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*. 2022; 58(51): <https://doi.org/10.1186/s41983-022-00479-5>
15. Uysal N, Sisman AR, Dayi A, et al. Acute Footshock-Stress Increases Spatial Learning–Memory And Correlates To Increased Hippocampal BDNF and VEGF And Cell Numbers In Adolescent Male And Female Rats. *Neurosci lett* 2012; 514(2): 141-6.
16. Salehi M, Mirkhalaf A, Barekatein M. Amitriptyline Efficacy In Control Of Acute Opioid Withdrawal Sundrome. *Koomesh* 2005; 6(3): 195-200. (Persian)
17. Farhadi E, Mirazi N, Hosseini A. Investigation Of Efficacy Of Asenapine On Passive Avoidance Learning And Memory And Oxidative Stress In Animal Model Of Seizure-Induced With Pentylentetrazole. *Acta Biol Szegediensis* 2021; 2(65): 247-52.
18. Olowe R, Sandouka S, Saadi A, et al. Approches For Reactive Oxygen Speices And Oxidative Stress Quantification In Epilepsy. *Antioxidants* 2020; 9(10): 990.

19. Munguia-Martinez MF, Nava-Ruiz C, Ruiz-Diaz A, et al. Immunohistochemical Study Of Antioxidant Enzymes Regulated by Nrf2 in the Models Of Epileptic Seizures (KA and PTZ). *Oxid Med Cell Longv* 2019; 2019: 1327986.
20. Anoosha F, Seyedalipour B, Hoseini SM. Toxicity of Nickel Nanoparticles and Nickel Chloride on Activity of Antioxidant Enzymes and Level of Lipid Peroxidation in Liver and Serum of Rats. *Iran South Med J* 2020; 23(1): 14-26.
21. Kawakami Y, Murashima YL, Tsukimoto M, et al. The Roles Of Dominance Of The Nitric Oxide Fractions Nitrate And Nitrite in the Epilepsy-Prone EL Mouse Brain. *J Nippon Med Sch* 2021; 88(3): 189-93.
22. Nazıroğlu M, Yürekli VA. Effects Of Antiepileptic Drugs On Antioxidant And Oxidant Molecular Pathways: Focus On Trace Elements. *Cell Mol Neurobiol* 2013; 33(5): 589-99.
23. Hassanzadeh P, Arbabi E, Rostami F. The Ameliorative Effects Of Sesamol Against Seizures, Cognitive Impairment And Oxidative Stress In The Experimental Model Of Epilepsy. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17(2): 100-7.
24. Patel M. Mitochondrial Dysfunction And Oxidative Stress: Cause And Consequence Of Epileptic Seizures. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(12): 1951-62.
25. Minich DM, Brown BI. A Review of Dietary (Phyto) Nutrients For Glutathione Support. *Nutrients* 2019; 11(9): 2073.
26. Pearson-Smith JN, Patel M. Metabolic Dysfunction and Oxidative Stress in Epilepsy. *Int J Mol Sci* 2017; 18(11): 2365.
27. Mirzaei F, Khazaei M. Role Of Nitric Oxide In Biological Systems: A Systematic Review. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2017; 27(150): 192-222. (Persian)
28. Tripathi MK, Kartawy M, Amal H. The Role Of Nitric Oxide In Brain Disorders: Autism Spectrum Disorder And Other Psychiatric, Neurological, And Neurodegenerative Disorders. *Redox Biol* 2020; 34: 101567.
29. Kovács R, Rabanus A, Otáhal J, et al. Endogenous Nitric Oxide Is A Key Promoting Factor For Initiation Of Seizure-Like Events In Hippocampal And Entorhinal Cortex Slices. *J Neurosci* 2009; 29(26): 8565-77.
30. Taskiran AS, Tastemur Y. The Role Of Nitric Oxide In Anticonvulsant Effects Of Lycopene Supplementation On Pentylentetrazole-Induced Epileptic Seizures In Rats. *Exp Brain Res* 2021; 239(2): 591-9.

Original Article

Amitriptyline Effects on Pentylentetrazole-Induced Oxidative Stress in Epileptic Male Wistar Rats

N. Mirazi (PhD)^{1*}, S. Niyazi (MSc)¹, A. Hosseini (PhD)², Z. Izadi (PhD)³

¹ Department of Biology, School of Basic Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

² Department of Physiology, School of Basic Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

³ Department of Horticultural Sciences and Engineering, Nahavand Higher Education Complex, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

(Received 8 Mar, 2022

Accepted 12 Jun, 2022)

Abstract

Background: Drug-induced epilepsy can be caused by certain medications and chemical agents. Oxidizing agents are among the chemical compounds that cause epilepsy. The aim of this study was to evaluate the anticonvulsant and antioxidant effects of amitriptyline on pentylentetrazole (PTZ)-induced seizure in male rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 28 male Wistar rats (200-250 g) were used. Rats were randomly divided into four groups (n=7): Control (0.5 ml normal saline), PTZ (PTZ, 60 mg/kg), treatment group 1 (PTZ, 60 mg/kg + amitriptyline, 10 mg/kg), treatment group 2 (PTZ, 60 mg/kg + amitriptyline, 20 mg/kg). All injections were intraperitoneal. At the end of the experiments, the rats were anesthetized with ketamine hydrochloride (50 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) and their blood samples were directly drawn from the heart and then the sera were isolated. Oxidative stress markers such as GPx, MDA, NO and GSH were measured. The results were statistically analyzed using one-way ANOVA and Tukey's test to examine the differences between the groups.

Results: The results of this study showed that the delay in myoclonic jerks increased in the amitriptyline-treated groups compared to the PTZ group. Also, the delay of general tonic-clonic seizures increased in the treated groups compared to the PTZ group. In addition, serum levels of GSH and GPx in the PTZ group showed a significant decrease compared to the control group. Serum levels of MDA and NO in the PTZ group showed a significant increase compared to the control group.

Conclusion: Amitriptyline is able to reduce the seizures induced by PTZ injection in rats. Also, it showed a suppressing effect on some oxidizing agents in this study.

Keywords: Amitriptyline, Antioxidant, Epilepsy, Glutathione peroxidase, Pentylentetrazole, Malondialdehyde

©Iran South Med J. All right reserved

Cite this article as: Mirazi N, Niyazi S, Hosseini A, Izadi Z. Amitriptyline Effects on Pentylentetrazole-Induced Oxidative Stress in Epileptic Male Wistar Rats. Iran South Med J 2022; 25(2): 93-104

*Address for correspondence: Department of Biology, School of Basic Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
E.mail: mirazi205@gmail.com

*ORCID: 0000-0002-8664-3220

Website: <http://bpums.ac.ir>

Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>