

اثر تعدیل کننده آسپرین بر رفتار شبه اضطرابی القاء شده بوسیله کیندلینگ پنتیلن تترازول

معصومه نظیفی^۱، فتح ا... فتحی آذربایجانی^۲، مینو ایلخانی پور^۲، فرح فرخی^۲

فصلنامه علوم مغز و اعصاب ایران، سال هشتم، شماره ۲۵، بهار ۱۳۸۸، ۴۲۷-۴۳۵

چکیده

سابقه و هدف: صرع در انسان بوسیله تشنجات به همراه نقص های احساسی و روانی نسبی شناخته می شود. افسردگی و اضطراب رایج ترین شکل آسیب روانشناختی یا ناهنجاری های تشنجی می باشد. التهاب عصبی نه تنها در علت شناسی یا نوروپاتولوژی بیماری های تخریب کننده نورونی، بلکه همچنین در تعدادی از ناهنجاری های روانی دخیل است. کیندلینگ مدلی از صرع مزمن است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر آسپرین یک داروی التهابی غیر استروئیدی و مهارکننده غیر انتخابی آنزیم سیکلواکسیژناز بر رفتار شبه اضطرابی در رت های نر کیندله بود.

روش بررسی: سه گروه موش صحرایی نر (۸ موش در هر گروه) روزانه به ترتیب با حامل (حلال) و آسپرین با دو دوز ۳۰ و ۱۵ mg/kg به صورت دهانی تیمار شدند. کیندلینگ بوسیله تجویز دوز زیر تشنجی پنتیلن تترازول (۴۰ mg/kg، درون صفاقی) هر ۴۸ ساعت یکبار القاء شد. پارامترهای رفتاری کیندلینگ در گروه های کنترل و تیمار شده با آسپرین تعیین شد. ماز بعلاوه مرتفع با ترکیب درصد زمان سپری شده در بازوی باز (OAT%) و درصد ورودی های بازوی باز (OAE%) برای اندازه گیری اضطراب مورد استفاده قرار گرفت. افزایش در میزان OAT% و OAE% بیان کننده اثر ضد اضطرابی (کاهش اضطراب) می باشد. در حالیکه کاهش در OAE% و OAT% بیان کننده اثر اضطراب زا می باشد.

یافته ها: کیندلینگ به شکل معنی داری ($P < 0/05$) میزان اضطراب را در رت ها افزایش داد (کاهش در میزان OAE% و OAT%). آسپرین در هر دو دوز ۳۰ و ۱۵ mg/kg سبب افزایش معنی داری ($P < 0/05$) در میزان OAT% و OAE% شد که نشان دهنده کاهش اضطراب در رت های کیندله می باشد. همچنین افزایش معنی داری در فعالیت حرکتی ($P < 0/05$) حیوانات مشاهده شد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که آسپرین سبب بهبود سطح های افزایش یافته اضطراب در رت های کیندله می شود.

واژگان کلیدی: آسپرین، اضطراب، صرع، کیندلینگ، پنتیلن تترازول

^۱ کارشناس ارشد فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه nazifimaesome@yahoo.com

^۲ استادیار، عضو هیئت علمی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

مقدمه

صرع یکی از بزرگترین ناهنجاری های مغزی است که تقریباً ۱/۰-۰/۵٪ از جمعیت جهان را درگیر می‌سازد.^(۱) صرع در انسان بوسیله تشنجات به همراه نقص‌های احساسی و روانی نسبی شناخته می‌شود. افسردگی و اضطراب رایج‌ترین شکل آسیب روانشناختی یا ناهنجاری های تشنجی می‌باشد.^(۲) کیندلینگ پنتیلن تترازول یک مدل شناخته شده از صرع مزمن است و به پدیده‌ای که در آن تزریق مکرر دوز زیر تشنجی یک تحریک کننده سیستم عصبی مرکزی پنتیلن تترازول سبب گسترش تشنجات بادوام و تدریجی می‌شود اشاره می‌کند.^(۳) کیندلینگ ممکن است رفتار شبه اضطرابی را در جوندگان افزایش دهد.^(۴)

التهاب عصبی نه تنها در علت شناسی یا نوروپاتولوژی بیماری های تخریب کننده نورونی، بلکه همچنین در تعدادی از ناهنجاری‌های روانی و دماغی دخیل است.^(۴) تشنجات و صرع می‌تواند به دنبال وقایعی که پاسخ های التهابی را در سیستم عصبی مرکزی را القاء می‌کند ایجاد شود.^(۵) هدف اصلی دارو های ضد التهابی غیر استروئیدی آنزیم سیکلواکسیژناز است که آنزیمی کلیدی در متابولیسم آراشیدونیک اسید به پروستاگلندین است. این آنزیم به شکل پایداری در بافت‌های نورونی بیان می‌شود و تصور می‌شود در ناهنجاری‌های تخریب کننده نورونی همانند آلزایمر، افسردگی، بیماری هانگتینتون علاوه بر دخیل بودن در درد و التهاب درگیر باشد.^(۶)

اخیراً گزارش شده سیکلواکسیژناز نقش مهمی در ناهنجاری های عصبی و روانی ایفا می‌کند.^(۷) شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد گروه خاصی از داروهای ضد اضطراب و افسردگی همانند مهارکننده‌های آنزیم سیکلواکسیژناز، بوسیله کاهش

غلظت پروستاگلندین های التهابی در مغز، اثر زیان آور تغییرات التهابی روی عملکرد نوروترانسمیترها را کاهش می‌دهند.^(۸) اثرات حمایت کننده داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی بر تغییر فعالیت حرکتی و رفتار شبه اضطرابی القاء شده با استرس بی تحرکی در موش‌های صحرایی نشان داده شده است.^(۹) در این مطالعه به بررسی اثر آسپرین یک داروی التهابی غیر استروئیدی بر رفتار شبه اضطرابی در رت‌های نر کیندله می‌پردازیم.

روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی بود در این تحقیق از موش های صحرایی نر نژاد آلبینو (تهیه شده از مرکز نگه داری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه ارومیه) با وزن ۱۵۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات در اتاقی با درجه حرارت ۲۴ درجه سانتی گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگه داری شدند و به جز در هنگام آزمایش‌ها آب و غذا به طور آزادانه در اختیار آنها قرار گرفت. همه آزمایشات بین ساعات ۹ تا ۱۵ انجام شد.

۳ گروه از موش‌ها (۸ تایی) روزانه با نرمال سالین و آسپرین در دو دوز ۱۵۰ و ۳۰۰ mg/kg به صورت گاوژ تیمار شدند و بوسیله دوز زیر تشنجی پنتیلن تترازول ۴۰ mg/kg به صورت درون صفاقی هر ۴۸ ساعت یکبار (۴۵ دقیقه بعد از تیمار با نرمال سالین و آسپرین) تزریق شدند. یک گروه جداگانه از موش‌ها فقط نرمال سالین را در سراسر بررسی به صورت گاوژ دریافت کردند و به عنوان گروه کنترل عمل کردند. نرمال سالین نیز هر ۴۸ ساعت یکبار به صورت درون صفاقی به این گروه تزریق شد. بعد از تزریق هر موش به شکل جداگانه در یک جعبه از جنس شیشه فشرده (Plexi glass) با ابعاد (۲۰ × ۶۰ × ۲۰) قرار

شکل (+) می باشد که از چهار بازو تشکیل شده است. دو تا از بازوها دارای هیچ دیواره ای نیست و دو بازوی دیگر دارای دیواره های جانبی و انتهایی ولی بدون سقف می باشند. این ماز به اندازه ۵۰ cm بالاتر از سطح زمین قرار گرفته است. حداقل یک ساعت قبل از تست رت ها در اتاقی که برای تست استفاده می شود قرار می گیرند. رت ها به طور تصادفی مورد آزمایش قرار می گیرند. رت ها به صورت تک تک و رو به بازوی باز در روی EPM و در مربع وسط ماز قرار داده می شوند و به آن ها اجازه داده می شود تا پنج دقیقه آزادانه حرکت کنند. تعداد ورودی های بازوی باز، بازوی بسته و زمان سپری شده در بازوی باز یا بسته مورد ارزیابی قرار می گیرند. ورود به هر بازو به ورود چهار دست و پای حیوان به بازو اطلاق می گردد و خروج از هر بازو نیز به خروج چهار دست و پای حیوان گفته می شود. درصد ورود به بازوی باز و درصد زمان سپری شده در بازوی باز توسط فرمول های زیر محاسبه می گردد:

% Open Arm Time (OAT) عبارت از درصد زمانی که موش در بازوی باز طی کرده است و نحوه محاسبه آن به این ترتیب می باشد:

گرفت و رفتار آن ها با استفاده از دوربین فیلمبرداری ضبط و بازبینی شد. درجه پاسخ رفتاری به شکل پیشرونده ای در طول روزها افزایش یافت تا حیوانات تشنجات حرکتی کامل را نشان دادند. پاسخ های تشنجی حیوان بر اساس تحقیقات قبل به شکل زیر طبقه بندی شدند:

مرحله صفر: عدم پاسخ

مرحله اول: انقباض عضلات صورت و گوش ها

مرحله دوم: موج انقباضی بدن

مرحله سوم: پرش های میوکلونیک و ایستادن روی دو پا

مرحله چهارم: افتادن به پهلو

مرحله پنجم: افتادن به پشت و حملات عمومی تونیک و کلونیک

بعد از اینکه موش ها سه بار پیپی در اثر تزریق PTZ مرحله پنجم تشنج را از خود نشان دادند به عنوان موش های کیندله در نظر گرفته شدند و تزریق PTZ در آن ها پایان پذیرفت.

پس از القاء کیندلینگ رفتار اضطرابی موش ها در دستگاه Elevated Plus Maze (EPM) مورد ارزیابی قرار گرفت. این دستگاه یک ماز بعلاوه

$$OAT\% = \frac{OAT}{OAT + CAT} \times 100$$

Close Arm Time (CAT) عبارت از زمان سپری شده در بازوی بسته.

% Open Arm Entries (OAE) عبارت از درصد زمانی تعداد دفعاتی که موش وارد بازوی باز شده است و فرمول

آن نیز به صورت زیر می باشد:

$$OAE\% = \frac{OAE}{OAE + CAE} \times 100$$

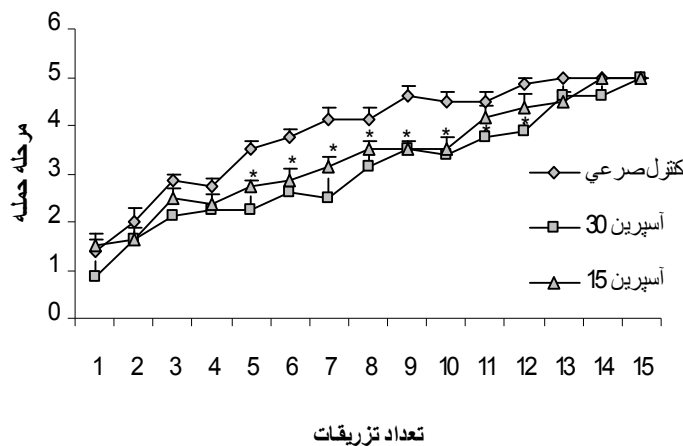
Close Arm Entries (CAE) عبارت است تعداد دفعات ورود به بازوی بسته

یافته ها

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که تزریق مکرر پنتیلین تترازول سبب پیشرفت کیندلینگ در حیوانات تحت تجربه شده است. همان گونه که در نمودار ۱ دیده می شود اختلافاتی در مرحله حمله بین گروه های دریافت کننده آسپرین با گروه کنترل صرعی دیده می شود و شدت اکتساب کیندلینگ در این گروه ها از گروه کنترل صرعی کمتر می باشد که این اختلاف در مورد دوز ۳۰ میلی گرم بیشتر می باشد.

تعداد کل دفعات ورود به بازو ها به عنوان معیار فعالیت حرکتی حیوان مورد ارزیابی قرار می گیرد. افزایش در %OAE و %OAT بیان کننده اثر ضد اضطرابی، در حالیکه کاهش در %OAE و %OAT بیان کننده اثر اضطراب زا می باشد.

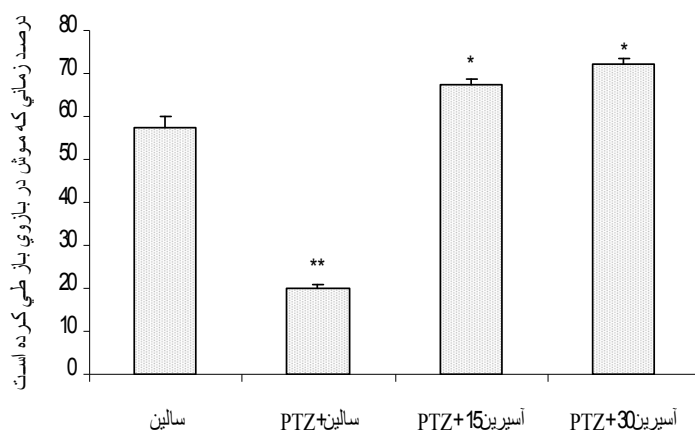
آنالیز داده ها: برای تجزیه و تحلیل داده ها ورسم نمودار ها به ترتیب از نرم افزار SPSS و Excel استفاده شد. نتایج حاصل به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین ارائه گردیده است. توزیع نرمال داده ها توسط آزمون نرمالیتی کولموگراف-اسمیرنوف بررسی شد. در مورد اثر آسپرین بر شاخص های اضطراب و فعالیت حرکتی از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون Tukey استفاده شد. برای بررسی اثر آسپرین بر روند ایجاد کیندلینگ از آزمون کراسکال والیس و من ویتنی یو استفاده گردید.



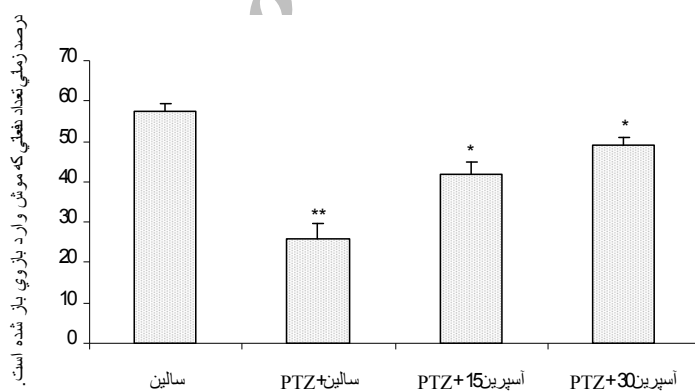
نمودار ۱. اثر تیمار مزمن با آسپرین (۳۰ و ۱۵ میلی گرم) بر تکامل مرحله حمله $P < 0.05$ *

کیندله افزایش داد و با افزایش آن سبب کاهش اضطراب در رت های کیندله شد که این افزایش در مورد دوز ۳۰ mg/kg بیشتر بوده است (نمودار ۲).

کیندلینگ به شکل معنی داری ($P < 0.05$) سبب کاهش OAT% و OAE% در رت ها شد که نشان دهنده افزایش اضطراب در آنها می باشد. آسپرین در هر دو دوز (۱۵ و ۳۰ mg/kg) به شکل معنی داری OAT% و OAE% را در رت های



(الف)



(ب)

نمودار ۲- اثر تیمار مزمن با آسپرین بر اضطراب القاء شده بوسیله کیندلینگ پنتیلن تترازول

الف- درصد زمانی که موش در بازوی باز طی کرده است (OAT%)

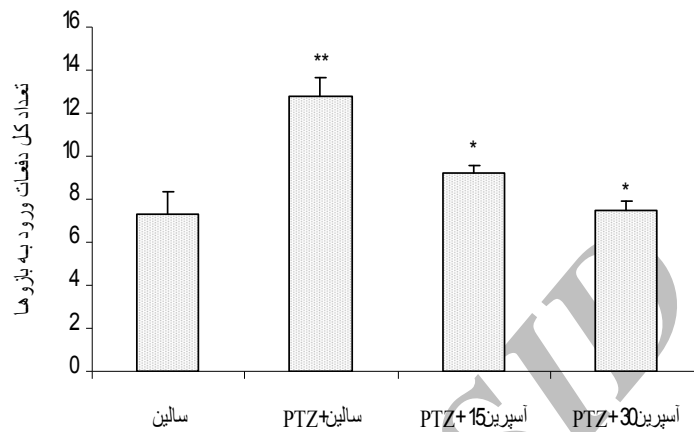
ب- درصد زمانی تعداد دفعاتی که موش وارد بازوی باز شده است (OAE %)

در نمودار داده ها به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین نشان داده شده است.

$P < 0.05$ ** در مقایسه با گروه کنترل سالم

$P < 0.05$ * در مقایسه با گروه کنترل صریح

همچنین سیدیلیند به سدل معنی داری سبب افزایش تعالیب حرسی در حیوانات سد واسپرین در هر دو دوز به شکل معنی داری سبب تعدیل فعالیت حرکتی در رت های کیندله شد (نمودار ۳). در همه ی این بررسی ها دوز ۳۰ mg/kg مؤثر تر بود.



نمودار ۳- اثر تیمار مزمن با آسپرین بر فعالیت حرکتی افزایش یافته ناشی از کیندلینگ پنتیلن تترازول

در نمودار داده ها به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین نشان داده شده است.

$P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل سالم

$P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل صرعی

بحث

بین تغییرات در واسطه های التهابی و سطح اضطراب در مدل های آزمایشگاهی وجود دارد مثلاً تجویز لیوپولی ساکارید که سبب افزایش سطوح سیتوکین های التهابی در مغز رت ها می شود سبب افزایش میزان اضطراب بررسی شده با استفاده از EPM شد و داروی ضدالتهابی غیر استروئیدی ایندومتاسین سبب بهبود علائم اضطراب در این حیوانات شد.^(۱۴) فراتر از این پیشنهاد شده است که داروهایی که سبب کاهش اضطراب می شوند، علائم اضطراب را با استفاده از عملکردهای ضد التهابی سرکوب می کنند.^(۸) سیتوکین های التهابی به وسیله تحریک تولید سایر واسطه های التهابی همانند نیتريت اکسید (NO) و پروستاگلندین ها ممکن است به شکل غیر مستقیم بر عملکرد سیستم عصبی مرکزی

فرایندهای التهابی در بیماری های تخریب کننده نورونی حاد و مزمن دخیلند.^(۱۰) تشنجات و صرع می تواند به دنبال وقایعی که پاسخ های التهابی سیستم عصبی مرکزی را القاء می کند ایجاد شود و بیان سیتوکین های التهابی در بیماری صرع افزایش می یابد.^{(۵) و (۱۱)} فرایندهای التهابی همانند فعالیت سیکلواکسیژناز و تشکیل پروستاگلندین ها در مغز بعد از تشنجات القاء شده در مدل های آزمایشگاهی و موارد کلینیکی صرع گزارش شده است.^(۱۲) علائم فرایند های التهابی مخصوصاً افزایش سیتوکین های التهابی و افزایش سطوح پروستاگلندین ها به شکل مکرر در اضطراب و افسردگی مزمن شرح داده شده است.^(۱۳) مطالعات نشان داده است که روابطی

اثر گذار باشند.^(۱۵-۱۶-۱۷-۱۸) داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی تولید سیتوکین های التهابی مخصوصاً پروستاگلندین ها را مهار می کنند.^(۱۳) یافته های گوناگون بیان می کند که NO ممکن است در ناهنجاری های مرتبط با اضطراب نقش داشته باشد.^(۱۹) مقادیر بالای آنزیم نیتريت اكسيد سنتاز در نواحی از مغز که در تعدیل اضطراب درگیرند یافت شده است.^(۲۰) داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز فعالیت آنزیم نیتريت اكسيد سنتاز قابل القاء را کاهش می دهد.^(۲۱) از طرف دیگر داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی رادیکال های آزاد نیتريت اكسيد را زباله زدایی می کنند.^(۲۲) افزایش در اضطراب ممکن است با افزایش در فعالیت حرکتی همراه باشد. دهنر و همکارانش اثر داروی ضد التهابی ناپروکسن را بر رفتار اضطرابی و فعالیت حرکتی رت های کیندله بررسی و گزارش نمودند که ناپروکسن به شکل معنی داری سبب کاهش علائم اضطرابی و فعالیت حرکتی در رتهای کیندله می شود.^(۱)

در مطالعه حاضر رت های کیندله، ۲۴ ساعت بعد از تزریق PTZ فعالیت حرکتی افزایش یافته ای را نشان دادند. این ممکن است به این علت باشد که کیندلینگ یک افزایش در قدرت ارتباطات سیناپسی تحریکی و کاهش در قدرت ارتباطات سیناپسی مهارتی القاء می کند.^(۱)

صرع زایی با پنتیلن ترازول منجر به تقویت سیستم تحریکی گلوتامات رژیک می شود که منجر به

ناهنجاری های رفتاری همانند اضطراب و افسردگی می شود.^(۲۳)

گلوتامات و گیرنده آن N-متیل دی آسپاراتات (NMDA) نقش کلیدی در تولید تشنجات کیندلینگ ایفا می کند.^(۲۴،۲۵) اخیراً مطالعات حیوانی گوناگون شروع به بررسی نقش گلوتامات در طول اضطراب و استرس شدید نموده اند. موش های فاقد گیرنده NMDA به استرس القاء شده به وسیله ماز بعلاوه مرتفع کمتر حساسند.^(۲۶) تیمار روزانه با آسپرین فعالیت حرکتی افزایش یافته را در رت های کیندله تعدیل کرد.

پروستاگلندین ها بر آبشار انتقال پس سیناپسی سلول هایی که دارای گیرنده N-متیل دی آسپاراتات (NMDA) گلوتامات می باشند اثر تسهیل کننده دارند و از طرف دیگر با مهار جذب آستروسیتی گلوتامات سبب تقویت سیستم گلوتامات رژیک می شوند.^(۲۷) بنابراین مهار سنتز پروستاگلندین ها ممکن است در کاهش علائم اضطراب مشاهده شده در رت های کیندله مؤثر باشد.

موارد ذکر شده در بالا جهت توجیه اثرات مشاهده شده در این بررسی می باشد و اثبات تک تک آن نیازمند مطالعات بیشتر می باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که آسپرین سبب بهبود علائم اضطرابی افزایش یافته در رت های کیندله می شود.

منابع

- 1) Dhir A, Patipati S, Kulkarni N. Effect of naproxen a non-selective cyclooxygenase inhibitor on pentylenetetrazol-induced kindling. *Clinical and experimental pharmacology* 2005; 32:579-584.

- 2) Robert A, Jacqueline B, Paul B. Anxiolytic effect of kindling role of anatomical location of the kindling electrode in response to kindling of right basolateral amygdala. *Brain Research* 2005; 1024:44-58.
- 3) Rauca C, Zebra R, Jantze H. Formation of free hydroxyl radicals after pentylentetrazol-induced seizure and kindling. *Brain Res* 1999; 847:387.
- 4) Mizuno M, Sotpyama H, Narita E, Kawamura H, Namba H, Zheng Y, Eda T, Nawa H. A cyclooxygenase-2 inhibitor ameliorates behavioral impairments induced by striatal administration of epidermal growth factor. *Neuroscience* 2007; 38:10116-27.
- 5) Vezzani A, Moneta D, Richichi C, Aliprandi M. Functional role of inflammatory cytokine and anti-inflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *epilepsia* 2002; 43:30-35.
- 6) Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. Neuroprotective effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on neurodegenerative disease. *Curr Pharm* 2004; 10:695-700.
- 7) Marcheselli V, Bazan N. Sustained induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by seizures in hippocampus. *Bio Chem* 1996; 27:794-90.
- 8) Kenneth M, Jamil M. Drug Disease Interactions: Role of inflammatory mediators in depression variability in antidepressant drug. *Pharmaceut Sci.* 2006; 9:292-306.
- 9) Kumari B, Kumar A, Dhir A. Protective effect of non-selective COX-2-inhibitors in acute immobilization stress-induced behavioral and biochemical alterations. *Pharmacological Reports* 2007; 59:699-707.
- 10) Allan S, Rathwell N. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci* 2001; 2:734-744.
- 11) Voutsinos-Proche B, Koning E, Kaplan H, Ferradon A, Guenounou M, Nehlig A, Motte J. Temporal patterns of cerebral inflammatory response in the rat lithium pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol* 2004; 17:385-402.
- 12) Kim E, Lee J, Kwom K, Lee S. Differential role of cyclooxygenase isoforms after kinin acid-induced prostaglandin E₂ production and neurodegeneration in cortical and hippocampal cell cultures. *Brain Res* 2001; 908:1-9.
- 13) Muller N, Schwarz J, Dehning S, Douhe A. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. *Molecular Psychiatry* 2006; 11:680-684.
- 14) Lacosta S, Merali Z, Anisman H. Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. *Brain Research* 1999; 818: 291-303.
- 15) Wichers M, Maes M. The psychoneuro-immuno-pathophysiology of cytokine-induced depression in humans. *Neuropharmacol & Biol Psychiatry* 2005; 5:375-388.
- 16) Schiepers O, Wichers M, Maes M. Cytokines and major depression. *Prog Neuro Psychiatry* 2005; 29:201-217.
- 17) Van Amsterdam J, Opperhuizen A. Nitric oxide and biopetrolin in depression and stress. *Psychiatry Res* 1999; 58:33-38.
- 18) Connor TJ, Leonard BE. Depression, stress and immunological activation: the role of cytokines in depressive disorders. *Life Sci* 1998; 62:583-606.
- 19) Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 1992; 46:755-84.
- 20) Krukoff TL, Khalili P. Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain. *Comp Neurol* 1997; 377:509-590.
- 21) Kumar A, Seghal N, Satyanaryana A, Patipati S. Differential effects of cyclooxygenase inhibitors on intracerebroventricular colchicine-induced dysfunction and oxidative stress in rats. *European Journal of Pharmacology* 2006; 551:58-66.