



Inhibitory and Dose-dependent effect of intracerebroventricular docosahexaenoic acid on clonic seizures induced by pentylenetetrazole in mice

Hakimeh gavzandaroukola^{1,2}, Vahab Babapour¹, Soroush Sardari³, Mohammad Sayyah^{2*}

1. Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

2. Dept. of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3. Drug Design and Bioinformatics Unit, Dept. of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute, Tehran

Received: 21 Nov 2013

Accepted: 9 Jan 2014

Abstract

Introduction: Epilepsy is one of the most common neurologic disorders. Pharmacoresistance and adverse effects of current antiepileptic drugs (AEDs) necessitate development of new drugs and strategies for treatment of epilepsy. Omega 3-Polyunsaturated fatty acids (ω 3-PUFAs) are safe nutritional supplements that recently considered for treatment of epilepsy. Anticonvulsant effect of docosahexaenoic acid (DHA), the most fatty acid in the brain and neural membrane with important role in modulation of neuronal function, is reported by some researchers. In the present study, the anticonvulsant effect of DHA (before conversion to metabolites) was examined in pentylenetetrazole (PTZ) and maximal electroshock (MES) model of seizures.

Methods: Different doses of DHA (0.01, 0.03, 0.075, 0.3, 300 and 1000 μ M) were injected into lateral cerebral ventricles (i.c.v.) of adult male NMRI mice. After 15min, clonic seizures were induced by PTZ (60 mg/kg, i.p.) or tonic seizures were induced by maximal electroshock (MES, 50mA, 50Hz, 0.5sec duration). Sodium valproate and phenytoin were injected i.p. as positive control groups for PTZ and MES tests, respectively. Latency to seizure occurrence, number of protected mice and any abnormal behavior in mice were recorded.

Results: DHA did not show any protective effect in MES model but increased the latency of seizures and inhibited clonic seizures induced by PTZ with ED₅₀ value of 0.1 μ M.

Conclusion: Acceptable anticonvulsant activity, good tolerability and low price could suggest DHA as a good candidate for design and development of new anticonvulsant medications.

Key words: Seizure, Docosahexaenoic Acid, Pentylenetetrazole, Maximal Electroshock

* Corresponding author e-mail: Sayyahm2@pasteur.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

اثر مهاری و وابسته به دوز دوکوزاهگزانوئیک اسید بر تشنجات کلونیک ناشی از پنتیلین تترازول در موش سوری

حکیمه گاوزن درونکلا^{۱،۲}، وهاب باباپور^۱، سروش سرداری^۳، محمد سیاح^{۳*}

۱. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران

۲. بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران

۳. گروه طراحی دارو و بیوانفورماتیک، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران

پذیرش: ۱۹ دی ۹۲

دریافت: ۳۰ آبان ۹۲

چکیده

مقدمه: صرع یکی از شایع‌ترین اختلالات سیستم عصبی- مرکزی است. عوارض نامطلوب داروهای ضدصرع و مقاومت به آن‌ها، کشف داروهای جدید با کمترین سمیت و عدم مقاومت را ضروری می‌سازد. اخیراً اسیدهای چرب غیراشباع امگا-۳ به عنوان مکمل تغذیه‌ای فاقد عوارض جانبی در درمان صرع مورد توجه قرار گرفته‌اند. اثر ضد تشنجی دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA)، به عنوان فراوانترین اسید چرب موجود در مغز و غشای نورونی و دارای نقش مهم در تنظیم عملکرد نورون‌ها، توسط برخی محققین گزارش شده است. در این مطالعه اثر ضد تشنجی DHA به تنهایی و قبل از تبدیل به متابولیت‌های فعال در مدل تشنجی شوک الکتریکی حداکثر (MES) و پنتیلین تترازول (PTZ) بررسی شده است.

روش‌ها: دوزهای مختلفی از DHA (۰.۰۳، ۰.۰۷۵، ۰.۳، ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول) بطور یکطرفه بداخل بطن جانبی مغز گروه‌های ۱۰ تایی از موش‌های سوری نر تزریق شدند. پس از ۱۵ دقیقه تشنج کلونیک با استفاده از PTZ (۶۰ mg/kg, i.p) و تشنج تونیک با استفاده از شوک الکتریکی حداکثر (50 mA, 50Hz, 0.5sec) به حیوانات اعمال گردید. از والپروات سدیم در مدل PTZ و فنی‌توئین در مدل MES به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. فاصله زمانی بین تزریق PTZ تا بروز تشنج، بروز تشنج، و هر گونه اختلال رفتاری در موشها تا بیست دقیقه پس از القای تشنج مشاهده و ثبت گردید.

یافته‌ها: DHA در مدل MES هیچگونه اثر ضد تشنجی نشان نداد اما بطور وابسته به دوز تشنجات ناشی از PTZ را با ED₅₀ معادل 0.1 μM مهار نمود.

نتیجه گیری: DHA با فعالیت ضد تشنجی قابل قبول، قیمت ارزان و عدم سمیت می‌تواند کاندید خوبی در طراحی و توسعه داروهای جدید ضد تشنج باشد اما نیاز است تا کارایی آن در سایر مدل‌های تشنجی نیز بررسی شود.

واژه‌های کلیدی: تشنج، دوکوزاهگزانوئیک اسید، پنتیلین تترازول، شوک الکتریکی حداکثر

مقدمه

بیماران به داروهای ضد صرع رایج مقاوم می‌باشند [۱۷]. بنابراین ساخت داروهای جدید و یا بکارگیری راهکارهای درمانی جدید برای درمان این بیماری ضروری بنظر می‌رسد. اسیدهای چرب غیراشباع امگا-۳ (n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs)) که در منابع دریایی و گیاهان به وفور یافت می‌شوند، می‌توانند بعنوان یک مولکول جدید در درمان بیماران صرعی مطرح شوند. n-3 PUFAs یکی از اجزای اساسی در ساختمان غشاء عصبی

صرع سومین اختلال شایع نورولوژیک بعد از سکته مغزی و آلزایمر است [۲۹] هرچند در سالهای اخیر پیشرفت بسیاری در درمان صرع صورت گرفته است اما همچنان ۳۰٪ از

sayyahm2@pasteur.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

غیر اشباع، سوبسترای پمپ گلیکوپروتئین غشایی Multidrug Resistance protein 1 (MDR1) نیستند. این پمپ در سد خونی مغزی مستقر بوده و با اخراج فعالانه دارو از مغز به داخل خون مانع از رسیدن دارو به غلظت درمانی در سلولهای عصبی شده و مقاومت دارویی به داروهای ضدصرع را موجب می‌شود [۲۷]. علاوه بر این، نه تنها هیچگونه عوارض جانبی از n-3 PUFAs حتی در بالاترین دوز در انسان گزارش نشده است [۲۱]، بلکه بکارگیری آنها بعنوان مکمل تغذیه ای موجب افزایش سلامت جسمانی، بهبود بیماریهایی سیستم عصبی مرکزی و قلبی و جلوگیری از بروز مرگ ناگهانی می‌شود [۱۴]. با توجه به برتری‌های فوق در مقایسه با داروهای رایج ضد صرع، DHA مولکول جالب توجهی می‌باشد که در صورت داشتن فعالیت قابل قبول ضد تشنجی آینده نوید بخشی در مداوای صرع خواهد داشت.

از سوی دیگر DHA تحت تأثیر مسیرهای آنزیمی و غیر آنزیمی به متابولیت‌های مختلفی با اعمال نوروشیمیایی مهم تبدیل می‌شود [۱۸]. مطالعات اخیر اثرات ضد التهاب و نوروپروتکتیو این مشتقات را در اختلالات عصبی گزارش کرده‌اند [۲۱]. NPD1 یکی از متابولیت‌های بسیار مهم DHA می‌باشد که اثر ضدصرعی آن در مدل کیندلینگ الکتریکی نشان داده شده است [۱۵]. در مطالعات انجام شده DHA بعنوان مکمل تغذیه ای برای چند ماه [۲۴، ۳۴] و یا بطور سیستمیک تجویز شده است [۱۵، ۲۳]، در نتیجه اثرات ضد تشنجی آن ممکن است به فعالیت متابولیت‌های آن مرتبط باشد. همچنین در برخی از مطالعات نیز DHA بصورت مخلوط با سایر اسیدهای چرب استفاده شده است [۲۴]. به عبارت دیگر در مورد اثر DHA به تنهایی تعداد مطالعات محدود بوده و اثرات مستقیم DHA در مطالعات انسانی و مدل‌های صرع حیوانی همچنان مورد بحث می‌باشد. به همین دلیل در این مطالعه با تجویز درون مغزی DHA به عنوان یک PUFA شاخص و دارای نقش عملیاتی در فیزیولوژی سیستم اعصاب مرکزی، اثر ضد تشنجی احتمالی آن در دو مدل آزمایشگاهی استاندارد و شاخص صرع بررسی شد. این مدلها شامل شوک الکتریکی حداکثر (MES) Maximal electroshock و پنتیلین تترازول (PTZ) Pentylentetrazole می‌باشند. هر کدام از این مدلها منطبق

هستند و ۳۰٪ از وزن خشک مغز را بخود اختصاص می‌دهند [۲۲]. علاوه بر نقش ساختاری، n-3 PUFAs دارای نقش حیاتی در عملکرد سیستم عصبی مرکزی هستند [۲۲]. آلفا لینولئیک اسید (α -linoleic acid (ALA))، ایکوزاپنتائوئیک اسید (Eicosapentaenoic acid (EPA)) و دوکوزاهگزانوئیک اسید (Docosahexaenoic acid (DHA)) مهم‌ترین n-3 PUFAs می‌باشند. از آنجائیکه EPA و ALA تحت تأثیر اکسیداسیون به اسیدهای چرب دیگری از جمله DHA تبدیل می‌شوند، بنابراین سهم اندکی از n-3 PUFAs را در مغز بخود اختصاص می‌دهند. اما در بین اسیدهای چرب غیراشباع در مغز، DHA از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. DHA بیشترین اسید چرب غیر اشباع در مغز می‌باشد و بیش از نیمی از غشا سلولهای عصبی را تشکیل می‌دهد [۴]. DHA مورد نیاز بدن یا مستقیماً از منابع غذایی تأمین می‌شود و یا در نتیجه اکسیداسیون ALA در کبد سنتز می‌شود [۲۱]. تعامل با کانالهای یونی، تعدیل ویژگی‌های بیوفیزیکی غشاء، تنظیم رهایی و سیگنالینگ نوروترانسمیترها از اعمال مهم DHA در سیستم عصبی می‌باشند [۲۱].

DHA با تثبیت پتانسیل غشاء موجب پایداری غشاء سلول‌های تحریک پذیر می‌گردد. DHA بطور وابسته به دوز موجب مهار قابل ملاحظه جریان الکتریکی کانال سدیمی و کلسیمی وابسته به ولتاژ در سلول‌های عضله قلبی می‌شود [۸، ۳۰]. در برش‌های هیپوکمپ مغز رت نیز می‌تواند از طریق مهار کانالهای سدیمی و کلسیمی موجب افزایش حد آستانه دپولاریزاسیون و کاهش وقوع پتانسیل عمل شود [۲۸، ۳۳]. از آنجائیکه فعالیت کانالهای وابسته به ولتاژ کلسیمی و سدیمی با افزایش تحریک‌پذیری نورون‌ها زمینه را برای وقوع تشنج فراهم می‌کنند، بنابراین DHA نیز ممکن است همانند بسیاری از داروهای ضدصرع با مهار جریان الکتریکی این کانال‌ها عملکرد ضد تشنجی داشته باشد. در همین راستا برخی از مطالعات اثر ضد تشنجی DHA را در مدل‌های حیوانی صرع گزارش کرده‌اند [۱۵، ۲۳، ۲۴]. همچنین نشان داده شده است که بکارگیری DHA بعنوان مکمل در رژیم غذایی بیماران مصروع می‌تواند بروز تشنجات را کاهش دهد [۲۰، ۳۴].

برخلاف داروهای ضدصرع موجود، اسیدهای چرب

حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر و سرعت تزریق یک میکرولیتر در دقیقه بود. دوزهای بکار رفته DHA در مدل PTZ ۰/۱، ۰/۳، ۰/۰۷۵، ۰/۳، ۰/۳ و ۱۰۰۰ میکرومول و در مدل MES ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول بود. والپروات و فنی توئین در آب مقطر حل شده و به روش داخل صفاقی (i.p.) تزریق شدند. والپروات در دوزهای ۷۵، ۹۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۱۷۵ و ۲۲۵ (mg/kg) و فنی توئین در دوزهای ۵، ۷، ۱۰، ۲۰، ۲۵ (mg/kg) تزریق شدند. مطالعه در دو گروه کلی PTZ و MES انجام شد. در گروه اول DHA ۱۵ و والپروات ۳۰ دقیقه قبل از تزریق PTZ (60 mg/kg, i.p.) به حیوانات تزریق شدند. در گروه دوم نیز تزریق DHA ۱۵ دقیقه و فنی توئین یک ساعت قبل از اعمال شوک الکتریکی انجام شد. بروز و عدم بروز تشنج کلونیک (Clonic) در مدل PTZ و تشنج تونیک (Tonic) در مدل MES ثبت شد. همچنین فاصله زمانی بین تزریق PTZ و بروز تشنج کلونیک ثبت می شد. براساس نتایج بدست آمده منحنی های دوز-پاسخ رسم شد و ED₅₀ (دوز موثر در ۵۰٪ از حیوانات) به انضمام 95% confidence interval طبق روش لیچفیلد و ویلکوکسون محاسبه شد [۱۰]. برای مقایسه اثر داروها و DHA بر تشنجات ناشی از پنتیلن تترازول و شوک الکتریکی حداکثر از آزمون دقیق فیشر استفاده شد. جهت بررسی زمان تأخیر تا بروز تشنج از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تکمیلی توکی استفاده شد. در تمام آنالیزها P کمتر از ۰/۰۵ ملاک تفاوت معنی داری آماری در نظر گرفته شد.

یافته ها

در گروه شاهد حیوانات معمولاً تا حداکثر ۴ دقیقه پس از تزریق PTZ تشنج کلونیک فراگیر را نشان می دادند. نتایج نشان داد که DHA همانند والپروات بطور وابسته به دوز تشنجات ناشی از PTZ را مهار می کند (جدول ۱). اما در بالاترین دوز تجویز شده یعنی یک میلی مول، پاسخ ضد تشنجی آن نسبت به دوز کمتر (۳۰۰ میکرومول) کاهش یافت. ED₅₀ مربوط به DHA در مدل PTZ (۰/۰۸-۰/۱۱) ۰/۱ میکرومول بدست آمد. ED₅₀ والپروات در مدل PTZ (۱۳۰/۲-۱۱۳/۹) ۱۲۱/۸ (mg/kg) بدست آمد. DHA

با نوع خاصی از صرع بالینی بوده و ترکیبات دارایی اثر مهارری در این مدلها واجد ویژگی ها و مکانیسم های اختصاصی خود هستند. بنابراین اثر بخشی DHA در هر کدام از این مدلها هم مکانیسم اثر آن را تا حدی مشخص خواهد کرد و هم چشم اندازی از کارایی آن در صرع های بالینی ارائه خواهد نمود.

مواد و روش ها

مطالعه در گروه های ۱۰ تایی از موشهای سوری نر نژاد NMRI محدوده وزنی ۲۰-۳۰ گرم پرورشی انستیتو پاستور ایران انجام شد. موشها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری می شدند. تمامی آزمایشات بر اساس شیوه نامه کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران مبتنی بر استفاده از حداقل تعداد حیوانات و استفاده از روشهای منجر به کمترین میزان زجر، صورت پذیرفت.

در هر آزمایش علاوه بر گروه مورد آزمایش که دوزهای مختلفی از DHA (تهیه شده از کمپانی سیگما) را دریافت می کردند، یک گروه شاهد و یک گروه شاهد مثبت نیز وجود داشت. حیوانات گروه شاهد حلال DHA و حیوانات گروه شاهد مثبت در مدل MES داروی فنی توئین (تهیه شده از شرکت داروسازی لقمان) و در مدل PTZ داروی والپروات (تهیه شده از شرکت داروسازی دکتر عبیدی) دریافت کردند. تزریق DHA در این موشها به طریق داخل مغزی انجام شد. جهت تزریق داخل بطنی ابتدا DHA با هیدروکسی پروپیل بتا سیکلودکسترین (HBP) ۴۰٪ (تهیه شده از کمپانی سیگما) مخلوط می شد تا کمپلکس مناسب تشکیل شود. سپس کمپلکس DHA-HBP در مایع مغزی نخاعی مصنوعی (aCSF) حل شد، بطوریکه غلظت HBP در محلول نهایی به ۱۰٪ می رسید [۱۹]. مواد تشکیل دهنده aCSF به میلی مول عبارت بودند از:

124.0 NaCl, 25 NaHCO₃, 10 D-glucose, 4.4 KCl, 2 MgSO₄, 1.25 KH₂PO₄, 2 CaCl₂ PH نهایی محلول در حد ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم می شد.

DHA به روش Haley and McCormick درون بطن طرفی بطور یکطرفه با کمک سرنگ هامیلتون تزریق شد [۷].

جدول ۱- اثر سدیم والپروات (VPA) و دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) بر تشنجات کلونیک ناشی از پنتیلین تترازول (PTZ) در موش سوری

تیمار	دوز	زمان تاخیر تا بروز تشنج (ثانیه)	درصد موشهای بدون تشنج	تعداد
کنترل	.	۱۴۰/۵۷ ± ۱۱/۵۹	.	۲۰
VPA	۷۵ mg/kg	۴۴۳/۳۴ ± ۲۵/۱۵*	۲۰ ⁺	۳۰
VPA	۱۰۰ mg/kg	۱۸۱/۴۴ ± ۳۷/۸۲	۴۶/۶ ⁺⁺⁺	۳۰
VPA	۱۵۰ mg/kg	۳۸۴ ± ۹۰/۸۸	۶۶/۶ ⁺⁺⁺	۳۰
VPA	۱۷۵ mg/kg	۴۹۷/۳۳ ± ۸۱/۳ **	۷۰ ⁺⁺⁺	۳۰
VPA	۲۲۵ mg/kg	۳۹۰ ± ۱۴۷/۷۱	۸۳/۳ ⁺⁺⁺	۳۰
کنترل	.	۱۵۵/ ۴۳ ± ۹/۸۳	.	۲۰
DHA	(۰/۰۱μM)	۳۰۲/۹۴ ± ۴۳/۲۱**	۱۵/۰ ⁺	۴۰
DHA	(۰/۰۳μM)	۲۹۰/۷۳ ± ۴۴/۸۸**	۲۵/۰ ⁺⁺	۲۸
DHA	(۰/۰۷۵μM)	۲۲۷/۹۱ ± ۴۱/۳۹	۴۶/۶ ⁺⁺⁺	۳۰
DHA	(۰/۰۳μM)	۲۶۳/۵ ± ۵۵/۸۴	۶۰/۰ ⁺⁺⁺	۳۰
DHA	(۳۰۰μM)	۳۳۳/۵ ± ۱۰۹/۳۲	۷۶/۶ ⁺⁺⁺	۳۰
DHA	۱۰۰۰μM	۲۷۱/۰۰ ± ۲۴/۲۰	۵۶/۶ ⁺⁺⁺	۳۰

داده های زمان تاخیر تا بروز تشنج بر اساس Mean ± S.E.M بیان شده است.

*: تفاوت معنی داری با P < ۰/۰۵ و **: P < ۰/۰۱ نسبت به گروه کنترل (حیوانات تیمار نشده) بر اساس آزمون آرایانس یکطرفه و تست تکمیلی توکی.+: تفاوت معنی داری با P < ۰/۰۵، **: P < ۰/۰۱ و ***: P < ۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنترل (حیوانات تیمار نشده) بر اساس آزمون دقیق فیشر.

جدول ۲- اثر فنی توئین سدیم (PHT) و دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) بر تشنجات تونیک ناشی از شوک الکتریکی حداکثر (MES) در موش سوری

تیمار	دوز	درصد	تعداد
کنترل	.	.	۲۰
فنی توئین	۵mg/kg	.	۳۰
فنی توئین	۷mg/kg	۱۰	۳۰
فنی توئین	۱۰mg/kg	۴۰***	۳۰
فنی توئین	۲۰mg/kg	۸۰***	۳۰
فنی توئین	۲۵mg/kg	۱۰۰***	۳۰
DHA	۳۰۰μM	.	۳۰
DHA	۱۰۰۰μM	.	۳۰

*** تفاوت معنی داری با P < ۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنترل (حیوانات تیمار نشده) بر اساس آزمون دقیق فیشر.

(جدول ۱). همچنین توانست زمان بروز تشنج کلونیک را به تأخیر بیندازد

(جدول ۱). در دوزهای بکار رفته قادر به مهار تشنجات تونیک ناشی از MES نبود (در هر دو دوز ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول همه موشها دچار تشنج شدند). در حالی که فنی توئین تشنجات تونیک را بصورت وابسته به دوز مهار نمود و ED₅₀ آن

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که DHA می تواند بطور وابسته به دوز تشنجات کلونیک ناشی از PTZ را مهار کند. طاهها در

همچنین توانست زمان بروز تشنج کلونیک را به تأخیر بیندازد (جدول ۱). در دوزهای بکار رفته قادر به مهار تشنجات تونیک ناشی از MES نبود (در هر دو دوز ۳۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول همه موشها دچار تشنج شدند). در حالی که فنی توئین تشنجات تونیک را بصورت وابسته به دوز مهار نمود و ED₅₀ آن

بخشی خواهد داشت.

PTZ از طریق مهار سیستم گاباژریک و تعدیل گیرنده متابوتروپیک گلوتامات موجب تشنج می‌شود و داروهایی همچون اتوسوکسیماید با انسداد کانال کلسیمی نوع T در تالاموس موجب مهار تشنجات حاصله می‌گردند [۳]. بنابراین اثر ضد تشنجی مشاهده شده از DHA در مدل PTZ ممکن است ناشی از این مکانیسم‌ها باشد. نشان داده شده که DHA قادر به مهار جریان یونی کانال کلسیمی نوع T می‌باشد [۶]. فعالیت و وضعیت این کانال بطور واضحی با پتانسیل عمل نورونی مرتبط می‌باشد [۶]. علاوه بر اثر بر کانال یونی، DHA اثر ضد تشنجی خود را می‌تواند از طریق سیستمهای نوروترانسمیتری نیز اعمال کند. برخی مطالعات قبلی پیشنهاد کرده‌اند که DHA موجب افزایش فعالیت گیرنده $GABA_A$ می‌شود [۵، ۱۶]. همچنین DHA در غلظت‌های پایین می‌تواند جریان یون کلرید را زیاد کند [۵]. از طرف دیگر DHA با اثر بر ناقلین اسیدآمینه‌های تحریکی جذب آسپاراتات را افزایش داده و بنابراین تحریک‌پذیری سیستم عصبی را کاهش می‌دهد [۲]. از سوی دیگر اسیدهای چرب بعنوان مولکولهای دوگانه دوست با تغییر در سیالیت غشا می‌توانند عملکرد پروتئین‌های غشا را دستخوش تغییر قرار دهند [۵، ۹] بطوریکه DHA از این طریق می‌تواند عملکرد گیرنده مهاری $GABA_A$ و کانال یونی سدیم را تنظیم کند [۵، ۹]. بنابراین این اثر نیز می‌تواند یکی از مکانیسم‌های محتمل در اثرات ضد تشنجی DHA در مدل PTZ باشد.

نتایج مطالعه ما نشان داد که اثر ضد تشنجی DHA محدوده ای بصورت وابسته به دوز افزایش می‌یابد و سپس از دوز یک میلی مول به بعد روند کاهشی بخود می‌گیرد. این یافته توسط دیگر محققین نیز گزارش شده است. بطور مثال مشخص شده که DHA در غلظت ۳ میکرومول و بالاتر در ثبت سلولی، مهارکننده غیررقابتی گیرنده $GABA_A$ است [۱۶]. در مطالعه دیگری توسط طاهها و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد که تزریق زیرجلدی DHA در دوز ۴۰۰ mg/kg برخلاف دوزهای پائین‌تر نمی‌تواند بروز تشنجات ناشی از PTZ را به تأخیر بیناندازد [۲۴]. در مطالعه مشابهی در سال ۲۰۱۲، دریافتند که DHA در دوز ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر خلاف دوزهای پایین‌تر فاقد اثر ضد تشنجی می‌باشد [۲۶].

سال ۲۰۱۰ و ترپانیر در ۲۰۱۲ گزارش کردند که دوز ۴۰۰ mg/kg از DHA در تزریق زیرجلدی می‌تواند بطور قابل ملاحظه‌ای طول مدت زمان تأخیری تا شروع تشنجات ناشی از PTZ را افزایش دهد [۲۳، ۲۶]. در مدل کیندلینگ الکتریکی نیز تزریق وریدی DHA طول مدت تخلیه امواج ناشی از تحریک الکتریکی هیپوکمپ را کاهش داده است [۱۵]. همچنین در مطالعه دیگری توسط طاهها در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد که تجویز خوراکی DHA برای مدت حداقل ۳ ماه طول مدت تخلیه های الکتریکی ناشی از تحریک الکتریکی آمیگدال را کاهش می‌دهد [۲۴].

علاوه بر اسیدهای چرب غیر اشباع متابولیت‌های آنها نیز دارای اهمیت قابل توجهی در عملکرد سیستم عصبی مرکزی هستند. این متابولیت‌ها در برخی اختلالات عصبی نظیر آلزایمر و آسیب ناشی از سکته مغزی و التهاب دارای اثرات نوروپروتکتیو می‌باشند [۱]. NPD1 یکی از متابولیت‌های DHA است که اثر ضد تشنجی آن گزارش شده است. تزریق داخل مغزی NPD1 می‌تواند بروز تشنجات عمومی و طول مدت تخلیه امواج ناشی از تحریک الکتریکی آمیگدال را کاهش دهد [۱۵]. از آنجائیکه التهاب نورونی در مغز موجب کاهش آستانه تشنج و عوامل ضد التهاب منجر به افزایش آن می‌شوند، ممکن است اثر ضد تشنجی DHA ناشی از عملکرد ضدالتهابی و نوروپروتکتیو متابولیت‌های آن باشد [۲۳]. مشخص شده که در تجویز سیستمیک و یا طولانی مدت DHA، بخش قابل ملاحظه ای از DHA بوسیله آنزیم‌های کبدی و یا مغزی متابولیزه شده و به متابولیت‌های فعالی نظیر NPD1 تبدیل می‌شود که مسئول اثرات ضد تشنجی مشاهده شده از DHA می‌باشند. با توجه به این که یکی از اهداف این مطالعه بررسی احتمال اثر ضد تشنجی خود مولکول DHA بود این مولکول برای اولین بار به روش داخل مغزی تزریق شد و مدت کوتاهی پس از تجویز (۱۵ دقیقه) اثر ضد تشنجی آن بررسی شد تا قبل از متابولیزه شدن اثرات محافظتی احتمالی آن بررسی شود. نتایج نشان داد که مولکول مادر DHA دارای اثر ضد تشنجی بر علیه تشنجات کلونیک ناشی از PTZ می‌باشد. از آنجایی که تشنجات ناشی از PTZ قابل انطباق با صرع میوکلونیک و نیز صرع غیاب در انسان می‌باشد [۱۳] DHA به احتمال زیاد بر صرع‌های بالینی فوق نیز اثر

آستانه تشنج تونیک (مدل ۶ هرتز) ارزیابی شود. از طرف دیگر مشخص شده که غالباً مولکول‌هایی قادر به مهار قابل ملاحظه تشنجات ناشی از MES می‌باشند که بطور اختصاصی کانال‌های سدیمی حساس به ولتاژ را بلوک می‌کنند [۱۱]. با توجه به طیف وسیع و گاهاً غیر اختصاصی اثرات DHA بی تأثیری آن بر تشنجات در مدل MES ممکن است به این دلیل باشد.

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که DHA بطور وابسته به دوز تشنجات ناشی از PTZ را مهار می‌کند. این یافته نشان می‌دهد که این مکمل تغذیه ای علاوه بر این که می‌تواند به تنهایی بعنوان داروی ضد تشنج مطرح باشد، می‌تواند بصورت ترکیبی با داروهای رایج ضدصرع بکار رفته و موجب تقویت عملکرد آنها و در نتیجه کاهش دوز مصرفی و متعاقباً عوارض جانبی آنها گردد. با توجه به قیمت ارزان و سهولت دسترسی به DHA از یک سو و فقدان عوارض نامطلوب این مکمل تغذیه ای در انسان [۲۱] از سوی دیگر، الگوبرداری از این مولکول جهت طراحی و تولید داروهای ضدصرع جدید پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از رساله دکترای فیزیولوژی دامپزشکی دانشگاه تهران بوده و با بودجه انستیتو پاستور ایران به شماره طرح ۵۹۴ انجام شده است.

این شواهد نشان می‌دهد که بسته به دوز بکار رفته، DHA اثرات متنوعی بر سیستم عصبی دارد.

نقش DHA در تنظیم کانال‌های یونی Ca^{++} ، Na^{+} و K^{+} جهت مهار تحریک‌پذیری ثابت شده است [۲۵، ۳۱]. در مطالعات انجام شده بر روی سلول‌های قلبی و نورون‌های ناحیه CA1 در هیپوکمپ نشان داده شد که PUFAs از طریق افزایش حد آستانه دپولاریزاسیون و طولانی کردن دوره تحریک‌ناپذیری می‌توانند تحریک‌پذیری این سلول‌ها را کاهش دهند [۲۸، ۳۲]. مطالعات دیگری نیز پیشنهاد کرده‌اند که PUFAs بوسیله مهار کانال کلسیمی و سدیمی می‌توانند جریان یونی را تعدیل کنند [۲۸، ۳۲]. با توجه به اثرات شناخته شده فوق از DHA، از آنجائیکه MES بهترین مدل حیوانی صرع جهت بررسی اثر ضد تشنجی مسدودکننده‌های کانال سدیمی وابسته به ولتاژ بوده [۱۱] و معادل حملات فراگیر تونیک-کلونیک در انسان می‌باشد [۱۲] اثر بخشی احتمالی DHA در این مدل تشنجی به بوته آزمایش گذاشته شد. بر خلاف انتظار ما DHA در دوزهای بکار رفته قادر به مهار تشنجات تونیک ناشی از MES نبود. با توجه به این که در مدل MES یک جریان الکتریکی فوق آستانه‌ای جهت القای تشنج تونیک بکار می‌رود ممکن است DHA قادر به مهار تشنجات شدید تونیک نباشد اما بتواند آستانه تشنج تونیک را افزایش دهد. برای یافتن این احتمال لازم است تا فعالیت محافظتی DHA در مدل‌های دیگر همچون مدل حداقل شوک الکتریکی (Minimal electroshock) و یا مدل

Discov 9 (2010) 68-82.

References

- [1] Bazan NG, Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10 (2007) 136-41.
- [2] Berry CB, Hayes D, Murphy A, Wiessner M, Rauen T, McBean GJ, Differential modulation of the glutamate transporters *glt1*, *glast* and *eaac1* by docosahexaenoic acid. *Brain Res* 1037 (2005) 123-33.
- [3] Bialer M, White HS, Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat Rev Drug*

- [4] Chang CY, Ke DS, Chen JY, Essential fatty acids and human brain. *Acta Neurol Taiwan* 18 (2009) 231-41.
- [5] Chisari M, Shu HJ, Taylor A, Steinbach JH, Zorumski CF, Mennerick S, Structurally diverse amphiphiles exhibit biphasic modulation of *gabaa* receptors: Similarities and differences with neurosteroid actions. *Br J Pharmacol* 160 (2010) 130-41.
- [6] Danthi SJ, Enyeart JA, Enyeart JJ, Modulation of native t-type calcium channels by omega-3 fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 327 (2005) 485-93.
- [7] Haley TJ, McCormick WG, Pharmacological effects

- produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Br J Pharmacol Chemother* 12 (1957) 12-5.
- [8] Kang JX, Xiao YF, Leaf A, Free, long-chain, polyunsaturated fatty acids reduce membrane electrical excitability in neonatal rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 3997-4001.
- [9] Leifert WR, McMurchie EJ, Saint DA, Inhibition of cardiac sodium currents in adult rat myocytes by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol* 520 Pt 3 (1999) 671-9.
- [10] Litchfield JT, Jr., Wilcoxon F, A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 96 (1949) 99-113.
- [11] Löscher W, Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 50 (2002) 105-23.
- [12] Löscher W, Schmidt D, Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical consideration. *Epilepsy Res* 2 (1988) 145-81.
- [13] Luszczki JJ, Czuczwar SJ, Isobolographic characterization of interactions between vigabatrin and tiagabine in two experimental models of epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31 (2007) 529-38.
- [14] Mozaffarian D, Geelen A, Brouwer IA, Geleijnse JM, Zock PL, Katan MB, Effect of fish oil on heart rate in humans: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Circulation* 112 (2005) 1945-52.
- [15] Musto AE, Gjørstrup P, Bazan NG, The omega-3 fatty acid-derived neuroprotectin d1 limits hippocampal hyperexcitability and seizure susceptibility in kindling epileptogenesis. *Epilepsia* 52 (2011) 1601-8.
- [16] Nabekura J, Noguchi K, Witt MR, Nielsen M, Akaike N, Functional modulation of human recombinant gamma-aminobutyric acid type a receptor by docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 273 (1998) 11056-61.
- [17] Perucca E, French J, Bialer M, Development of new antiepileptic drugs: Challenges, incentives, and recent advances. *Lancet Neurol* 6 (2007) 793-804.
- [18] Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA, Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in cns: Their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev* 52 (2006) 201-43.
- [19] Pitha J, Gerloczy A, Olivi A, Parenteral hydroxypropyl cyclodextrins: Intravenous and intracerebral administration of lipophiles. *J Pharm Sci* 83 (1994) 833-7.
- [20] Schlanger S, Shinitzky M, Yam D, Diet enriched with omega-3 fatty acids alleviates convulsion symptoms in epilepsy patients. *Epilepsia* 43 (2002) 103-4.
- [21] Taha AY, Burnham WM, Auvin S, Polyunsaturated fatty acids and epilepsy. *Epilepsia* 51 (2010) 1348-58.
- [22] Taha AY, Filo E, Ma DWL, McIntyre Burnham W, Dose-dependent anticonvulsant effects of linoleic and α -linolenic polyunsaturated fatty acids on pentylenetetrazol induced seizures in rats. *Epilepsia* 50 (2009) 72-82.
- [23] Taha AY, Jeffrey MA, Taha NM, Bala S, Burnham W M, Acute administration of docosahexaenoic acid increases resistance to pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *Epilepsy Behav* 17 (2010) 336-43.
- [24] Taha AY, Trepanier M-O, Ciobanu FA, Taha NM, Ahmed M, Zeng Q, Cheuk WI, Ip B, Filo E, Scott BW, Burnham W M, Bazinet R P, A minimum of 3 months of dietary fish oil supplementation is required to raise amygdaloid afterdischarge seizure thresholds in rats - implications for treating complex partial seizures. *Epilepsy Behav* 27 (2013) 49-58.
- [25] Tigerholm J, Borjesson SI, Lundberg L, Elinder F, Fransen E, Dampening of hyperexcitability in cal pyramidal neurons by polyunsaturated fatty acids acting on voltage-gated ion channels. *PLoS One* 7 (2012) e44388.
- [26] Trepanier MO, Taha AY, Mantha RL, Ciobanu FA, Zeng QH, Tchkhartichvili GM, Domenichiello AF, Bazinet RP, Burnham WM, Increases in seizure latencies induced by subcutaneous docosahexaenoic acid are lost at higher doses. *Epilepsy Res* 99 (2012) 225-32.
- [27] Vamecq J, Vallee L, Lesage F, Gressens P, Stables JP, Antiepileptic popular ketogenic diet: Emerging twists in an ancient story. *Prog Neurobiol* 75 (2005) 1-28.
- [28] Vreugdenhil M, Bruehl C, Voskuyl RA, Kang JX, Leaf A, Wadman WJ, Polyunsaturated fatty acids modulate sodium and calcium currents in cal neurons. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A* 93 (1996) 12559-63.
- [29] www.epilepsyfoundation.org/about.
- [30] Xiao YF, Gomez AM, Morgan JP, Lederer WJ, Leaf A, Suppression of voltage-gated l-type ca^{2+} currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 4182-7.
- [31] Xiao YF, Kang JX, Morgan JP, Leaf A, Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on na^{+} channels of neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 11000-4.
- [32] Xiao YF, Sigg DC, Leaf A, The antiarrhythmic effect of n-3 polyunsaturated fatty acids: Modulation of cardiac ion channels as a potential mechanism. *J Membr Biol* 206 (2005) 141-54.
- [33] Young C, Gean PW, Chiou LC, Shen YZ, Docosahexaenoic acid inhibits synaptic transmission and epileptiform activity in the rat hippocampus. *Synapse* 37 (2000) 90-4.
- [34] Yuen AW, Sander J W, Fluegel D, Patsalos PN, Bell G S, Johnson T, Koepp MJ, Omega-3 fatty acid supplementation in patients with chronic epilepsy: A randomized trial. *Epilepsy Behav* 7 (2005) 253-8.