اثرات تزریق داخل بطن مغزی کتورولاک و متیل پردنیزولون بر فعالیت آنتی اکسیدانی در بافت مغز موش‌های صحرایی صرعی‌شده

زهره فضل الهی [۱]، **جهانگیر کبوتری** *[۲]، مرتضی زنده‌دل [۳]، نگار پناهی [۴]

۱-دانشجوی دکترای تخصصی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. نویسنده مسئول kaboutari-j@sku.ac.ir

۳- استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۴- استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: صرع یک اختلال مغزی بسیار شایع است و استرس اکسیداتیو به عنوان یکی از مهمترین مکانیسم‌های درگیر در بروز صرع در نظر گرفته می‌شود. داروهای کنونی به جای درمان بیماری صرع، صرفاً علائم تشنج را کنترل می‌کنند و در ۳۰ درصد بیماران فاقد اثر هستند. از این رو، شناسایی داروهای مؤثرتر برای درمان صرع از اهمیت بالایی برخوردار است. مطالعه حاضر نیز در این راستا و با هدف بررسی اثرات تجویز درون بطن مغزی (ICV) کتورولاک و متیل پردنیزولون بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت مغز موش‌های صحرایی صرعی‌شده، اجرا شده است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر تعداد ۴۸ سر موش صحرایی ماده به منظور انجام دو آزمایش در ۸ گروه آزمایشی به صورت تصادفی تقسیم شدند. در آزمایش اول، نرمال سالین و کتورولاک در دوزهای ۷.۵، ۱۵ و ۳۰ میکروگرم و در آزمایش دوم، نرمال سالین و متیل پردنیزولون در دوزهای ۰.۱۵، ۰.۳ و ۰.۶ میکروگرم به ترتیب به صورت ICV تزریق شدند و صرع حاد نیز با تجویز درون صفاقی پنتیلن تترازول در موش‌ها القا گشت. با فاصله نیم ساعت پس از انجام تزریقات، موش‌ها یوتانایز شده و پس از جداسازی مغز شاخص‌های استرس اکسیداتیو، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام، سطح مالون دی آلدئید و نیتریک اکساید در بافت هموژنه هیپوکمپ اندازگیری شد.

نتایج: براساس یافته‌های بدست آمده، تزریق کتورولاک و متیل پردنیزولون به صورت وابسته به دوز سبب افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی اکسیدانی تام گروه‌های درمانی در مقایسه با گروه کنترل شد ($P<0.05$). همچنین، تجویز دوزهای مختلف هر دو دارو، سطح مالون دی آلدئید و نیتریک اکساید را در قیاس با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش داد ($P<0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که احتمالاً کتورولاک و متیل پردنیزولون دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی بوده و می‌توانند به‌عنوان گزینه‌های درمانی بالقوه برای بیماری صرع و سایر بیماری‌های مرتبط با بروز استرس اکسداتیو مورد بررسی بیشتر قرار گیرند.

کلمات کلیدی: استرس اکسیداتیو، صرع، کتورولاک، متیل پردنیزولون، موش صحرایی

مقدمه

صرع نوعی اختلال عصبی مزمن است که با بروز تشنج‌های مکرر مشخص می‌گردد. مطالعات انجام شده با هدف بررسی پاتوفیزیولوژی این بیماری نشان داده‌اند که تشنج‌های طولانی مدت می‌توانند منجر به اختلال عملکرد میتوکندری و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شوند (۱). در ادامه این مسیر مطالعاتی، مشخص شده است که این تغییرات به شدت بر تحریک‌پذیری عصبی و انتقال سیناپسی تأثیر می‌گذارند و به نوبه خود می‌توانند زمینه‌ساز بروز تشنج گردند. از سوی دیگر شواهد به دست آمده حاکی از آن بوده است که نورون‌ها به دلیل محتوای لیپیدی بالای غلاف‌های میلین، بیش از سایر سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد آسیب‌پذیر هستند (۲). بر اساس آمار ارائه شده، سالانه ۱۲۵۰۰۰ مورد جدید ابتلا به صرع در سرتاسر جهان تشخیص داده می‌شود، در حالیکه تنها ۷۰ درصد از بیماران به طور مؤثر با داروهای ضد صرع موجود درمان می‌شوند و در حقیقت، این داروها در کنترل علائم گروهی از بیماران، ناتوان هستند (۳).

با توجه به خلاء ذکر شده، ضرورت شناسایی داروهای قوی‌تر و با طیف اثرگذاری بیشتر، ایده اصلی تحقیقات متعددی را شکل داده است. یکی از مهمترین گام‌ها در انجام مطالعات مربوط به صرع، ایجاد مدل حیوانی آزمایشگاهی مناسب است. در این راستا، کیندلینگ شیمیایی با پنتیلن تترازول (PTZ) به طور گسترده‌ای برای بررسی فرآیند صرع و پیامدهای تشنج‌های تکراری بر حافظه، شناخت و استرس اکسیداتیو و همچنین تعیین اثربخشی درمان‌های بالقوه بر تغییرات شناختی و رفتاری مرتبط با صرع مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). از سوی دیگر، یکی از بهترین روش‌ها برای مشخص نمودن وقوع استرس اکسیداتیو، ارزیابی نشانگرهای زیستی مربوط به آن می‌باشد که حاصل واکنش رادیکال‌های آزاد و ROSها با مولکول‌های زیستی هستند و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TCA)، سطح نیتریک اکساید و مالون دی آلدئید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها، جزو مهمترین این نشانگرها محسوب می‌شوند (۵).

در سال‌های اخیر، کاوش در مداخلات دارویی مؤثر بر التهابات و اختلالات عصبی، به ویژه با تمرکز بر داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی (NSAIDs) و کورتیکواستروئیدها، توجه بسیاری از محققان را به خود معطوف نموده است. به عنوان مثال، یک بررسی سیستماتیک نشان داد که التهاب می‌تواند نقش مهمی در پاتوژنز صرع داشته باشد و کاهش التهاب عصبی ممکن است به کاهش بروز تشنج کمک کند. در حالی که مطالعات مستقیم روی NSAIDها به طور خاص با هدف بررسی اثرات درمانی آن‌ها بر صرع محدود هستند، اثرات ضد التهابی عمومی این داروها ممکن است با کاهش فرآیندهای التهابی که تحریک پذیری عصبی را تشدید می کنند، به کنترل تشنج کمک کنند (۶). یکی از مهمترین داروهای این دسته، کتورولاک است که به عنوان یک NSAID قوی، در درجه اول با خواص ضد دردی آن شناخته می‌شود و اغلب برای مدیریت کوتاه مدت درد متوسط تا شدید مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷). این دارو اثرات خود را با مهار آنزیم‌های سیکلواکسیژناز (COX) اعمال می‌کند که این آنزیم‌ها نقش مهمی در سنتز پروستاگلاندین‌ها دارند (۸).

همچنین برخی از مطالعات نشان می‌دهند که کورتیکواستروئیدها می‌توانند با افزایش بیان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به کاهش استرس اکسیداتیو کمک کنند. در یک مطالعه، درمان کورتیکواستروئیدی منجر به تأثیر مثبت در ۵۰٪ از بیماران مبتلا به صرع مقاوم به دارو (DRE) شد (۹). بعلاوه، نشان داده شده است که کورتیکواستروئیدها بار فعالیت میان دوره‌های صرع را در کودکان مبتلا به صرع ژنتیکی مقاوم به دارو کاهش می دهند، که نشان دهنده نقش بالقوه آنها در مدیریت موارد مقاوم به درمان است (۱۰). متیل پردنیزولون نیز به عنوان یک گلوکوکورتیکوئید مصنوعی، از طریق مکانیسم‌های متعدد، از جمله سرکوب سیتوکین‌های پیش التهابی و تعدیل پاسخ‌های ایمنی، اثرات ضد التهابی خود را اعمال می‌کند (۱۱). این دارو برای مدیریت شرایط بالینی که با التهاب بیش از حد مشخص می‌شوند، مانند اختلالات خود ایمنی و آسیب‌های مغزی تروماتیک، به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲, ۱۳).

با توجه به نقش احتمالی کتورولاک و متیل پردنیزولون در فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و با نظر به این امر که تاکنون تحقیق مستقلی به بررسی این اثرات نپرداخته است، مطالعه حاضر با محوریت ارزیابی اثرات تزریق داخل بطنی مغزی (ICV) کتورولاک و متیل پردنیزولون بر فعالیت آنتی اکسیدانی در بافت مغز موش صحرایی صرعی‌شده طراحی و اجرا شده است. یافته‌های حاصل از این مطالعه پیامدهای عمیقی در زمینه اقدامات بالینی مرتبط با محافظت عصبی به همراه دارد و می‌تواند نقش مهمی در تحقیقات دارویی مرتبط با صرع ایفا کند. در حقیقت، یافته‌های حاصل از این مطالعه نه تنها درک ما را در زمینه مکانیسم‌ها و اثرات مختلف این داروها افزایش می‌دهد، بلکه راه را برای توسعه درمان‌های مؤثرتر برای صرع و مدیریت سایر شرایط پیچیده عصبی مرتبط با استرس اکسیداتیو هموار می‌کند.

مواد و روش‌ها

شرایط نگهداری حیوانات و طراحی آزمایش

به منظور انجام مطالعه حاضر، تعداد ۴۸ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار (۲۴۰-۲۰۰ گرم) تهیه شد. موش‌های صحرایی با رعایت اصول راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (موسسه ملی سلامت ایالات متحده‌ی آمریکا) و همچنین مطابق با قوانین مصوب توسط کمیته اخلاق حیوانات آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، در شرایط کنترل شده و دقیق از جمله تهویه مناسب، دوره‌های روشنایی و تاریکی متناوب (هر ۱۲ ساعت)، درجه حرارت ۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبی نسبی ۶۰-۵۰ درصد و اقدامات بهداشتی لازم قرار گرفتند و دسترسی آزاد به آب و غذا (پلت) برای آن‌ها فراهم شد. در پایان دوره یک هفته‌ای آشنایی با محیط آزمایشگاه، موش‌ها برای انجام دو آزمایش که هر آزمایش از ۴ گروه آزمونی تشکیل شده بود (n= ۶)، به شکل تصادفی تقسیم گردیدند. به منظور انجام تزریق ICV، عمل جراحی استریوتاکسی با اعمال بیهوشی مطابق با اطلس واتسون و پاکسینوس (با مختصات قدامی- خلفی: ۴.۳ میلی‌متر، جانبی: ۴.۲ میلی‌متر و شکمی: ۴.۴-۴.۲ میلی‌متر) انجام و کانول راهنما در بطن جانبی راست قرار داده شد (۱۴). در آزمایش نخست، به ترتیب محلول نرمال سالین در گروه کنترل و کتورولاک با دوزهای ۷.۵، ۱۵ و ۳۰ میکروگرم در گروه های یک تا سه تزریق گشت. در آزمایش دوم نیز موش‌های گروه کنترل محلول نرمال سالین و موش‌های گروه‌های یک تا سه به ترتیب متیل پردنیزولون با دوزهای ۰.۱۵، ۰.۳و ۰.۶ میکروگرم را دریافت نمودند. تعیین دوز داروهای تجویزی بر اساس مطالعات پیشین صورت گرفت (۱۵). با فاصله ۳۰ دقیقه از تزریق اول، با تجویز داخل صفاقی (IP) PTZ با دوز ۸۰ میکروگرم بر کیلوگرم تشنج القا شد (جدول-۱) (۱۶). ضمناً در پایان مراحل، ماده‌ی رنگی بلودومتیلن (یک میکرولیتر) به منظور بررسی صحت کانول‌گذاری تزریق شد. پس از سپری شدن ۳۰ دقیقه، حیوانات با استفاده از کلروفرم کشته شدند و پس از جداسازی بلوک هیپوکامپ ۱۰۰ میلی‌گرم از این بافت به ۸۹۰ ماکرولیتر بافر تریس با PH ۷.۴ اضافه و سپس با دستگاه هموژنایزر (رسش، آلمان) به مدت یک دقیقه هموژن شد. سپس محلول مورد نظر به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه) قرارگرفت و مایع رویی جهت انجام مراحل بعدی استخراج گردید. در نهایت، لاشه حیوانات نیز با رعایت بهداشتی حمل و در کوره سوزانده شد.

جدول ۱- پروتکل درمانی مطالعه حاضر

گروه‌های آزمایشی		تزریق اول(ICV)	تزریق دوم*(IP)
آزمایش اول	کنترل	نرمال سالین	پنتیلن تترازول (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)
	۱	کتورولاک (۷.۵ میکروگرم)	پنتیلن تترازول (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)
	۲	کتورولاک (۱۵ میکروگرم)	پنتیلن تترازول (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)
	۳	کتورولاک (۳۰ میکروگرم)	پنتیلن تترازول (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)
آزمایش دوم	کنترل	نرمال سالین	پنتیلن تترازول (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)
	۱	متیل پردنیزولون (۰.۱۵ میکروگرم)	پنتیلن تترازول (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)
	۲	متیل پردنیزولون (۰.۳ میکروگرم)	پنتیلن تترازول (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)
	۳	متیل پردنیزولون (۰.۶ میکروگرم)	پنتیلن تترازول (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)

تزریق دوم ۳۰ دقیقه پس از تزریق اول انجام شد. (تعداد موش‌ها در هر گروه=۶)

سنجش نشانگرهای زیستی استرس اکسیداتیو

از روش رنگ‌سنجی FRAP برای سنجش TCA استفاده شد. اساس این روش، ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی بافت مورد نظر با بررسی توانایی آن در احیای Fe_{3+} به Fe^{2+} است که با استفاده از کیت رانسود (راندوکس، انگلستان) و دستگاه اسپکتوفوتومتری در طول موج ۵۹۳ نانومتر محاسبه گشت (۱۷, ۱۸). اندازگیری سطح مالون دی آلدئید نیز بر اساس واکنش مالون دی آلدئید با تیوباربیتوریک اسید (TBA)، استخراج با بوتانول نرمال و ارزیابی ضریب جذب کمپلکس مالون دی آلدهید- TBA در طول موج ۵۳۲ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتوفوتومتری صورت گرفت (۱۹). برای تعیین سطح نیتریک اکساید در هیپوکمپ، سطح نیتریت به عنوان محصول پایدار آن، در گروه‌های مختلف حیوانات، با استفاده از رنگ‌سنجی گریس و دستورالعمل کیت مخصوص (سیگما، آمریکا) انجام شد. در این واکنش تشکیل رنگ برمبنای دی ازوتاسیون یک سولفانامید توسط نیتریت در محیط اسیدی و سپس کنژوگه شدن آن با یک آمین آروماتیک صورت می‌گیرد (۲۰).

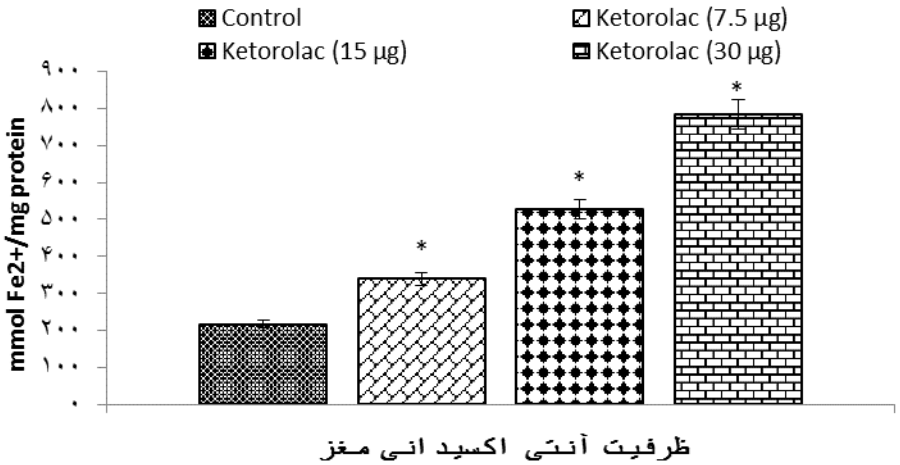
تحلیل آماری

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری PRISM استفاده شد. همچنین آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) برای مقایسه متغیرها، آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت، نتایج به صورت Mean±SEM نشان داده شدند و تفاوت بین گروه‌ها در سطح $P<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

ظرفیت آنتی اکسیدانی بافت مغز متعاقب تزریق ICV کتورولاک

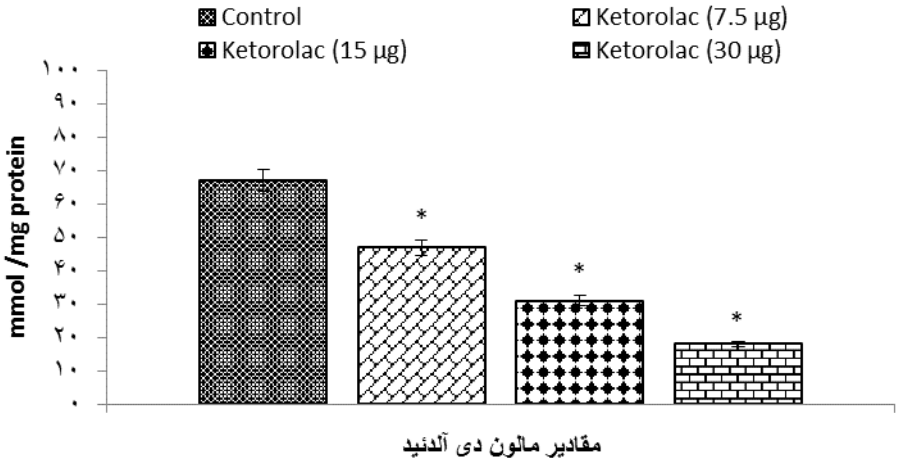
مطابق با نتایج قابل مشاهده در نمودار ۱، تزریق ICV کتورولاک (۷.۵، ۱۵ و ۳۰ میکروگرم) به صورت وابسته به دوز ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت مغز را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش داده است ($P<0.05$).



نمودار۱- مقایسه‌ی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت مغز در گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده کتورولاک (۷.۵، ۱۵ و ۳۰ میکروگرم).
* نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل در سطح $P<0.05$ است.

سطح مالون دی آلدئید بافت مغز متعاقب تزریق ICV کتورولاک

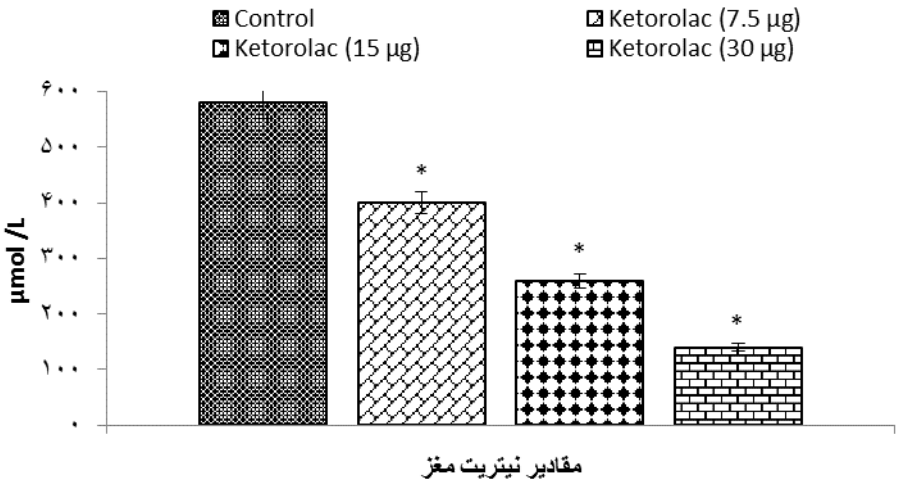
بر اساس نتایج ارائه شده در نمودار ۲، تزریق ICV کتورولاک (۷.۵، ۱۵ و ۳۰ میکروگرم) به صورت وابسته به دوز سطح مالون دی آلدئید بافت مغز را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش داده است ($P<0.05$).



نمودار۲- مقایسه‌ی سطح مالون دی آلدئید بافت مغز در گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده کتورولاک (۷.۵، ۱۵ و ۳۰ میکروگرم).
* نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل در سطح $P<0.05$ است.

سطح نیتریک اکساید بافت مغز متعاقب تزریق ICV کتورولاک

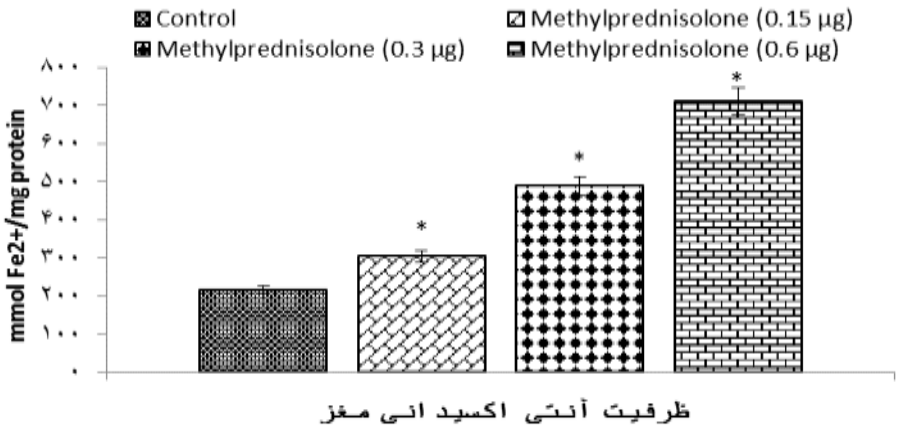
همانطور که در نمودار-۳ نمایش داده شده است، تزریق ICV کتورولاک (۷.۵، ۱۵ و ۳۰ میکروگرم) به صورت وابسته به دوز سطح نیتریت (محصول پایدار نیتریک اکساید) بافت مغز را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش داده است($P<0.05$).



نمودار۳- مقایسه‌ی سطح نیتریت بافت مغز در گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده کتورولاک (۷.۵، ۱۵ و ۳۰ میکروگرم).
* نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل در سطح $P<0.05$ است.

ظرفیت آنتی اکسیدانی بافت مغز متعاقب تزریق ICV متیل پردنیزولون

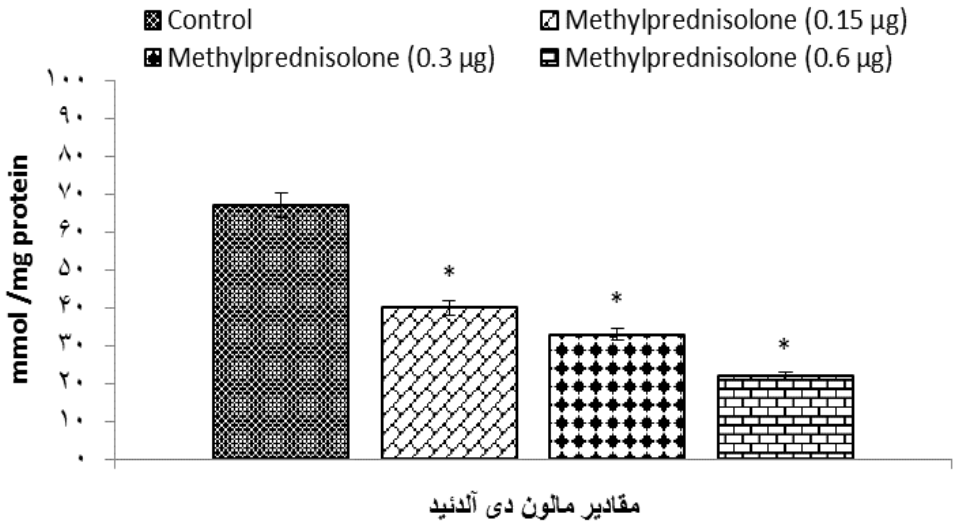
مطابق با نتایج قابل مشاهده در نمودار ۴، تزریق ICV متیل پردنیزولون (۰.۱۵، ۰.۳ و ۰.۶ میکروگرم) به صورت وابسته به دوز ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مغز را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش داده است ($P<0.05$).



نمودار۴- مقایسه‌ی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت مغز در گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده متیل پردنیزولون (۰.۱۵، ۰.۳ و ۰.۶ میکروگرم). * نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل در سطح $P<0.05$ است.

سطح مالون دی آلدئید بافت مغز متعاقب تزریق ICV متیل پردنیزولون

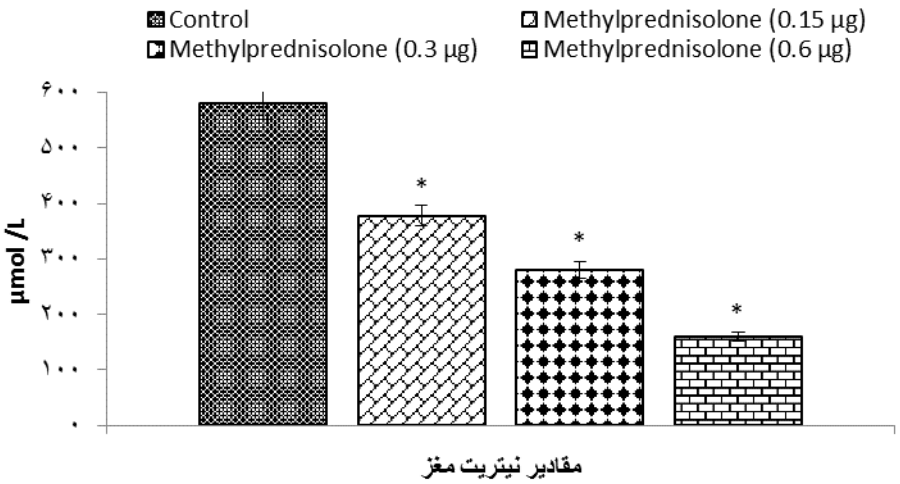
بر اساس نتایج ارائه شده در نمودار ۵، تزریق ICV متیل پردنیزولون (۰.۱۵، ۰.۳ و ۰.۶ میکروگرم) به صورت وابسته به دوز سطح مالون دی آلدئید بافت مغز را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش داده است ($P<0.05$).



نمودار۵- مقایسه‌ی سطح مالون دی آلدئید بافت مغز در گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده متیل پردنیزولون (۰.۱۵، ۰.۳ و ۰.۶ میکروگرم) * نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل در سطح $P<0.05$ است.

سطح نیتریک اکساید بافت مغز متعاقب تزریق ICV متیل پردنیزولون

همانطور که در نمودار-۶ نمایش داده شده است، تزریق ICV متیل پردنیزولون (۰.۱۵، ۰.۳ و ۰.۶ میکروگرم) به صورت وابسته به دوز سطح سطح نیتریت (محصول پایدار نیتریک اکساید) را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش داده است ($P<0.05$).



نمودار۶- مقایسه‌ی سطح نیتریت بافت مغز در گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده متیل پردنیزولون (۰.۱۵، ۰.۳ و ۰.۶ میکروگرم). * نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل در سطح $P<0.05$ است.

بحث

بیماری صرع اغلب با افزایش استرس اکسیداتیو همراه است که می‌تواند به نوبه خود منجر به آسیب عصبی و تشدید بروز تشنج‌های مکرر گردد (۲۱). متأسفانه تا به امروز درمانی قطعی برای این بیماری شناسایی نشده و غالب داروهای موجود صرفاً علائم تشنج را کنترل می‌کنند. علاوه بر این، این داروها در قریب به ۳۰ درصد از بیماران مبتلا به صرع اثرات بهبودبخشی به همراه ندارند (۳). از این رو، مطالعه و شناسایی ترکیبات دارویی مؤثر بر درمان صرع، برای پیشبرد درک ما از این اختلال پیچیده عصبی و بهبود مراقبت از بیماران از اهمیت وافری برخوردار است. با انجام تحقیقات متعدد بر روی عوامل درمانی شیمیایی و طبیعی، می‌توانیم ضمن ارتقای اثربخشی داروها، عوارض جانبی را کاهش داده و در نهایت کیفیت زندگی افراد مبتلا به صرع را بهبود بخشیم. در این راستا، در مطالعه حاضر برای نخستین بار به بررسی اثرات تزریق ICV کتورولاک به‌عنوان یک NSAID قوی و متیل پردنیزولون به‌عنوان یک گلوکوکورتیکوئید بر فعالیت آنتی اکسیدانی در بافت مغز موش‌های صحرایی صرعی‌شده پرداختیم.

در جریان بروز استرس اکسیداتیو، برخی شاخص‌های بیوشیمیایی نظیر TCA کاهش و در مقابل سطح برخی ترکیبات همچون مالون دی آلدئید و نیتریک اکساید در بافت هیپوکمپ افزایش می‌یابد (۲۲). در حقیقت، TAC معیاری برای نمایش توانایی تجمعی تمامی آنتی اکسیدان‌های موجود در یک نمونه بیولوژیکی (مانند خون یا بافت) برای خنثی کردن ROSها و منعکس کننده تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی اکسیدان‌ها است (۲۳). مالون دی آلدئید نیز محصول جانبی پراکسیداسیون لیپیدی است و به عنوان یکی از نشانگرهای تشخیص استرس اکسیداتیو مورد سنجش قرار می‌گیرد. سطوح بالای مالون دی آلدئید در مغز نشان دهنده آسیب اکسیداتیو قابل توجهی است که می‌تواند عملکرد نورون‌ها را مختل نموده و به پاتوفیزیولوژی صرع کمک کند (۲۴). در مقابل، نیتریک اکساید نقشی دوگانه در سیستم عصبی ایفا می‌کند. از یک سو، نیتریک اکساید به عنوان یکی از انتقال دهنده‌های عصبی مهم عمل می‌کند و از سوی دیگر، تولید بیش از حد آن با سمیت عصبی و التهاب مرتبط است (۲۵). بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، تزریق ICV کتورولاک با دوزهای ۷.۵، ۱۵ و ۳۰ میکروگرم و همچنین متیل پردنیزولون با دوزهای ۰.۱۵، ۰.۳ و ۰.۶ میکروگرم توانست به طور معنی‌داری در قیاس با گروه کنترل، TCA را افزایش و سطح مالون دی الدئید و نیتریک اکساید را در بافت مغز موش‌های صحرایی صرعی شده با PTZ کاهش دهد ($P<0.05$).

در واقع، این یافته‌ها از نقش عوامل ضد التهابی در کاهش آسیب اکسیداتیو در اختلالات عصبی مختلف حمایت می‌کند. همانطور که پیش‌تر ذکر شد، کتورولاک یک NSAID است که در درجه اول آنزیم های سیکلواکسیژناز (COX) را مهار می‌کند و متعاقباً منجر به کاهش سنتز پروستاگلاندین‌های دخیل در التهاب می‌شود (۲۶). با کاهش التهاب، کتورولاک می‌تواند به طور غیرمستقیم سطح استرس اکسیداتیو را نیز کاهش دهد. ثابت شده است که تشنج باعث آزادسازی آراشیدونات و متعاقب آن تشکیل پروستاگلاندین در نواحی مغزی می‌شود که عمدتاً در فرآیند صرع نقش دارند (۲۷). مهار تشکیل پروستاگلاندین‌های مغزی توسط NSAIDها حساسیت حیوانات به تشنج‌های تجربی را کاهش می‌دهد. علاوه بر این، یافته‌های جدید مشخص نمودند که راپامایسین، نورواستروئیدها، اصلاح‌کننده‌های اپی‌ژنتیک و مهارکننده‌های مسیرهای COX-2، TRK و JAK-STAT در کاهش بروز صرع نقش دارند (۲۸). به نظر می‌رسد کتورولاک نیز با مهار انزیم COX-2، که در پاسخ‌های التهابی نقش دارد، سبب افزایش TCA در بافت مغزی موش‌های صحرایی شده است (۲۹). علاوه بر این، توانایی کتورولاک در تعدیل مسیرهای التهابی می‌تواند به تثبیت غشای عصبی و کاهش سمیت تحریکی مرتبط با تشنج کمک کند (۳۰). این عملکرد دوگانه - ضد التهابی و آنتی اکسیدانی - کتورولاک را به یک کاندید امیدوارکننده برای درمان کمکی در مدیریت صرع مبدل می‌کند.

متیل پردنیزولون نیز یک گلوکوکورتیکوئید مصنوعی است که با تعدیل بیان ژن‌های مربوط به التهاب و پاسخ‌های ایمنی، اثرات ضد التهابی قوی اعمال می‌دارد (۳۱). مشخص شده است که متیل پردنیزولون سطح سیتوکین‌های پیش التهابی را کاهش داده و عملکرد آنتی اکسیدانی سلول‌ها را تقویت می‌کند (۳۲, ۳۳). کاهش سطح مالون دی الدئید متعاقب درمان با متیل پردنیزولون نشان دهنده اثربخشی آن در مبارزه مستقیم با استرس اکسیداتیو است. ممکن است استفاده ترکیبی از کتورولاک و متیل پردنیزولون اثرات هم افزایی در پی داشته باشد و در حالیکه کتورولاک التهاب را از طریق مهار COX برطرف می‌کند، متیل پردنیزولون انعطاف پذیری عصبی را در برابر آسیب اکسیداتیو از طریق اقدامات ژنومی خود افزایش دهد.

در نهایت، یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهند که هم کتورولاک و هم متیل پردنیزولون می‌توانند به عنوان درمان‌های کمکی مؤثر در مدیریت صرع عمل کنند. توانایی آنها در افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و در عین حال کاهش نشانگرهای استرس اکسیداتیو، مسیرهای جدیدی را برای استراتژی های درمانی نه تنها به منظور کنترل تشنج، بلکه با هدف محافظت در برابر آسیب‌های عصبی باز می‌کند. در بالین، استفاده ترکیبی از این داروها ممکن است به ویژه برای بیمارانی که درگیر تشنج‌های مقاوم به درمان هستند یا افرادی که از عوارض جانبی داروهای ضد صرع موجود رنج می‌برند، مفید باشد. لازم به ذکر است که تعیین زمان و دوز مصرفی این داروها برای به حداکثر رساندن اثرات درمانی آنها در عین به حداقل رساندن واکنش‌های نامطلوب بالقوه بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

در حالی که این مطالعه نتایج امیدوارکننده‌ای را ارائه می‌دهد، ضروری است که خطرات بالقوه مرتبط با استفاده طولانی مدت از NSAIDها مانند عوارض گوارشی، نارسایی کلیوی و خطرات قلبی- عروقی را نیز مد نظر قرار دهیم (۳۴). از این رو، انجام تحقیقات آتی به ویژه با تمرکز بر نمونه‌های انسانی برای مشخص نمودن دوز بهینه و اثرات طولانی مدت این داروها بر کنترل تشنج و سلامت کلی عصبی ضرورت می‌یابد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه کنونی، متعاقب تزریق دو داروی ضدالتهابی، کتورولاک به‌عنوان یک NSAID قوی و متیل پردنیزولون به‌عنوان یک گلوکوکورتیکوئید، TCA در بافت مغز موش‌های صحرایی صرعی‌شده افزایش و سطح مالون دی آلدئید و نیتریک اکساید کاهش یافت که این مشاهدات نشان از اثرات آنتی‌اکسیدانی این داروها داشت. اگرچه با توجه به محدودیت تحقیقات انجام شده پیرامون خواص آنتی اکسیدانی این دو داروی ضدالتهابی، اظهار نظر قطعی در خصوص نقش درمانی آن‌ها

امکان‌پذیر نمی‌باشد؛ اما انجام مطالعات آتی به خصوص بر روی مدل‌های انسانی و ارزیابی اثرات تجویز مستقل و توأمان کتورولاک و متیل پردنیزولون می‌تواند نویدبخش شناسایی درمانی مؤثر برای صرع و سایر اختلالات مرتبط با استرس اکسیداتیو باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان، از همکاری آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در به انجام رساندن این پژوهش تشکر و قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله تعارضی در منافع ندارند.

منابع

1. Kovac S, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. The role of reactive oxygen species in epilepsy. React Oxyg Species. 2016;1(10.20455).
2. Adibhatla RM, Hatcher JF. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxidants & redox signaling. 2010;12(1):125-69.
3. Meinardi H, Scott R, Reis R, On Behalf Of The Ilae Commission on the Developing World JS. The treatment gap in epilepsy: the current situation and ways forward. Epilepsia. 2001;42(1):136-49.
4. Kazmi Z, Zeeshan S, Khan A, Malik S, Shehzad A, Seo EK, 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.
5. Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways. Experimental gerontology. 2010;45(3):217-34.
6. Somani N, Breur H. The efficacy of corticosteroids, NSAIDs, and colchicine in the treatment of pediatric postoperative pericardial effusion. Pediatric Cardiology. 2022;43(2):279-89.
7. Buckley MM-T, Brogden RN. Ketorolac: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. Drugs. 1990;39:86-109.
8. Lashbrook JM, Ossipov MH, Hunter JC, Raffa RB, Tallarida RJ, Porreca F. Synergistic antiallodynic effects of spinal morphine with ketorolac and selective COX1-and COX2-inhibitors in nerve-injured rats☆. Pain. 1999;82(1):65-72.
9. Schiller K, Thomas J, Avigdor T, Mansilla D, Kortas A, Unterholzner G, et al. Pulsatile corticoid therapy reduces interictal epileptic activity burden in children with genetic drug-resistant epilepsy. Epilepsia Open. 2024.
10. Becker L-L, Kaindl AM. Corticosteroids in childhood epilepsies: A systematic review. Frontiers in Neurology. 2023;14:1142253.
11. Kim K, Brar P, Jakubowski J, Kaltman S, Lopez E. The use of corticosteroids and nonsteroidal antiinflammatory medication for the management of pain and inflammation after third molar surgery: a review of the literature. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology. 2009;107(5):630-40.
12. Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. Journal of neurosurgery. 1992;76(1):13-22.
13. Ocejo A, Correa R. Methylprednisolone. StatPearls. 2024.
14. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates in stereotaxic coordinates: Elsevier; 2007.
15. Fazlelahi Z, Kaboutari J, Zendehdel M, Panahi N. Effects of Intracerebroventricular Injection of the Steroidal and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on the Seizures during the Estrous Cycle in Rat. Archives of Razi Institute. 2023;78(3):807.

16. Kaboutari J, Zendehdel M, Habibian S, Azimi M, Shaker M, Karimi B. The antiepileptic effect of sodium valproate during different phases of the estrous cycle in PTZ-induced seizures in rats. Journal of physiology and biochemistry. 2012;68:155-61.
17. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry. 1996;239(1):70-6.
18. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical science (London, England: 1979). 1993;84(4):407-12.
19. Schmedes A, Hølmer G. A new thiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation. Journal of the American Oil Chemists' Society. 1989;66(6):813-7.
20. Yucel AA, Gulen S, Dincer S, Yucel AE, Yetkin GI. Comparison of two different applications of the Griess method for nitric oxide measurement. J Exp Integr Med. 2012;2(1):167.
21. Moshé SL, Perucca E, Ryvlin P, Tomson T. Epilepsy: new advances. The Lancet. 2015;385(9971):884-98.
22. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. Oxidative medicine and cellular longevity. 2017;2017(1):6501046.
23. Kusano C, Ferrari B. Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. J Cell Mol Biol. 2008;7(1):1-15.
24. Singh Z, Karthigesu IP, Singh P, Rupinder K. Use of malondialdehyde as a biomarker for assessing oxidative stress in different disease pathologies: a review. Iranian Journal of Public Health. 2014;43(Supple 3):7-16.
25. Malinski T. Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's disease. 2007;11(2):207-18.
26. Schoenberger SD, Kim SJ, Sheng J, Calcutt MW. Reduction of vitreous prostaglandin E2 levels after topical administration of ketorolac 0.45%. Jama Ophthalmology. 2014;132(2):150-4.
27. Yoshino T, Noguchi M, Okutsu H, Kimoto A, Sasamata M, Miyata K. Celecoxib does not induce convulsions nor does it affect GABAA receptor binding activity in the presence of new quinolones in mice. European journal of pharmacology. 2005;507(1-3):69-76.
28. Clossen BL, Reddy DS. Novel therapeutic approaches for disease-modification of epileptogenesis for curing epilepsy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2017;1863(6):1519-38.
29. Stichtenoth DO, Frölich JC. The second generation of COX-2 inhibitors: what advantages do the newest offer? Drugs. 2003;63:33-45.
30. Bagriyanik HA, Ozogul C, Alaygut E, Gokmen N, Kucukguclu S, Gunerli A, et al. Neuroprotective effects of ketorolac tromethamine after spinal cord injury in rats: an ultrastructural study. Advances in therapy. 2008;25:152-8.
31. Esen E, Taşar F, Akhan O. Determination of the anti-inflammatory effects of methylprednisolone on the sequelae of third molar surgery. Journal of oral and maxillofacial surgery. 1999;57(10):1201-6.
32. Cortivo R, Brun P, Cardarelli L, O'Regan M, Radice M, Abatangelo G, editors. Antioxidant effects of hyaluronan and its α-methyl-prednisolone derivative in chondrocyteand cartilage cultures. Seminars in arthritis and rheumatism; 1996: Elsevier.
33. Arif A, Hussain S, Rajput SN, Malik HN, Naqvi F, Jabeen A, et al. Nanoscale Lipid-Methylprednisolone Conjugates: Effective Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Analgesic Agents. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2024:106251.
34. Rainsford K. Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). The American journal of medicine. 1999;107(6):27-35.

Effects of intracerebroventricular injection of ketorolac and methylprednisolone on antioxidant activity in brain tissue of epileptic rats

Zohreh Fazlelahi [1], Jahangir Kaboutari [2*], Morteza Zendehdel [3], Negar Panahi [4]

1- PhD student, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. Corresponding author: kaboutari-j@sku.ac.ir

3- Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding Author: Jahangir Kaboutari

Tel: 0098-38-3232227

E-mail: kaboutari-j@sku.ac.ir

Abstract

Background & Aim: Epilepsy is a pervasive brain disorder and oxidative stress is considered as one of the most important mechanisms involved in epilepsy. Rather than treating epilepsy, current drugs merely control seizure symptoms and are ineffective in 30 percent of patients. Therefore, identifying more effective medications for the treatment of epilepsy is of great importance. In this regard, the present study was carried out with the aim of investigating the effects of intracerebroventricular (ICV) administration of ketorolac and methylprednisolone on the oxidative stress indices of the brain tissue of epileptic rats.

Materials and methods: In the current study, 48 female rats were randomly divided into 8 experimental groups to perform two experiments. In the first experiment, normal saline and ketorolac in doses of 7.5, 15, and 30 μg and in the second experiment, normal saline and methylprednisolone in doses of 0.15, 0.3, and 0.6 μg were injected ICV, respectively, and acute epilepsy was also induced by intraperitoneal administration of pentylenetetrazole in rats. Half an hour after the injections, the rats were euthanized, and after separating the brain, the indicators of oxidative stress, total antioxidant capacity, malondialdehyde, and nitric oxide levels were measured in hippocampal homogenous tissue.

Results: Based on the findings, the injection of ketorolac and methylprednisolone in a dose-dependent manner caused a significant increase in the total antioxidant capacity of the treatment groups compared to the control group ($P<0.05$). Also, the administration of different doses of both drugs significantly reduced the level of malondialdehyde and nitric oxide compared to the control group ($P<0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that ketorolac and methylprednisolone probably have antioxidant effects and can be further investigated as potential treatment options for epilepsy and other diseases related to oxidative stress.

Key words: Oxidative stress, Epilepsy, Ketorolac, Methylprednisolone, Rat