

ارزیابی سطح مالون دی آلدئید و فاکتور تومور نکروزی-آلفا در مغز موش های صحرائی نوزاد تحت درمان با کاربامازپین و ویتامین B-6 در مدل تشنج الکتروشوک حداکثری

رضا زارع دار^۱، مجید حسن پور عزتی^{۲*}

^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

^۲استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۵/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: علیرغم رشد داروهای جدید در ۲۰ سال گذشته، نسبت موفقیت در درمان صرع های مقاوم به دارو تغییری پیدا نکرده است. در این مطالعه، اثر درمان همزمان با ویتامین ب-۶ و کاربامازپین بر مدت پاسخ تونیک، سطح مالون دی آلدئید (MDA) و فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF- α) در مغز موش های نوزاد در مدل الکتروشوک حداکثری (MES) بررسی شد.

مواد و روش‌ها: هفتاد سر موش صحرائی ویستار نوزاد به گروه های زیر تقسیم شدند: کنترل، MES، کاربامازپین (۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، ویتامین ب-۶ (۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، ویتامین ب-۶ (۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) + کاربامازپین (۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، ویتامین ب-۶ (۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) + کاربامازپین (۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم). تمام داروها یک ساعت قبل از اعمال MES به صورت درون صفاقی تزریق شدند. مدت زمان راست شدن پاها (HLE) و سطح MDA و TNF- α در هموژنای مغز موش‌ها اندازه گیری شد.

نتایج: درمان با هر دو دوز ب-۶ از مرگ موش ناشی از الکتروشوک جلوگیری کرد، اما درمان ترکیبی اثر کاهش هم افزایی نداشت. درمان با ویتامین ب-۶ (۳۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) و کاربامازپین (۴۰ میلی گرم/کیلوگرم) به تنهایی مدت زمان راست شدن پاها را کاهش ($p < 0/01$) دادند. ویتامین ب-۶ (۶۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) اثر کاهنده کاربامازپین را در مدت زمان راست شدن پاها در مقایسه با گروه کاربامازپین به تنهایی افزایش داد. تشنج منجر به افزایش سطح MDA و TNF- α در مغز موش ها شد. گرچه تجویز ویتامین ب-۶ سبب کاهش سطح MDA و TNF- α در مغز موش ها شد ولی تجویز توأم آنها اثر هم افزایی بر مهار این فاکتورها نگذاشت.

نتیجه گیری: گرچه سرکوب MDA و TNF- α در مغز در میانجی گری اثرات ضد تشنجی B-6 و کاربامازپین نقش دارند، اما در هم افزایی اثر ضد تشنجی آنها دخالتی ندارند.

واژه‌های کلیدی: فاکتور تومور نکروزی-آلفا، مالون دی آلدئید، تشنج، ویتامین ب-۶، کاربامازپین، موش نوزاد.

*نویسنده مسئول:

استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۰۹۱۲۵۴۴۴۳۹

Hassanpour@shahed.ac.ir

مقدمه

تشنجات نوزادی در سنین ۱ تا ۲۸ روزگی بر اساس وجود حملات تونیک - کلونیک ظریف مشخص می شوند.^۱ تقریباً یک کودک از هر یکصد و پنجاه کودک، در ده سال اول زندگی، مبتلا به صرع تشخیص داده می شود.^۲ بر اساس گزارش دیگری، میزان بروز تشنج نوزادی بین ۱/۵ تا ۵/۵ مورد در هر ۱۰۰۰ تولد تخمین زده شده است و در ۸۰٪ موارد این تشنجات از همان هفته اول تولد شروع می شوند.^۳ لذا پیشگیری و درمان موثر این تشنجات برای حیات نوزادان ضروری است. بروز التهاب عصبی همراه با تغییرات اولیه در سطح فاکتورهای سیتوکینی در خون بعنوان مشخصه صرع نوزادان مطرح شده است.^۴ علاوه بر این، سمیت عصبی ناشی از فعالیت بیش از ناقل های عصبی تحریکی، التهاب عصبی و تولید بیش از حد محصولات پراکسیداسیون چربی ها چون مالون دی آلدئید (MDA) نیز به عنوان دیگر مکانیسم های مولکولی دخیل در صرع عنوان می شوند.^۵ داروهای ضد صرع متنوعی برای کنترل صرع نوزادان مورد استفاده واقع می شوند که از جمله آنها می توان به کاربامازپین اشاره کرد.^۶ کاربامازپین از طریق مهار کانال های سدیمی وابسته به ولتاژ و سرکوب تحریک پذیری بیش از حد نورون های سیستم عصبی مرکزی اثرات ضد صرعی خودش را اعمال می کند.^۷ گرچه، کاربامازپین به تنهایی در دوزهای پایین بعنوان یک داروی کنترل کننده صرع در کودکان مورد استفاده واقع می شود، اما برای دستیابی به اثربخشی موثرتر گاهی از دوزهای بالاتر آن استفاده می شود و این امر منجر به بروز عوارض جانبی در نوزادان می شود.^۸ یک راهکار عملی و زمینه پژوهشی ارزشمند پیشنهادی برای ارتقای اثر داروهای ضد تشنجی در این شرایط، استفاده از مکمل ها به شکل درمان ترکیبی است.^۹ ویتامین ب-۶ از ویتامین های محلول در آب است که برای رشد طبیعی و متابولیسم سلول های بدن و بخصوص سلول های عصبی ضروری است.^{۱۰} گزارشاتی در دست است که تجویز ویتامین ب-۶ نه تنها سبب درمان تشنج های غیرقابل کنترل می شود، بلکه گاهی اوقات می تواند به کاهش شدت تشنجات صرعی بسیار شدید نیز کمک کند.^{۱۱} برای مثال، تجویز همزمان این ویتامین با لوتیراستام در جانبازان مبتلا به صرع از اثرات تشنج زایی لوتیراستام در این

بیماران کاسته است.^{۱۳} ویتامین ب-۶ می تواند از سد خونی-مغزی عبور کرده و دارای توان محافظت عصبی در برابر فرایند آسیب رسان به میتوکندری ها است.^{۱۴} بعلاوه، این ویتامین سبب تقویت اثر دیگر دارو های موثر بر سیستم عصبی مرکزی نیز شده است.^{۱۶} اثرات محافظت کننده عصبی این ویتامین منجر به مهار پاسخ های التهابی، استرس اکسیداتیو و مرگ نورون ها در بیماران مبتلا به بیماری های عصبی، چون پارکینسون و آلزایمر، شده است.^{۱۷} اثربخشی درمانی این ویتامین به تازگی در کنترل فرایندهای التهابی نیز مورد تایید واقع شده است.^{۱۸} تجویز آن به موش ها بدنبال ضربه مغزی به تسریع روند بهبود ساختار عصبی در این حیوانات کمک کرده است.^{۱۹} لذا شاید بتوان از آن به عنوان یک مکمل برای بهبود اثربخشی و کاهش عوارض داروهای ضد صرع بهره جست.

مدل القای تشنج توسط الکتروشوک حداکثری (Maximal electroshock-induced seizure) یا به اختصار MES برای مدل سازی های پیش بالینی صرع نوزادان در پژوهش های پیش بالینی بکار گرفته می شود.^{۲۰} بعلاوه، گزارش شده است که القای تشنج به این روش باعث افزایش سطح عوامل استرس اکسیداتیو و فاکتور تومور نکروزی-آلفا (TNF- α) در مغز می شود.^{۲۱}

در این پژوهش بررسی شد که آیا تجویز ویتامین ب-۶ به تنهایی دارای اثرات درمانی بر صرع تونیک-کلونیک القا شده توسط MES در موش های نوزاد است و آیا این ویتامین می تواند اثر بخشی ضد تشنجی داروی کاربامازپین را ارتقا بخشد. همچنین، میزان تغییرات MDA و TNF- α در بافت مغز موش های نوزاد بدنبال تجویز ویتامین ب-۶ و کاربامازپین به تنهایی و درمان همزمان بترتیب، بعنوان ارزیابی نقش سرکوب فرایند پراکسیداسیون چربی ها و التهاب عصبی در این درمان ترکیبی مورد سنجش قرار گرفت.

مواد و روش ها

موش های صحرائی نوزاد نژاد ویستار با سن دو هفته و محدوده وزن 5 ± 25 گرم، در این مطالعه تجربی مورد استفاده واقع شدند. این حیوانات در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه شاهد و در دمای 2 ± 24 درجه سانتی گراد، رطوبت ۱۵٪ ± 55 و در قفس های با درب آلومینیومی با کف مفروش از خاک

تشنج، موش‌ها بی‌هوش و آسان‌کشی شده و مغز آنها به سرعت از مجسمه خارج شد. مغزها به مدت ۲۰ ثانیه در محلول PBS حاوی ۳۰۰ میکرولیتر DMEM سرد (۴ درجه سانتی‌گراد) بکمک سونیکاتور هموژنیزه شدند.^{۲۸}

سنجش MDA

سنجش MDA در هموژنای مغز با هدف اندازه‌گیری سطح پراکسیداسیون لیپیدها توسط کیت تجاری شرکت کارمانیا طب به روش تیوباریتوریک اسید (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) یا به اختصار (TBARS) انجام شد.

سنجش TNF- α

سنجش TNF- α در هموژنای مغز موش‌ها و به کمک کیت تجاری ساخت شرکت کارمانیا طب انجام شد. میزان جذب نمونه‌ها پس از انجام مراحل آماده‌سازی توسط دستگاه الیزا ریدر و در ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM ارائه شده‌اند. ابتدا توزیع داده‌ها توسط آزمون کولموگراف-اسمیرنوف بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از ANOVA دو طرفه و آزمون بون‌فرنی با نرم‌افزار پریمس نسخه 5 انجام شد. اختلاف با $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بر اساس داده‌های ارائه شده در جدول ۱، تعداد دو سر از موش‌ها در گروه کاربامازپین (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) و تعداد دو سر از موش‌ها در گروه کنترل بدنبال الکتروشوک حداکثری مردند، لذا تفاوت معنی‌داری از نظر آماری بین تلفات موش‌ها در این دو گروه وجود نداشت. به این ترتیب، مشخص شد که تجویز کاربامازپین در دوز (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) هیچ اثر مہاری بر تعداد تلفات موش‌ها بدنبال اعمال تشنج الکتروشوک حداکثری ندارد. تجویز ویتامین ب-۶ در دوزهای ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به تنهایی منجر به صفر شدن تعداد تلفات موش

اره نگهداری شدند. اتاق نگهداری موش‌ها مجهز به سیستم کنترل مدت زمان روشنایی - تاریکی بوده و با دوره ۱۲ ساعت بین ساعت‌های ۷ تا ۱۹، روشنایی را برای محل نگهداری موش‌ها تامین می‌کرد. تمامی دستورالعمل‌های کمیته اخلاق برای کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس مصوبه کمیته اخلاق دانشگاه شاهد رعایت شد. پروپوزال این پژوهش دارای کد اخلاق به شماره IR.SHAHED.REC.1400.007 می‌باشد. داروی کاربامازپین و ویتامین ب-۶ به ترتیب از شرکت‌های تماد دارو و کاسپین تامین بصورت هدیه دریافت شدند. محلول‌های حاوی کاربامازپین با دوز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و ویتامین ب-۶ با دوزهای ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در حلال فسفات بافر سالین (PBS) تهیه شدند.^{۲۴-۲۶} این داروها در همان روز تجویز تهیه شده و به صورت درون صفاقی (intrapreoneal) یا به اختصار (i.p.) یک ساعت قبل از اعمال تشنج به موش‌ها تجویز شدند.

گروه‌های مورد مطالعه در این آزمایش به این شرح می‌باشند: گروه اول (کنترل) محلول نرمال سالین را بدون اعمال شوک دریافت کردند، گروه دوم (الکتروشوک) محلول نرمال سالین را یک ساعت قبل از اعمال الکتروشوک به صورت داخل صفاقی دریافت کردند، گروه سوم (درمان با کاربامازپین) کاربامازپین را با دوز ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم i.p. یک ساعت قبل از اعمال الکتروشوک دریافت کردند، گروه‌های چهارم و پنجم (درمان با ویتامین ب-۶) ویتامین ب-۶ را یکساعت قبل از اعمال الکتروشوک دوز 300 یا 600 میلی‌گرم/کیلوگرم i.p. از دریافت کردند، گروه‌های ششم و هفتم (درمان با کاربامازپین همراه با ویتامین ب-۶) کاربامازپین (40 میلی‌گرم/کیلوگرم) + ویتامین ب-۶ (300 میلی‌گرم/کیلوگرم) یا کاربامازپین (40 میلی‌گرم/کیلوگرم) + (۶۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) را یکساعت قبل از اعمال الکتروشوک i.p. دریافت کردند. مدت زمان راست شدن پاها (Hind Leg Extension) یا به اختصار (HLE) بدنبال اعمال الکتروشوک برای هر موش اندازه‌گیری شد. افزایش این مدت زمان نشان‌دهنده افزایش شدت تشنجات و کاهش آن نشان‌دهنده موفقیت درمان بود.^{۲۷} تحریک الکتریکی توسط یک ژنراتور ساخت شرکت برج صنعت با فرکانس ۵۰ هرتز بمدت ۰/۱ ثانیه از طریق گیره‌های متصل به گوش و خیس شده با نرمال سالین به موش‌ها اعمال شد. بیست و چهار ساعت بعد از القای

دریافت کننده ویتامین ب-۶ همراه با کاربامازپین با گروه درمان شده با کاربامازپین به تنهایی تفاوت معنی داری نداشت و به این ترتیب، مکمل ب-۶ نتوانست از مرگ موش ها بدنال درمان با کاربامازپین و دریافت الکتروشوک حداکثری پیش گیری کند.

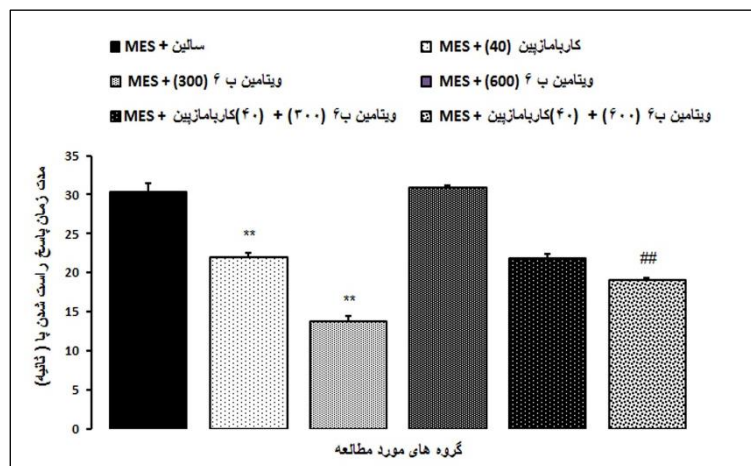
های دریافت کننده الکتروشوک شد. بدین ترتیب، تجویز ویتامین ب-۶ در هر دو دوز بکار گرفته شده توانست در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی دار از مرگ موش ها بر اثر تشنج الکتروشوک حداکثری جلوگیری کند. اما تعداد تلفات موش های

جدول ۱: تعداد موش ها مرده از هر گروه در طول دوره آزمایش

ردیف	گروه ها (۱۰ سر موش ها در هر گروه)	دوز تجویزی (میلی گرم/کیلوگرم)	تعداد کل تلفات در هر گروه
۱	کنترل	0	0
۲	کنترل + الکتروشوک	0	2
۳	ویتامین ب-۶ + الکتروشوک	300	0
۴	ویتامین ب-۶ + الکتروشوک	600	0
۵	کاربامازپین + الکتروشوک	40	2
۶	ویتامین ب-۶ + کاربامازپین + الکتروشوک	300+40	3
۷	ویتامین ب-۶ + کاربامازپین + الکتروشوک	600+40	2

اگرچه، تجویز دوز ۶۰۰ میلی گرم/کیلوگرم از ویتامین ب-۶ به تنهایی بر مدت زمان HLE تاثیر معنی داری نداشت، ولی تجویز این دوز همراه با کاربامازپین (۴۰ میلی گرم/کیلوگرم) توانست اثر کاربامازپین بر کاهش مدت زمان راست شدن پاهای موش ها را به طور معنی دار ($p < 0/01$) در مقایسه با گروه دریافت کننده کاربامازپین به تنهایی افزایش دهد.

اثر درمان با ویتامین ب-۶ به تنهایی و همراه با کاربامازپین بر مدت زمان راست شدن پای عقبی موش ها دریافت کننده الکتروشوک حداکثری در نمودار ۱ نشان داده شده است. تجویز داخل صفاقی ویتامین ب-۶ فقط در دوز ۳۰۰ میلی گرم/کیلوگرم توانست به طور معنی دار ($p < 0/01$) مدت زمان HLE موش ها را در مقایسه با موش های کنترل دریافت کننده الکتروشوک حداکثری کاهش دهد.

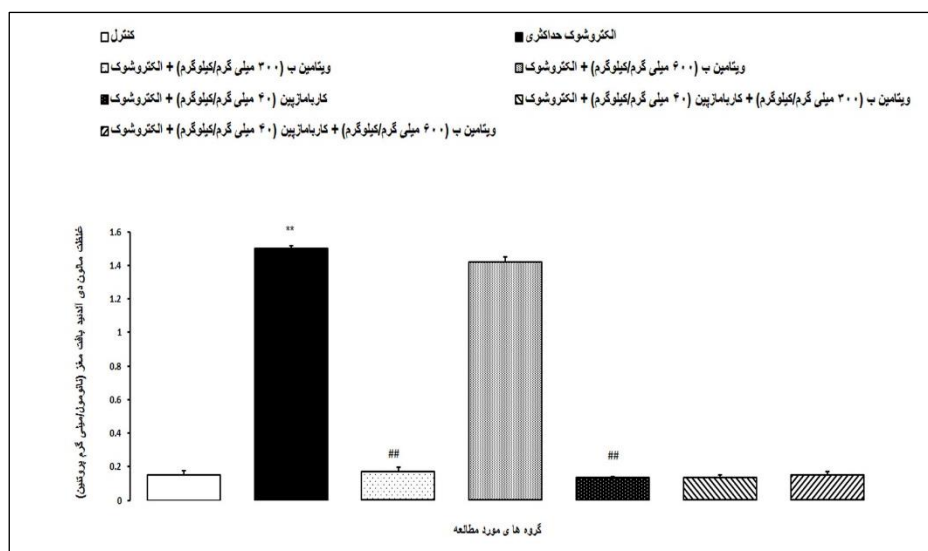


نمودار ۱- بررسی اثر درمانی ویتامین ب ۶ (۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) به تنهایی و همراه با کاربامازپین (۴۰ میلی گرم/کیلوگرم) بر مدت زمان راست شدن پاهای عقبی موش ها. تعداد موش های در هر گروه ۱۰ سر و داده ها توسط نرم افزار پریم ۵ و بکمک ANOVA و آزمون متعاقب مورد تجزیه و تحلیل

واقع شده اند. سطح معنی داری با $p < 0.01$ * در مقایسه با گروه کنترل بعلاوه الکتروشوک حداکثری؛ $p < 0.01$ ## در مقایسه با گروه دریافت کننده کاربامازپین و الکتروشوک حداکثری.

کاربامازپین (۴۰ میلی گرم/ کیلوگرم) نیز توانست بطور معنی دار (p < 0.01) از افزایش غلظت MDA مغز در موش ها در مقایسه با گروه کنترل بعلاوه الکتروشوک جلوگیری کند. اما تجویز ویتامین ب-۶ در هر دو دوز نتوانست اثر بخشی کاربامازپین بر کاهش غلظت MDA مغز موش های القا شده توسط الکتروشوک حداکثری را در مقایسه با گروه دریافت کننده کاربامازپین به تنهایی تقویت کند.

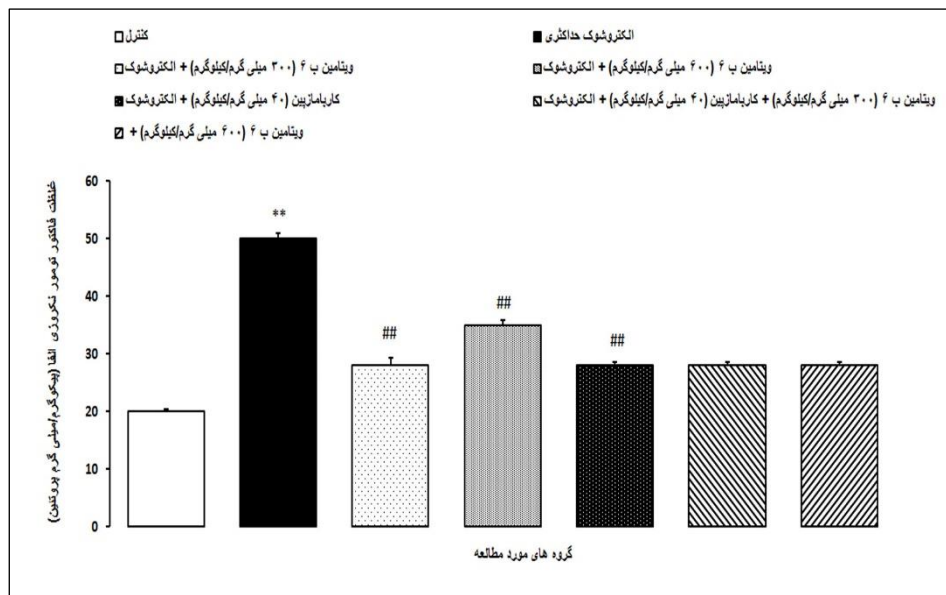
نتایج ارزیابی تغییر در غلظت MDA مغز در بین گروه ها مختلف در نمودار ۲ نشان داده شده است. این داده نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار غلظت MDA مغز در بین گروه های مختلف مورد درمان است (p < 0.01). اعمال الکتروشوک حداکثری سبب افزایش (p < 0.01) غلظت MDA در مغز موش ها شد. تجویز ویتامین ب-۶ به تنهایی فقط در دوز ۳۰۰ میکروگرم/ کیلوگرم نتوانست از افزایش غلظت MDA مغز بدنبال اعمال الکتروشوک حداکثری به طور معنی دار (p < 0.01) جلوگیری کند. تجویز



نمودار ۲- اثر درمان با ویتامین ب-۶ (۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم/ کیلوگرم) به تنهایی یا همراه با کاربامازپین (۴۰ میلی گرم/ کیلوگرم) بر غلظت مالون دی آلدئید (نانومول/ میلی گرم پروتئین) مغز موش ها بدنبال اعمال الکتروشوک حداکثری. تعداد موش های در هر گروه ۱۰ سر و داده ها توسط نرم افزار پریم ۵ و بکمک ANOVA و آزمون متعاقب مورد تجزیه و تحلیل واقع شده اند. سطح معنی داری $p < 0.01$ * در مقایسه با گروه کنترل و $p < 0.01$ ## در مقایسه با گروه دریافت کننده حلال و الکتروشوک حداکثری.

ب-۶ (۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم/ کیلوگرم) و کاربامازپین (۴۰ میلی گرم/ کیلوگرم) به تنهایی قبل از اعمال الکتروشوک نتوانست از افزایش سطح این فاکتور در مغز موش ها ناشی از الکتروشوک حداکثری کاست. اما تجویز هر دو دوز از ویتامین ب-۶ همراه با کاربامازپین نتوانست سبب تقویت اثر مهار کاربامازپین بر کاهش این فاکتور در مغز موش های بطور معنی دار شود.

نتایج ارزیابی تغییرات غلظت TNF- α مغز در بین گروه ها درمانی مختلف در نمودار ۳ نشان داده شده است. داده ها نشان دهنده تفاوت معنی دار غلظت این فاکتور در مغز موش ها بین گروه های مختلف مورد مطالعه است (p < 0.01). اعمال الکتروشوک حداکثری سبب افزایش معنی دار (p < 0.01) غلظت TNF- α در مغز موش ها در مقایسه با گروه کنترل شد. تجویز داخل صفاقی ویتامین



نمودار ۳- اثر درمان با ویتامین ب-۶ (۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم/گیلوگرم) و کاربامازپین به تنهایی یا توأم بر غلظت فاکتور تومور نکروزی-آلفا (پیکوگرم/میلی گرم پروتئین) در مغز موش ها بدنبال اعمال الکتروشوک حداکثری. تعداد موش های در هر گروه ۱۰ سر و داده ها توسط نرم افزار پرسم ۵ و بکمک ANOVA و آزمون متعاقب مورد تجزیه و تحلیل واقع شده اند. تفاوت معنی دار $p < 0.01$ * در مقایسه با گروه کنترل دریافت کننده حلال و $p < 0.01$ ### در مقایسه با گروه الکتروشوک حداکثری نشان داده شده است.

بحث

اگرچه پژوهشگران پیشتر به ارتباط فرایندهای التهاب عصبی همراه با افزایش TNF- α و افزایش MDA با تکامل صرع های تونیک و کلونیک اشاره کرده اند^{۲۹،۳۰} اما نقش کنترل این مکانیسم ها در میانجی گری اثرات داروهای ضد صرعی و برهمکنش آنها با دیگر ترکیبات موثر بر صرع مورد ارزیابی واقع نشده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که القای تشنج توسط الکتروشوک حداکثری سبب افزایش سطح MDA و TNF-a در مغز موش ها شده و کاربامازپین می تواند از چنین وضعیتی در این مدل پیشگیری کند. به تازگی اثر کاربامازپین در پیشگیری از تولید MDA در مغز بیماران مبتلا به صرع اشاره شده است.^{۳۱} همچنین یافته های ما نشان داد که MES می تواند سبب تحریک تولید TNF-a در بافت مغزی موش ها شده و کاربامازپین از این پدیده پیشگیری می کند. در تایید مشاهدات این پژوهش، اثرات ضد التهابی کاربامازپین در موش های صحرائی گزارش شده است.^{۲۹،۳۲} در نهایت، در سال ۲۰۱۹ دانشمندی بنام احمداح و همکارانش در مقاله ای خود به

اثرات ضد التهاب عصبی ویتامین های خانواده ب و بخصوص ب-۶ اشاره کرده اند.^{۳۳}

لازم به ذکر است که یک نکته مهم در انتخاب ویتامین ب-۶ بعنوان مکمل درمان ترکیبی با کاربامازپین برای موش های نوزاد این بود که هیچ افزایش معنی داری در تعداد موش های مرده به عنوان برهمکنش سمی درمان با این مکمل و کاربامازپین در موش ها بدنبال اعمال تشنج مشاهده نشد. درمان ترکیبی ۶۰۰ میلی گرم/کیلوگرم ویتامین ب-۶ با کاربامازپین اثر مهار کاربامازپین بر تشنجات تونیک-کلونیک را به طور معنی داری تقویت کرد. در ادامه، نتایج این پژوهش نشان داد که گرچه درمان با ویتامین ب-۶ و کاربامازپین به تنهایی به طور معنی داری سبب جلوگیری از افزایش MDA و TNF- α تحت اثر الکتروشوک می شود، ولی تجویز توأم آنها هم افزایی بر سرکوب این فاکتورها در مغز موش ها ندارد. به این ترتیب، نتایج این پژوهش نشان می دهند که درمان با ویتامین ب-۶ همراه با کاربامازپین می تواند سبب سرکوب موفق تر تشنج های تونیک-کلونیک و عوارض استرس اکسیداتیو و

تونیک - کلونیک در موش های نوزاد منجر می شود، گرچه، هر کدام از این دو دارو سبب کاهش سطح MDA و TNF- α در مغز می شوند، ولی تجویز توام آنها منجر به هم افزایی در سرکوب این میانجی ها نشده و کشف این مکانیسم نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در آزمایشگاه مرکزی تحقیقاتی دانشگاه شاهد انجام شد و بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شاهد و مسئول محترم این آزمایشگاه قدردانی می گردد. این پژوهش حاصل پایان نامه آقای رضا زارع دار بوده و دارای کد اخلاق به شماره IR.SHAHED.REC.1400.007 می باشد.

التهابی تشنج بر مغز شود، ولی مکانیسم هم افزایی ضد تشنجی این دو دارو مستقل از سرکوب MDA و TNF- α در مغز در مدل صرع تونیک-کلونیک است. در جستجو برای یافتن مکانیسم احتمالی این برهمکنش، گزارش شده است که ویتامین ب-۶ یک کوفاکتور ضروری گلوتامات دکربوکسیلاز است و در انتقال عامل کربوکسیل از ناقل عصبی تحریکی گلوتامات به ناقل عصبی مهارتی گابا نقش دارد. درعین حال کاربامازپین نیز سبب تقویت عملکرد سیستم گابا آرژیک می شود.^{۳۴} لذا، اثر هم افزایی تجویز ویتامین ب-۶ همراه با کاربامازپین بر این مدل صرع را می توان به مکانیسم های وابسته به ناقل عصبی گابا آرژیک نسبت داد.

نتیجه گیری کلی

بعنوان یک جمع بندی از پژوهش حاضر می توان مدعی شد که تجویز ویتامین ب-۶ با کاربامازپین به سرکوب موثرتر تشنجات

References

- Nabavi SS, Partovi P. Brain Ultrasonography Findings in Neonatal Seizure; a Cross-sectional Study. *Emerg (Tehran)*. 2017;5(1):e41.
- Aaberg K. M, Gunnes N, Bakken I. J, Lund Søråas C, Berntsen A, Magnus P, et al. Incidence and Prevalence of Childhood Epilepsy: A Nationwide Cohort Study. *Pediatrics* 2017; 139(5): e20163908. doi:10.1542/peds.2016-3908
- Plouin P, Kaminska A. Neonatal seizures. *Handb Clin Neurol*. 2013;111:467-76. doi: 10.1016/B978-0-444-52891-9.00051-8.
- Numis AL, Foster-Barber A, Deng X, Rogers EE, Barkovich AJ, Ferriero DM, Glass HC. Early changes in pro-inflammatory cytokine levels in neonates with encephalopathy are associated with remote epilepsy. *Pediatr Res*. 2019;86(5):616-621. doi: 10.1038/s41390-019-0473-x.
- Ambrogini P, Torquato P, Bartolini D, Albertini MC, Lattanzi D, Di Palma M, Marinelli R, Betti M, Minelli A, Cuppini R, Galli F. Excitotoxicity, neuroinflammation and oxidant stress as molecular bases of epileptogenesis and epilepsy-derived neurodegeneration: The role of vitamin E. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(6):1098-1112. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.01.026.
- Silenieks LB, Carroll NK, Van Niekerk A, Van Niekerk E, Taylor C, Upton N, Higgins GA. Evaluation of Selective 5-HT2C Agonists in Acute Seizure Models. *ACS Chem Neurosci* 2019; 10(7): 3284- 3295. doi:10.1021/acscchemneuro.8b00739
- Sills GJ, Rogawski MA. Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. *Neuropharmacology*. 2020; 168: 107966. doi: 10. 1016/ j.neuropharm. 2020. 107966.
- Sands TT, Balestri M, Bellini G, Mulkey SB, Danhaive O, Bakken EH, Tagliatalata M, Oldham MS, Vigevano F, Holmes GL, Cilio MR. Rapid and safe response to low-dose carbamazepine in neonatal epilepsy. *Epilepsia*. 2016; 57(12):2019-2030. doi: 10.1111/epi.13596.
- Sobaniec W, Solowiej E, Kulak W, Bockowski L, Smigielska-Kuzia J, Artemowicz B. Evaluation of the influence of antiepileptic therapy on antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in erythrocytes of children with epilepsy. *Child Neurol* 2006; 21: 558-62. doi: 10.1177/08830738060210070501.
- Tunali S. The effects of vitamin B6 on lens antioxidant system in valproic acid-administered rats. *Hum Exp Toxicol*. 2014;33(6):623-8. doi: 10.1177/0960327113506233.
- Reid ES, Williams H, Stabej Ple Q, James C, Ocaka L, Bacchelli C, Footitt EJ, Boyd S, Cleary MA, Mills PB, Clayton PT. Seizures Due to a KCNQ2 Mutation: Treatment with Vitamin B6. *JIMD Rep*. 2016; 27:79-84. doi: 10.1007/8904_2015_460.
- Ohtahara S, Yamatogi Y, Ohtsuka Y. Vitamin B(6) treatment of intractable seizures. *Brain Dev*. 2011; 33(9):783-9. doi: 10.1016/j.braindev.2011.01.010.
- Dreischmeier E, Zuloaga A, Kotloski RJ, Karasov AO, Gidal BE. Levetiracetam-associated irritability and potential role of vitamin B6 use in veterans with epilepsy. *Epilepsy Behav Rep*. 2021; 16:100452. doi: 10.1016/j.ebr.2021.100452.
- Yarlagadda A, Clayton AH. Blood brain barrier: the role of pyridoxine. *Psychiatry (Edgmont)* 2007; 4(8): 58- 60.
- Nan Y, Lin J, Cui Y, Yao J, Yang Y, Li Q. Protective role of vitamin B6 against mitochondria damage in Drosophila models of SCA3. *Neurochem Int*. 2021;144:104979. doi: 10.1016/j.neuint.2021.104979.
- Wang ZB, Gan Q, Rupert RL, Zeng YM, Song XJ. Thiamine, pyridoxine, cyanocobalamin and their combination inhibit thermal, but not mechanical hyperalgesia in rats with primary sensory neuron injury. *Pain* 2005; 114(1-2): 266-77. doi: 10.1016/j.pain.2004.12.027.
- Tardy AL, Pouteau E, Marquez D, Yilmaz C, Scholey A. Vitamins and Minerals for Energy, Fatigue and Cognition: A Narrative Review of the Biochemical and Clinical Evidence. *Nutrients*. 2020;12(1):228. doi: 10.3390/nu12010228.
- Du X, Yang Y, Zhan X, Huang Y, Fu Y, Zhang Z, Liu H, Zhang L, Li Y, Wen Q, Zhou X, Zuo D, Zhou C, Li L, Hu S, Ma L. Vitamin B6 prevents excessive inflammation by reducing accumulation of sphingosine-1-phosphate in a sphingosine-1-phosphate lyase-dependent manner. *J Cell Mol Med*. 2020;24(22):13129-13138. doi: 10.1111/jcmm.15917.
- Kuypers NJ, Hoane MR. Pyridoxine administration improves behavioral and anatomical outcome after unilateral contusion injury in the rat. *J Neurotrauma* 2010; 27(7):1275-82. doi: 10.1089/neu.2010.1327.
- Xiang C, Li ZN, Huang TZ, Li JH, Yang L, Wei JK. Threshold for maximal electroshock seizures (MEST) at three developmental stages in young mice. *Zool Res* 2019; 40(3): 231-235. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2019.038.
- Huizenga MN, Sepulveda-Rodriguez A, Forcelli PA. Preclinical safety and efficacy of cannabidivarin for early life seizures. *Neuropharmacology* 2019; 148: 189-198. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.01.002.
- Devi PU, Manocha A, Vohora D. Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: an insight for researchers. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9(18): 3169-3177. doi:10.1517/14656560802568230.
- Pottoo FH, Salahuddin M, Khan FA, Al Dhamen MA, Alsaeed WJ, Gomaa MS, Vatte C, Alomary MN.

- Combinatorial regimen of carbamazepine and imipramine exhibits synergism against grandmal epilepsy in rats: inhibition of pro-inflammatory cytokines and pi3k/akt/mTOR signaling pathway. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(11):1204. doi: 10.3390/ph14111204.
24. Twele F, Töllner K, Bankstahl M, Löscher W. The effects of carbamazepine in the intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy depend on seizure definition and mouse strain. *Epilepsia Open* 2016; 1(1-2): 45-60. doi: 10.1002/epi4.2.
 25. Reeta KH, Mehla J, Pahuja M, Gupta YK. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of valproate, phenytoin, phenobarbitone and carbamazepine with curcumin in experimental models of epilepsy in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 99(3): 399-407. doi: 10.1016/j.pbb.2011.05.011.
 26. Abdou HM, Wahby MM. Neuroprotection of Grape Seed Extract and Pyridoxine against Triton-Induced Neurotoxicity. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 8679506. doi:10.1155/2016/8679506.
 27. Sardari S, Amiri M, Rahimi H, Kamalinejad M, Narenjkar J, Sayyah M. Anticonvulsant effect of Cicer arietinum seed in animal models of epilepsy: introduction of an active molecule with novel chemical structure. *Iran Biomed J*. 2015; 19(1): 45-50. doi: 10.6091/ibj.1391.2014.
 28. Golden N, Darmadipura S, Bagiada N A. The difference in seizure incidences between young and adult rats related to lipid peroxidation after intracortical injection of ferric chloride. *Singapore Med J*. 2010; 51(2): 105.
 29. Gómez CD, Buijs RM, Sitges M. The anti-seizure drugs vinpocetine and carbamazepine, but not valproic acid, reduce inflammatory IL-1 β and TNF- α expression in rat hippocampus. *J Neurochem*. 2014;130(6):770-9. doi: 10.1111/jnc.12784.
 30. Dönmezdil N, Çevik MU, Özdemir HH, Taşın M. Investigation of PON1 activity and MDA levels in patients with epilepsy not receiving antiepileptic treatment. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2016;12:1013-7. doi: 10.2147/NDT.S103336.
 31. Shehta, N., Kamel, A.E., Sobhy, E. et al. Malondialdehyde and superoxide dismutase levels in patients with epilepsy: a case-control study. *Egypt J Neurol Psychiatry Neurosurg*. 2022; 58:51. doi:10.1186/s41983-022-00479-5
 32. Bianchi M, Rossoni G, Sacerdote P, Panerai AE, Berti F. Carbamazepine exerts anti-inflammatory effects in the rat. *Eur J Pharmacol*. 1995;294(1):71-4. doi: 10.1016/0014-2999(95)00516-1.
 33. Ehmedah A, Nedeljkovic P, Dacic S, Repac J, DraskovicPavlovic B, Vucevic D, et al. Vitamin B Complex Treatment Attenuates Local Inflammation after Peripheral Nerve Injury. *Molecules* 2019; 24(24): 4615. doi: 10.3390/molecules24244615.
 34. Czapiński P, Blaszczyk B, Czuczwar SJ. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Curr Top Med Chem*. 2005;5(1):3-14. doi: 10.2174/1568026053386962.

Reza Zaredar¹, Majid Hassanpourezzi^{2*}

¹ Master of Sciences, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.

² Associate professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.

Evaluation of malondialdehyde and Tumor Necrosis Factor-alpha level in the brain of carbamazepine and vitamin B-6 combined treatment groups in the infant rat model of maximum electroshock seizure

Received: 14 Aug 2022 ; Accepted: 5 Dec 2022

Abstract

Introduction: Despite the development of new drugs over the past 20 years, the proportion of drug-resistant epilepsy has not changed. In this study, the effect of vitamin B6 and carbamazepine cotreatment was investigated on the duration of the tonic response, the malondialdehyde (MDA) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) levels in the brain of neonate rats in the maximal electroshock (MES) model.

Methods: Seventy neonatal Wistar rats were divided into seven groups: (1) control, (2) saline and MES, (3) carbamazepine (40 mg/kg), (4 and 5) vitamin B-6 (300 and 600 mg/kg), and (6 and 7) vitamin B-6 + carbamazepine (300 + 40 mg/kg) and (600 + 40 mg/kg). All drugs were injected intraperitoneally 1 hour before applying MES. The duration of hind leg extension (HLE), and the level MDA and TNF- α in brain homogenate of rats were measured.

Results: The treatments did not affect the number of deaths of rats. Administration of carbamazepine (40mg/kg, i.p.) and vitamin B6 (300 mg/kg, i.p.) significantly ($p < 0.01$) reduced the HLE duration. Vitamin B-6 (600 mg/kg) only enhanced the reducing effect of carbamazepine on the duration of HLE compared to the carbamazepine alone group. Treatment with vitamin B-6 and carbamazepine alone reduced the level of MDA and TNF- α in the brain of convulsive rats, but their combined administration did not have a synergistic effect on the suppression of these factors.

Conclusion: The mechanism underlying the enhancement of the anticonvulsant response of carbamazepine administration with vitamin B-6 is independent of the modulation of MDA and TNF-a in the brain.

Keywords: Seizures, Vitamin B6, infant, carbamazepine, Tumor Necrosis Factor-alpha, malondialdehyde.

***Corresponding Author:**
Associate professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.

09125464439
Hassanpour@shahed.ac.ir