تحقیقی

اثر اتانول بر میزان تغییرات عروق ریز قشر مغز در موش‌های سوری صرعی شده تحت درمان با والپریک اسید

دکتر رحیم گل‌محمدی[۱]، دکتر محمد محمدزاده*[۲]، دکتراکبر پژهان[۳]

۱- دانشیار گروه علوم تشریحی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار. ۲- استادیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار. ۳- دانشیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار.

چکیده

زمینه و هدف : *گزارش‌های متناقضی در خصوص اثر الکل بر تشنجات صرعی وجود دارد. این مطالعه به منظور تعیین اثر اتانول بر میزان تغییرات عروق ریز مغزی به روش ایمونوهیستوشیمی در موش‌های سوری صرعی شده با پنتلین تترازول تحت درمان با والپریک اسید انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه تجربی ۳۶ سر موش سوری به‌طور تصادفی در گروه‌های ٦ تایی تشنج (گروه اول): تزریق داخل صفاقی پنتلین تترازول (۳۷ mg/kg) یک روز در میان؛ گروه دوم (اتانول) (۱ gr/kg)؛ گروه سوم (والپرویک اسید ۱۰۰ mg/kg + پنتلین تترازول ۳۷ mg/kg)؛ گروه چهارم (اتانول ۱ gr/kg و پنتلین تترازول ۳۷ mg/kg)؛ گروه پنجم (والپرویک اسید ۱۰۰ mg/kg + پنتلین تترازول ۳۷ mg/kg + اتانول ۱ gr/kg) و گروه ششم (کنترل) قرار گرفتند. گروه‌های تجربی تحت درمان با والپرات اسید و یا اتانول، ۳۰دقیقه قبل از هر بار تزریق پنتلین تترازول، به صورت داخل صفاقی والپرات اسید یا اتانول دریافت نمودند. اسلایدهای تهیه شده از مغز حیوانات با هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی شد. از هر گروه ۳۶ میدان میکروسکوپی انتخاب و شمارش عروقی انجام شد. با روش ایمونوهیستوشیمی آسیب سلول‌هایی اندوتلیال بررسی شد.*

یافته‌ها : *تعداد عروق ریز مغزی گروه‌های تجربی دوم، چهارم و پنجم نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). تغییرات آسیب‌شناسی عروق مغزی گروه چهارم به‌صورت ترومبوز عروق مغزی، حاشیه‌نشینی سلول‌های خونی در جدار اندوتلیوم عروق مغزی بود. تغییرات مورفولوژی در عروق و پرولیفراسیون سلول های آندوتلیال عروق مغزی گروه پنجم مشاهده شد. رنگ پذیری سلول‌های اندوتلیال عروق قشر مغز و از بین رفتن پیوستگی بین سلول های اندوتلیال عروق قشر مغز در گروه تجربی چهارم نسبت به سایر گروه‌های تجربی بیشتر مشاهده شد.*

نتیجه‌گیری : *تجویز اتانول توأم با پنتلین تترازول در موش های سوری سبب ترمبوز، انفیلتراسیون و آسیب عروق قشر مغز می‌گردد و تجویز همزمان والپریک اسید باعث کاهش تغییرات پاتولوژیک می‌گردد.*

کلید واژه‌ها : *پنتلین تترازول ، والپرات سدیم ، اتانول ، عروق ریز، مغز*

* نویسنده مسؤول : دکتر محمد محمدزاده ، پست الکترونیکی mohamad1353@gmail.com

نشانی : سبزوار ، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، تلفن ۰۵۷۱-٤٤٤٦۰۷۰ ، نمابر ٤٤٤٥٦٤٨

وصول مقاله : ۹۱/۲/۱۱ ، اصلاح نهایی : ۹۲/۲/۲۲ ، پذیرش مقاله : ۹۲/۲/۲٤

مقدمه

صرع یکی از رایج‌ترین اختلالات عصبی در انسان است که هنوز روش قطعی درمان آن شناخته نشده است. داروهای ضدصرع موجود فقط حدود ۴۰درصد موارد تشنج را از بین می‌برند و در بقیه موارد فقط فراوانی وقوع تشنج‌ها کم می شود (۱). در رابطه با اثر مصرف الکل بر تشنجات صرعی گزارش‌های ضد و نقیضی وجود دارد؛ نظیر این که خوراندن الکل به موش‌ها باعث افزایش فرکانس وقوع تشنج می‌شود (۲و۳) یا این که اتانول اثر ضدتشنجی دارد (۴). گزارش‌هایی نیز حاکی از بی‌اثر بودن الکل بر تشنجات صرعی ایجاد شده ناشی از الکتروشوک و پنتلین تترازول منتشر شده است (۵). هرچند گزارش دقیقی در مورد میزان مصرف الکل توسط بیماران صرعی وجود ندارد؛ ولی سازمان‌های بهداشتی غرب از مصرف فزآینده حدود ۴۲ درصدی آن در بین نوجوانان خبر می دهند (۶). علی رغم این که مصرف الکل در دوران بارداری موجب اختلال تکامل بافت عصبی و طیف وسیعی از ناهنجاری جنینی می‌شود؛ ولی مصرف نوشیدنی‌های الکلی رو به ازدیاد است (۷). به‌طوری که در سال‌های بین ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۸ میلادی یک افزایش معنی‌دار از ناهنجاری‌های جنینی توسط Morleo و همکارانش از انگلستان گزارش شد (۸). همچنین گزارشات جدید حاکی از اثر الکل بر اختلال عملکردی سدخونی مغزی حکایت

دارد (۹). مصرف الکل در موش‌هایی که دوران پرنتال را می‌گذارند؛ موجب اختلال تکاملی در عروق مغزی می‌شود (۱۰). الکل می‌تواند موجب کاهش عملکردی داروهای ضدصرع و در مواردی موجب بدتر شدن تشنج شود (۱۱). از طرف دیگر والپریک اسید (valproic acid: VPA) که یک داروی ضدصرع و کنترل کننده تشنج است؛ در متابولیسم فولات‌ها اثر می‌گذارد (۱۲و۱۳). والپریک اسید در مهار مرگ سلول‌های پیشساز (Progenitor) تولیدکننده نورون نقش دارد (۱۴). اتانول در محیط آزمایشگاهی رگزایی را در سلول‌های سرطانی کولون سبب شده (۱۵) و نیز صرع موجب رگزایی شده است (۱۶) و در مطالعاتی نقش مهاری والپرات سدیم در رگزایی دیده شده است (۱۷). برای بررسی ساختار عروق روش‌های مختلفی وجود دارد که می‌توان به مشاهده مستقیم عروق با میکروسکوپ نوری، الکترونی، مطالعه مولکولی و ایمونوهیستوشیمی اشاره نمود (۱۸). این مطالعه به منظور تعیین اثر اتانول بر میزان تغییرات عروق ریز مغزی به روش ایمونوهیستوشیمی در موش‌های سوری صرعی شده با پنتلین تترازول (PTZ) تحت درمان با والپریک اسید انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۳۶ سر موش سوری نژاد BALB/c تهیه شده از مؤسسه سرم‌سازی رازی مشهد در محدوده وزنی ۳±۲۵گرم در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار در سال ۱۳۹۱ انجام شد.

پروتکل اخلاقی کار بر روی حیوانات رعایت شد. موش‌ها به‌طور تصادفی در ۶ گروه ۶ تایی قرار گرفتند. به طوری که هر یک از نمونه‌ها شانس مساوی برای انتخاب شدن در هر گروه را داشت.

گروه‌ها شامل گروه اول (تشنج): دریافت کننده نرمال‌سالین ۳۰ دقیقه قبل از تزریق داخل صفاقی پنتلین تترازول (۳۷ mg/kg) یک روز در میان (هر ۴۸ ساعت) ۱۲ بار (۱۹و۲۰)؛ گروه دوم (اتانول) (۱ gr/kg) (Merck)؛ گروه سوم (والپرویک اسید ۱۰۰ mg/kg + پنتلین تترازول ۳۷ mg/kg) (۱۲)؛ گروه چهارم (اتانول ۱ gr/kg و پنتلین تترازول ۳۷ mg/kg)؛ گروه پنجم (والپرویک اسید ۱۰۰ mg/kg + پنتلین تترازول ۳۷ mg/kg + اتانول ۱ gr/kg) و گروه ششم (کنترل) دریافت کننده نرمال‌سالین بود.

گروه‌های تجربی تحت درمان با والپرات اسید و یا اتانول، ۳۰دقیقه قبل از هر بار تزریق پنتلین تترازول، به صورت داخل صفاقی والپرات اسید یا اتانول دریافت نمودند (۲۱و۲۲).

پس از گذشت ۲۴ ساعت از آخرین تزریق پنتیلن تترازول در ابتدا حیوان بیهوش شد. بعد از بازکردن قفسه‌سینه عمل پرفیوژن از طریق بطن چپ توسط نرمال‌سالین و سپس ماده فیکساتیو فرمالین ۱۰درصد صورت گرفت. پس از پرفیوژن کامل نسج نرم و اسکلت جمجمه حیوان برداشته شد و مغز حیوان با دقت از داخل جمجمه خارج و در داخل ظرف فرمالین ۱۰درصد قرار داده شد. پس از تعویض فرمالین پاساژ بافتی (Tissue processing) انجام شد. آبگیری بافتی (Dehydration) با درجات افزایش اتانل (۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۵، ۱۰۰درصد؛ منظور از الکل ۱۰۰درصد درجه خلوص الکل است) انجام شد. ازگزیلن برای شفاف‌سازی استفاده گردید. قالب‌گیری (Embedding) با پارافین و مقطع‌گیری کرونال (عمودی) به صورت تصادفی سیستماتیک با میکروتوم انجام شد و پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین تهیه مقاطع به طور تصادفی اما سیستمیک انجام شد. به صورتی که اولین انتخاب به صورت تصادفی بود؛ سپس با فاصله منظم از اولین انتخاب، مقاطع دیگر تهیه گردید. ۳۶ میدان دید از هرگروه با میکروسکوپ نوری Motic و نرم‌افزار Advanced motic plus2 با بزرگ‌نمای ×400 بررسی و تصویربرداری شد. تعداد عروق در مساحتی به ابعاد ۸×۸ میلی‌متر مکعب شمارش شدند. همچنین مورفولوژی ساختار عروق ریز مغزی بررسی گردید. عروق ریز عروقی بودند که لایه قابل تشخیص عضلانی مشخصی در جدار رگ نداشتند (۲۳). شمارش عروق توسط دو نفر به صورت مجزا انجام و ثبت شد.

به صورت تصادفی بر روی تعدادی از مقاطع ۵ میکرونی تهیه شده از بافت مغزی پس از پارافین‌زدایی با استفاده از روش معمول آویدن- بیوتین- ایمونوپرکسیداز؛ ایمونوهیستوشیمی انجام شد. مراحل انجام کار دما و غلظت‌های آنتی‌بادی بر طبق دستور کیت انجام گرفت. بدین ترتیب برای ماسک‌زدایی محل شاخص‌های آنتی ژنیک نمونه‌ها از میکروویو و بافرسیترات استفاده شد. برای مهار فعالیت اندوژناز پراکسیداز به مدت ۳۰دقیقه در محلول ۳درصد آب اکسیزنه قرار داده شد و مجدداً ۵ بار بافر فسفات سالین لام‌ها شستشو داده شد. با آنتی‌بادی اولیه (Primary rabbit anti- caspase 3 Novocastra liquid (NCL-caspase-3) روی لام‌ها چکانده شد و با بافرفسفات سالین (PBS) شستشو داده شد. سپس از آنتی‌بادی ثانویه Novodetection kit NovocastraR7 استفاده شد و از استرپتوآویدین متصل به HRP که قادر است دی‌آمینوبنزیدین (DAB) را اکسید کند؛ برای رنگ‌آمیزی سلول‌های اندوتلیال استفاده شد و با میکروسکوپ نوری بررسی و تصویر گرفته شد. سلول‌هایی که کمتر از ۱۰درصد رنگ گرفتند؛ منفی قلمداد شدند و سلول هایی که بیش از ۱۰ درصد رنگ قهوه‌ای به خودگرفتند؛ مثبت در نظر گرفته شدند (۲۴و۲۵).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-15 و آنالیز واریانس یک‌طرفه با استفاده از تست‌های Dunnett برای مقایسه میانگین گروه‌های تجربی با کنترل و تست Duncan باضریب آلفای۵ درصد برای میانگین داخل گروه‌های تجربی تجزیه و تحلیل شدند. سطح

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار تعداد عروق ریز مغزی موش‌های سوری صرعی شده با پنتلین تترازول تحت درمان با والپریک اسید درگروه‌های مورد مطالعه

گروه‌های مورد مطالعه	میانگین و انحراف معیار	حد بالا	حد پایین
پنتلین تترازول (۳۷ mg/kg) + نرمال سالین	۲/۱۵۷±۵/۳۳٤۳	۲/۰۱۳۹	۲/۰۵۳۱۷
* اتانول (۱ gr/kg)	۲/۲۰۰±۰/۹٦٤۰٦	۲/۵۳۱۲	۱/۸٦۸۸
* والپرویک اسید (۱۰۰ mg/kg) + پنتلین تترازول (۳۷ mg/kg)	۲/۱۰۰±۰/۹۰۷٤۹	۲/۸۷۱٤	۲/۱۵۷۲
* اتانول (۱ gr/kg) و پنتلین تترازول (۳۷ mg/kg)	۲/۵۱٤±۱/۰۳۹۵۵	۲/۰۷۵۵	۲/۱۱۹۰
* والپرویک اسید (۱۰۰ mg/kg) + پنتلین تترازول (۳۷ mg/kg) + اتانول (۱ gr/kg)	۲/٤۸۵±۱/۰٦۷٤۷	۲/۰۳٦۰	۱/۰۵۰٦۸
کنترل	۱/۷۱۰±۱/۳۳۹۱۳	۲/٤۳۱٤	۱/۰۵۱۱٤

* P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل

جدول ۲ : فراوانی رنگ‌پذیری سلول‌های اندوتلیال عروق ریز مغزی موش‌های سوری صرعی شده با پنتلین تترازول تحت درمان با والپریک اسید درگروه های مورد مطالعه

	گروه‌های مورد مطالعه	مثبت (تعداد) (بیش از ۱۰ درصد)	منفی (تعداد) (کمتر از۱۰ درصد)
اول	پنتلین تترازول (۳۷ mg/kg) + نرمال سالین	۹	۱۱
دوم	اتانول (۱ gr/kg)	۱۲	۸
سوم	والپرویک اسید (۱۰۰ mg/kg) + پنتلین تترازول (۳۷ mg/kg)	۸	۱۲
چهارم	اتانول (۱ gr/kg) و پنتلین تترازول (۳۷ mg/kg)	۱٦	٤
پنجم	والپرویک اسید (۱۰۰ mg/kg) + پنتلین تترازول (۳۷ mg/kg) + اتانول (۱ gr/kg)	۱٤	٦
ششم	کنترل	۰	۲۰

معنی‌داری همه آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تعداد عروق ریز مغزی گروه‌های تجربی دوم (۲/۲۰۰±۰/۹٦۴۰٦) (P<۰/۰۵)، تجربی چهارم (۲/۵۱۴±۱/۰۳۹۵۵) (P<۰/۰۱۳) و تجربی پنجم (۲/۴۸۵±۱/۰٦۷۴۷) (P<۰/۰۱۸) نسبت به کنترل (۱/۷۱۰±۱/۳۳۹۱۳) افزایش معنی‌داری نشان داد؛ اما این میزان در گروه های تجربی اول (۲/۱۵۷±۵/۳۳۴۳) و گروه تجربی سوم (۲/۱۰۰±۰/۹۰۷۴۹) در مقایسه با کنترل اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد. بین تعداد عروق ریز مغزی گروه تجربی سوم در مقایسه با گروه تجربی چهارم تغییرات آماری معنی‌دار یافت شد (P<۰/۰۵) (جدول یک).

تغییرات آسیب‌شناسی عروق مغزی گروه چهارم نه تنها به‌صورت ترومبوز عروق مغزی مشاهده شد؛ بلکه حاشیه‌نشینی سلول‌های خونی در جدار اندوتلیوم عروق مغزی نیز قابل توجه بود (شکل یک). در حالی که این تغییرات در گروه کنترل مشاهده نشد.

در بررسی بافت شناسی مقاطع میکروسکوپی تهیه شده از قشر مغز موش‌های گروه چهارم واکنش‌های التهابی یعنی انفیلتراسیون سلول‌های لنفوسیتی در بین نورون‌های قشر مغز مشاهده شد (شکل ۲). در موش‌های گروه اول (شکل ۳) و کنترل تغییرات مورفولوژی مشخصی در عروق مغزی مشاهده نشد. تغییرات مورفولوژی واضحی در جدار اندوتلیوم عروق حیوانات صرعی شده تحت درمان با والپرویک اسید دیده نشد؛ ولی قطر لومن عروق مغزی این گروه بیشتر از حیوانات گروه کنترل بود (شکل ۴).

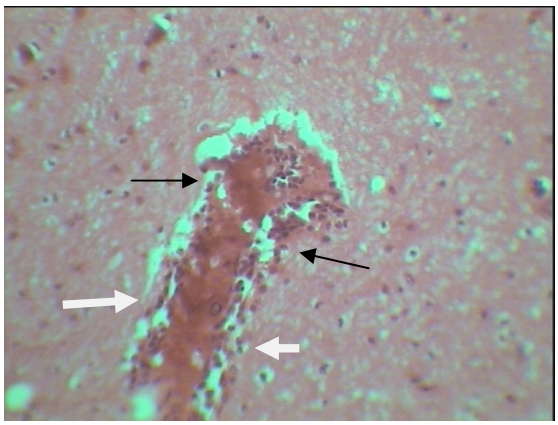
تغییرات مورفولوژی در عروق و پرولیفراسیون در سلول‌های آندوتلیال عروق مغزی گروه پنجم مشاهده شد؛ ولی ترومبوزعروقی دیده نشد (شکل ۵).

رنگ‌پذیری سلول‌های اندوتلیال عروق قشر مغز و از بین رفتن پیوستگی بین سلول‌های اندوتلیال عروق قشر مغز در گروه تجربی چهارم نسبت به سایر گروه‌های تجربی بیشتر مشاهده شد (شکل ۶). در حالی که این تغییرات در گروه کنترل مشاهده نشد (جدول۲).

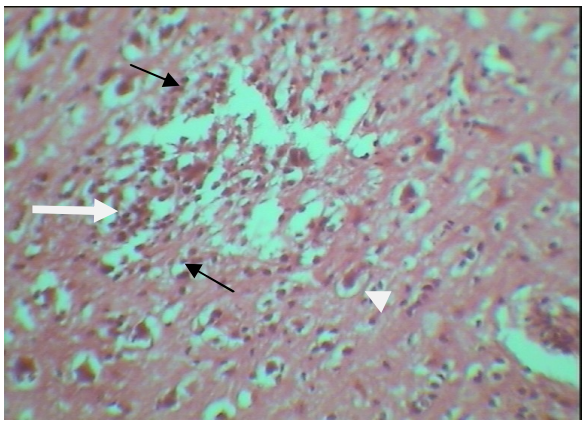
بحث

این مطالعه نشان داد که تجویز اتانول توأم با پنتلین تترازول در موش‌های صوری سبب ترمبوز، انفیلتراسیون و آسیب عروق قشر مغز می‌گردد و مصرف همزمان والپریک اسید باعث کاهش تغییرات پاتولوژیک می‌گردد.

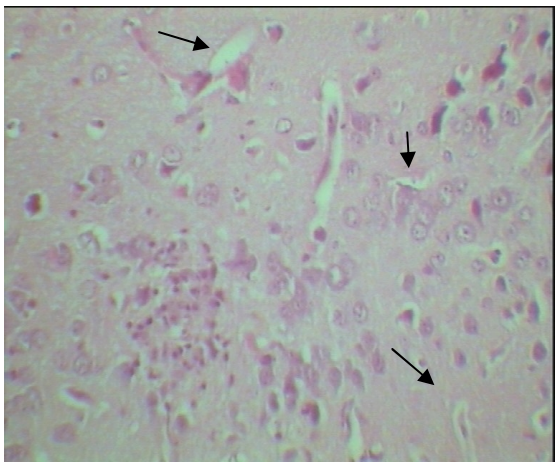
در مطالعه Shiu و همکاران بر روی سلول‌های آندوتلیال عروق مغزی انسان، الکل سبب اختلال عملکردی عروق و نیز موجب افزایش دیفوزیون محتویات خون از عرض غشای سلول‌های اندوتلیال عروق گردید (۲۶). در مطالعه حاضر در گروهی از موش‌ها که فقط الکل دریافت کردند؛ هرچند افزایش عروق ریز مغزی مشاهده شد؛ ولی واکنش‌های التهابی در آنها دیده نشد. در حالی که در موش‌های دریافت کننده الکل توأم با پنتلین تترازول، نه‌تنها افزایش عروق ریز دیده شد؛ بلکه واکنش‌های التهابی نیز



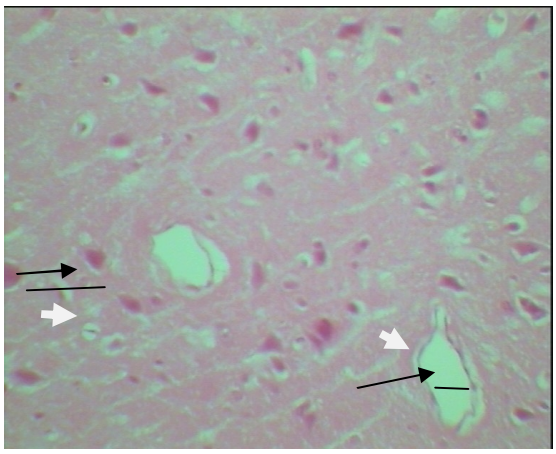
شکل ۱ : مقطع کرونال ۵ میکرونی بافت مغز در گروه اتانول +PTZ
با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین
پیکان‌ها انفیلتراسیون سلول خونی و ترومبوز عروقی را در بین
نورون‌ها نشان می‌دهند (بزرگ‌نمایی ×۴۰۰).



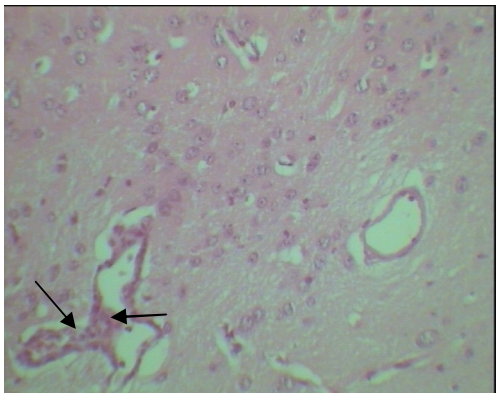
شکل ۲ : مقطع کرونال ۵ میکرونی بافت مغز گروه اتانول +PTZ با
رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین
پیکان‌ها انفیلتراسیون سلول خونی را در بین نورون‌های قشر مغز
نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی ×۴۰۰).



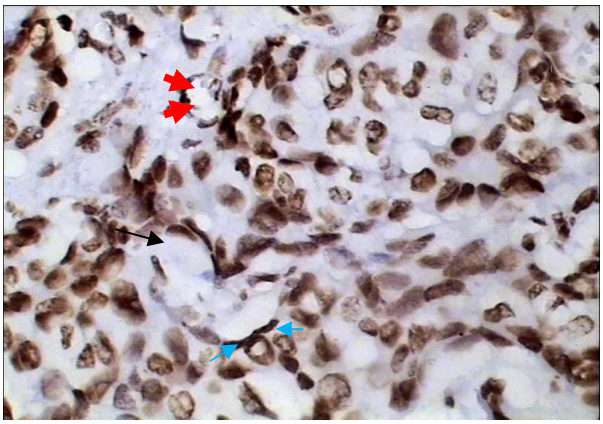
شکل ۳ : مقطع کرونال ۵ میکرونی بافت مغز موش‌های گروه Saline+
PTZ با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین
پیکان‌ها لومن و اندوتلیوم عروق مغزرا نشان می‌دهند.
(بزرگ‌نمایی ×۴۰۰)



شکل ٤ : مقطع کرونال ۵ میکرونی بافت مغزی گروه VPA + PTZ با
رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین
پیکان‌های بلند مشکی لومن عروق و پیکان‌های سفید اندوتلیوم
عروق مغز را نشان می‌دهند (افزایش قطر عروق مغز ۶۰۰μ–)
(بزرگ‌نمایی ×۴۰۰).



شکل ۵ : مقطع کرونال ۵ میکرونی بافت مغز گروه اتانول+VPA
+PTZ با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین
پیکان‌ها انفیلتراسیون سلول اندوتلیال عروقی را در بافت مغزی نشان
می‌دهند (بزرگ‌نمایی ×۴۰۰).



شکل ٦ : مقطع ۵ میکرونی تهیه شده از بافت مغزی موش‌های گروه
اتانول+PTZ. پیکان‌های قرمز لومن، پیکان‌های آبی سلول‌های
اندوتلیال و پیکان بزرگ (مشکی) عدم پیوستگی موجود بین
سلول‌های اندوتلیال را نشان می‌دهد.
(رنگ‌آمیزی اختصاصی ایمونوهیستوشیمی ، بزرگ‌نمایی ×۴۰۰)

مشاهده گردید که نشان می دهد سد خونی مغزی در اثر مصرف توأم الکل و پنتلین تترازول آسیب‌پذیرتر است. برخی مطالعات آسیب‌های سلولی ناشی از اتانول را به القای آنزیم‌ها مربوط می‌دانند که در واکنش‌های اکسیداتیو مانند P450-2E1 فعال می‌شوند. اگرچه چگونگی اثر الکل بر روی سلول‌های آندوتلیال عروق مغز هنوز به طور کامل شناخته نشده است؛ ولی به‌نظر می‌رسد که افزایش واکنش‌های استرسی در آندوتلیال عروق مغز منجر به اختلال عملکردی سدخونی مغزی می‌گردد (۲۷). با توجه به این که در مطالعه حاضر اثر اتانول درحیوانات صرعی شده با پنتلین تترازول شدیدتر ازگروه دریافت کننده اتانول تنها بود؛ اثر هم‌افزایی این دو مطالعات بیشتری را می‌طلبد.

در مطالعه Haorah و همکاران اتانول از طریق اختلال درگیرنده‌های تری‌فسفات موجب آزاد شدن کلسیم گردید که می‌تواند چاشنی مرگ نورونی را به‌دنبال داشته باشد (۲۷). در مطالعه حاضر در موش‌های سوری دریافت کننده توأم پنتلین تترازول، اتانول و والپریک اسید واکنش‌های التهابی مشاهده نشد. لذا می‌توان گفت که والپریک اسید تا حدی در پیشگیری یا ترمیم آسیب آندوتلیال عروقی ناشی از الکل موثر بوده است. مطالعه Shang و همکاران نشان داد که والپریک اسید موجب کاهش سیتوکینازهایی می‌شود که در واکنش‌های التهابی نقش دارند (۱۲). این مطالعه با تحقیق حاضرهم‌خوانی دارد. در همین راستا Hrebackova و همکاران نشان دادند والپریک اسید برای درمان بیماران بدخیم به‌عنوان یک داروی مناسب ضدتومور عمل می‌کند (۲۸).

در مطالعه حاضر میانگین عروق ریز مغزی در حیوانات دریافت کننده توأم اتانول و پنتلین تترازول بیشتر از گروه دریافت کننده توأم پنتلین تترازول و والپریک اسید بود. لذا می‌توان گفت اتانول در رگزایی نقش دارد. در حالی که والپریک اسید نقش مهاری در رگزایی دارد. در مطالعه Osuka و همکاران والپریک اسید از طریق مهار عوامل رشد موجب کاهش رگزایی در تومورهای گلیوما گردید (۲۹). هرچند نوع مطالعه Osuka و همکاران (۲۹) با مطالعه ما متفاوت است زیر مطالعه حاضر روی حیوانات صرعی انجام شده؛ ولی نتایج تقریباً همخوان است.

بیماران مبتلا به صرع لوب تمپورال کاهش دانسیته فیبرهای عصبی را در مقایسه با گروه کنترل نشان داده اند و بالعکس در بیماران صرعی یک افزایش در رشته‌های عصبی ناحیه لیمبیک ایجاد می‌شود (۳۰). لذا می‌توان گفت اگر در صورت کنترل نشدن بیماری صرع به مرگ منجر گردد؛ حداقل اختلال عملکردی را موجب می‌شود. در مورد اثرات والپریک اسید روی مرگ سلولی اطلاعات ضد و نقیضی وجود دارد (۳۱و۳۲). در مطالعه ای مصرف این دارو در خرگوش توأم با ویتامین C سبب کاهش اجسام آپوپتیک گردید (۳۱). از طرفی مطالعه دیگری نشان داد که اگر والپریک اسید زیاد مصرف شود؛ موجب القای آپوپتوز در نورون‌های هیپوکامپ می‌گردد (۳۲). لذا توصیه می‌شود این دارو با اسیداسکوربیک مصرف شود تا این عارضه هم به حداقل ممکن برسد.

علی‌رغم مزیت‌های والپریک اسید، این دارو و الکل جزء ترکیبات تراتوژنیک هستند و نباید تحت هیچ شرایطی در دوران بارداری مصرف شوند. طیف وسیعی از ناهنجاری مغزی و قلبی در جنین در اثر استفاده از اتانول و والپریک اسید گزارش شده است (۳۳و۳۴). با توجه به این که والپریک اسید یک داروی ضدصرع مهم است؛ پیشنهاد می‌شود برای شناخت بیشتر اثرات این دارو بر روی عروق قشر مغزی در حیوانات صرعی شده مطالعات سلولی و مولکولی بیشتری انجام شود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که تجویز اتانول توأم با پنتلین تترازول در موش‌های سوری سبب ترمبوز، انفیلتراسیون و آسیب عروق قشر مغز می گردد و تجویز همزمان والپریک اسید باعث کاهش تغییرات پاتولوژیک می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۳۸۸۰۱۰۱۰۵) دانشگاه علوم پزشکی سبزوار بود و با حمایت مالی آن معاونت به انجام رسید. بدین‌وسیله از آقایان دکتر حمیدرضا جلیلیان و دکتر محمدحسن رخشانی صمیمانه سپاسگزاری می‌نماییم.

References

1. Delgado-Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW, Porter RJ. New waves of research in the epilepsies: crossing into the third millennium. Adv Neurol. 1999;79:3-58.

2. Scorza FA, Arida RM, Cysneiros RM, Priel MR, de Albuquerque M, Cavalheiro EA. The effects of alcohol intake and withdrawal on the seizures frequency and hippocampal morphology in rats with epilepsy. Neurosci Res. 2003 Nov;47(3):323-8.

3. Hsieh CL, Chang CH, Chiang SY, Li TC, Tang NY, Pon CZ, et al. Anticonvulsive and free radical scavenging activities of vanillyl alcohol in ferric chloride-induced epileptic seizures in Sprague-Dawley rats. Life Sci. 2000;67(10):1185-95.

4. Fischer W. Influence of ethanol on the threshold for electroshock-induced seizures and electrically-evoked hippocampal afterdischarges. J Neural Transm. 2005 Sep; 112(9):1149-63.

5. Kozan R, Ayyildiz M, Yildirim M, Agar E. The effects of ethanol intake and withdrawal on penicillin-induced epileptiform activity in rats. Brain Res Bull. 2006 Dec;71(1-3):111-5.

6. Banken JA. Drug abuse trends among youth in the United States. Ann N Y Acad Sci. 2004 Oct;1025:465-71.

7. Jaatinen P, Rintala J. Mechanisms of ethanol-induced degeneration in the developing, mature, and aging cerebellum. Cerebellum. 2008;7(3):332-47.

8. Morleo M, Woolfall K, Dedman D, Mukherjee R, Bellis MA, Cook PA. Under-reporting of foetal alcohol spectrum disorders: an analysis of hospital episode statistics. BMC Pediatr. 2011

Feb;11:14.

9. Faria A, Pestana D, Teixeira D, Azevedo J, De Freitas V, Mateus N, et al. Flavonoid transport across RBE4 cells: A blood-brain barrier model. Cell Mol Biol Lett. 2010 Jun;15(2):234-41.

10. Jégou S, El Ghazi F, de Lendeu PK, Marret S, Laudenbach V, Uguen A, et al. Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. Ann Neurol. 2012 Dec; 72(6):952-60.

11. Leach JP, Mohanraj R, Borland W. Alcohol and drugs in epilepsy: pathophysiology, presentation, possibilities, and prevention. Epilepsia. 2012 Sep;53(Suppl 4):48-57.

12. Shang Y, Jiang YX, Ding ZJ, Shen AL, Xu SP, Yuan SY, et al. Valproic acid attenuates the multiple-organ dysfunction in a rat model of septic shock. Chin Med J (Engl). 2010 Oct;123(19):2682-7.

13. Leng Y, Liang MH, Ren M, Marinova Z, Leeds P, Chuang DM. Synergistic neuroprotective effects of lithium and valproic acid or other histone deacetylase inhibitors in neurons: roles of glycogen synthase kinase-3 inhibition. J Neurosci. 2008; 28(10): 2576-88.

14. Go HS, Seo JE, Kim KC, Han SM, Kim P, Kang YS, et al. Valproic acid inhibits neural progenitor cell death by activation of NF-κB signaling pathway and up-regulation of Bcl-XL. Biomed Sci. 2011; 18(1): 48.

15. Wang L, Son YO, Ding S, Wang X, Hitron JA, Budhraja A, et al. Ethanol enhances tumor angiogenesis in vitro induced by low-dose arsenic in colon cancer cells through hypoxia-inducible factor 1 alpha pathway. Toxicol Sci. 2012 Dec;130(2):269-80.

16. Rigau V, Morin M, Rousset MC, de Bock F, Lebrun A, Coubes P. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. Brain. 2007; 130(7):1942-56.

17. Isenberg JS, Jia Y, Field L, Ridnour LA, Sparatore A, Del Soldato P, et al. Modulation of angiogenesis by dithiolethione-modified NSAIDs and valproic acid. Br J Pharmacol. 2007 May; 151(1):63-72.

18. Kaya M, Becker AJ, Gürses C. Blood-brain barrier, epileptogenesis, and treatment strategies in cortical dysplasia. Epilepsia. 2012 Nov;53(Suppl 6):31-6.

19. Fischer W, Kittner H. Influence of ethanol on the pentylenetetrazol-induced kindling in rats. J Neural Transm. 1998; 105:1129-42.

20. Atapour N, Kalantaripour TP, Nourpanah M, Niazi M. Chemical kindling and seizure susceptibility in morphine dependent rats. Eur Neuropsychopharmacol. 2000 Dec;10(6):483-7.

21. Borowicz KK, Czuczwar SJ. Effect of some convulsants on the protective activity of loreclezole and its combinations with valproate or clonazepam in amygdala-kindled rats. Pol J Pharmacol. 2003 Sep-Oct;55(5):727-33.

22. Williams AJ, Tortella FC, Lu XM, Moreton JE, Hartings JA. Antiepileptic drug treatment of nonconvulsive seizures induced by experimental focal brain ischemia. J Pharmacol Exp Ther. 2004 Oct;311(1):220-7.

23. Long MY, Li HH, Xu JY, Lai DM, Weng ZH. [Inhibitory effects of transfection of arresten gene on liver metastasis from colorectal cancer in nude mice]. Ai Zheng. 2008 Oct;27(10):1039-43. [Article in Chinese]

24. Claire RC, Steven WF, Giles JT, Mark AH. Immunohistochemical measurement of endothelial cell apoptosis and proliferation in formalin-fixed,paraffin-embedded human cancer tissue. Angiogenesis. 2006;9:193-200.

25. Otilia Z, Felix MB, Mihaela C, Alexandru VC. Immunohistochemical localization of caspase-3, caspase-9 and Baxin U87 glioblastoma xenografts. J Mol Hist. 2008;39:561-9.

26. Shiu C, Barbier E, Di Cello F, Choi HJ, Stins M. HIV-1 gp120 as well as alcohol affect blood-brain barrier permeability and stress fiber formation: involvement of reactive oxygen species. Alcohol Clin Exp Res. 2007; 31(1): 130-7.

27. Haorah J, Knipe B, Leibhart J, Ghorpade A, Persidsky Y. Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction. J Leukoc Biol. 2005 Dec;78(6):1223-32.

28. Hrebackova J, Hrabeta J, Eckschlager T. Valproic acid in the complex therapy of malignant tumors. Curr Drug Targets. 2010; 11(3): 361-79.

29. Osuka S, Takano S, Watanabe S, Ishikawa E, Yamamoto T, Matsumura A. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and glioma angiogenesis in vivo in the brain. Neurol Med Chir (Tokyo). 2012;52(4):186-93.

30. Bonilha L, Nesland T, Martz GU, Joseph JE, Spampinato MV, Edwards JC, et al. Medial temporal lobe epilepsy is associated with neuronal fibre loss and paradoxical increase in structural connectivity of limbic structures. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2012 Sep;83(9):903-9.

31. Dai Y, Chen J, Li H, Li S, Chen J, Ding Y, et al. Characterizing the effects of VPA, VC and RCCS on rabbit keratocytes onto decellularized bovine cornea. PLoS One. 2012;7(11):e50114.

32. Wang C, Luan Z, Yang Y, Wang Z, Cui Y, Gu G. Valproic acid induces apoptosis in differentiating hippocampal neurons by the release of tumor necrosis factor-α from activated astrocytes. Neurosci Lett. 2011 Jun;497(2):122-7.

33. Yochum CL, Dowling P, Reuhl KR, Wagner GC, Ming X. VPA-induced apoptosis and behavioral deficits in neonatal mice. Brain Res. 2008; 1203: 126-32.

34. Malone M, Koren G. Alcohol-induced behavioural problems in fetal alcohol spectrum disorders versus confounding behavioural problems. J Popul Ther Clin Pharmacol. 2012;19(1):e32-40.

Original Paper

Effect of ethanol on microvascular alterations in the brain cortex of epileptic mice treated by valporic acid

Golmohammadi R (PhD)[1], Mohammad-Zadeh M (PhD)*[2], Pejhan A (PhD)[3]

[1]Associate Professor, Department of Anatomy, Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran. [3]Associate Professor, Department of Physiology, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.

Abstract

Background and Objective: Antiepileptic drugs can partiality control or achieve the convulsion. There are controversial issues about the use and effect of ethanol to control epileptic convulsion seizers. This study was done to determine the effect of ethanol on microvascular alterations in the brain cortex of epileptic mice treated by valporic acid (VPA).

Materials and Methods: In this experimental study, 36 BALB/c mice were allocated randomly into six groups including: 1-PTZ (Pentylenetetrazol), 2- Ethanol, 3- VPA+ PTZ, 4- ethanol + PTZ, 5-ethanol+ VPA+ PTZ and control groups. The animal brains were excluded and stained by Hematoxilin and eosin. Thirty-six optical microscopic field from each group were selected and microvascular count were determined. Immunohistochemical method was used for detection of injuries in the vascular brain tissue.

Results: Mean number of brain microvascular cortex significantly increaed in PTZ+ethanol and PTZ+ethanol+VPA groups in compare to controls ($P<0.05$). Infiltration and thrombophlebitis were observed in vessels and cortical brain tissues in mice which received ethanol and PTZ. Proliferations in endothelial vascular cells were seen in PTZ and VPA+ethanol groups. Immunohistochemical method showed the endothelial cells of PTZ+ethanol groups were more stained in compare to the other experimental groups.

Conclusion: Ethanol + PTZ cause cellular infiltration and damage to the cortical brain vessels although VPA reduces histological altheretions.

Keywords: Pentylenetetrazol, Valporic acid, Ethanol, Microvascular, Brain

---

*** Corresponding Author: Mohammad-Zadeh M (PhD), E-mail: Mohamad1353@gmail.com**

Received 30 April 2012 **Revised** 12 May 2013 **Accepted** 14 May 2013

This paper should be cited as: Golmohammadi R, Mohammad-Zadeh M, Pejhan A. [Effect of ethanol on microvascular alterations in the brain cortex of epileptic mice treated by valporic acid]. J Gorgan Uni Med Sci. 2013; 15(3): 32-38. [Article in Persian]