

اثر تزریق داخل بطنی ویتامین C بر ساختار بافتی شکنج دندانهای

هیپوکامپ موش‌های صحرایی صرعی شده

دکتر رحیم گل محمدی^{۱*}، بتول کمالی منش^۲

۱- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران. ۲- کارشناس مامایی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: هیپوکامپ یکی از نواحی مهم قشر مغز است که در صرع درگیر می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین اثر تزریق داخل بطنی ویتامین C بر ساختار بافتی شکنج دندانهای هیپوکامپ موش‌های صحرایی صرعی شده انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ به صورت تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. سه گروه پس از صرعی شدن با پنتیلین تترازول (PTZ)، دوزهای ۱۲/۵ mg/kg/bw، ۲۵ و ۵۰ از ویتامین C را به صورت تزریق داخل بطنی به مدت ۲۸ روز دریافت کردند. گروه چهارم پس از صرعی شدن با PTZ، سرم فیزیولوژی و گروه پنجم (سالم) سرم فیزیولوژی دریافت نمودند. حیوانات پس از گذراندن دوره درمان با داروی کتامین بی‌هوش شده و هیپوکامپ آنها خارج گردید. پس از باساز بافتی و مقطع‌گیری کروئال اسلایدها با هماتوکسیلین انوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری به‌طور تصادفی سیستماتیک چهل میدان انتخاب و شمارش نورون‌های شکنج دندانهای هیپوکامپ انجام گردید. تغییرات مورفولوژی با روش ایمونوهیستوشیمی ارزیابی شد.

یافته‌ها: میانگین تعداد نورون‌های سالم سلول‌های شکنج دندانهای هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه دریافت‌کننده ویتامین C به میزان ۲۵ mg/kg/bw، بیش از گروه‌های ۱۲/۵ mg/kg/bw و ۵۰ بود ($P < ۰/۰۵$). این میزان در گروه صرعی شده دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی کمتر از گروه سالم و نیز کمتر از گروه‌های تجربی بود ($P < ۰/۰۵$). تغییرات شدید در مورفولوژی سلول‌های شکنج دندانهای هیپوکامپ در موش‌های صحرایی گروه صرعی شده دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). کمترین تغییرات مورفولوژی در موش‌های صحرایی گروه دریافت‌کننده ویتامین C به میزان ۲۵ mg/kg/bw مشاهده گردید ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: تزریق داخل بطنی ویتامین C در موش‌های صحرایی صرعی شده با PTZ اثر حفاظتی بر روی نورون‌های شکنج دندانهای داشته و این اثر وابسته به دوز بود.

کلید واژه‌ها: هیپوکامپ، شکنج دندانهای، نورون، صرع، پنتیلین تترازول، ویتامین C، موش صحرایی

* نویسنده مسؤول: دکتر رحیم گل محمدی، پست الکترونیکی rahingolmohammadi@yahoo.com

نشانی: سبزوار، جنب پلیس راه، دانشکده پزشکی سبزوار، تلفن ۴۴۴۶۰۷۰-۰۵۱، شماره ۴۴۴۱۹۵۷۴

وصول مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۲۴، اصلاح نهایی: ۱۳۹۴/۴/۸، پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۷/۴

مقدمه

داروهای شیمیایی از جمله والپریک اسید در درازمدت دارای عوارض جانبی از جمله احتمال افزایش بیماری کبیدی است (۴). هرچند داروهای ضدصرع مثل sodium valoprate فراوانی وقوع تشنج‌ها را کم می‌کنند و در مواردی هم از بین می‌برند؛ ولی اگر این داروها در دوران بارداری توسط مادر مصرف شوند؛ سبب اثرات نابجا روی تکامل سیستم عصبی جنین می‌گردند و احتمال اختلال عملکردی و کاهش بهره هوشی جنین وجود دارد (۵). همچنین نوشیدن الکل در حیوانات صرعی شده تحت درمان با والپریک اسید موجب آسیب به عروق کوچک در سیستم عصبی مرکزی شده است (۶). مطالعه Galic و همکاران نشان داد تشنج و

صرع یک بیماری عصبی است که در کشورهای توسعه یافته کمتر از کشورهای توسعه نیافته است و شیوع آن به‌طور متوسط ۳/۲-۵/۵ در هزار کودک است (۱). حدود یک درصد از جامعه بالغین در جهان به صرع مبتلا هستند. در حالی که ۱۰ درصد از جمعیت یک جامعه تجربه‌ای از تشنج را در دوران زندگی از خود نشان می‌دهند (۲). با وجود تحقیقات گسترده در زمینه صرع هنوز دلایل کامل ایجاد تشنج مشخص نیست (۳). یکی از روش‌های مطالعه صرع در حیوانات آزمایشگاهی کیندلینگ است که معمولاً به روش شیمیایی ایجاد می‌شود (۳). کنترل بیماران صرعی با

گروه اول (صرعی شده): دریافت کننده ویتامین C با دوز ۱۲/۵ mg/kg/bw به صورت تزریق داخل بطنی به مدت ۲۸ روز.
گروه دوم (صرعی شده): دریافت کننده ویتامین C با دوز ۲۵ mg/kg/bw به صورت تزریق داخل بطنی به مدت ۲۸ روز.
گروه سوم (صرعی شده): دریافت کننده ویتامین C با دوز ۵۰ mg/kg/bw به صورت تزریق داخل بطنی به مدت ۲۸ روز.
گروه چهارم (صرعی شده): دریافت کننده سرم فیزیولوژی.
گروه پنجم (سالم): دریافت کننده سرم فیزیولوژی.

برای تزریق ویتامین C پس از بیهوشی موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلزین، حیوانات در دستگاه استریوتاکس فیکس شدند. برای پیدا کردن مشخصات بطن جانبی ابتدا پوست روی جمجمه از ناحیه بین دو چشم تا انتهای استخوان پس سری شکافته شد. پس از تعیین نقاط برگما و لاندبا استفاده از اطلسس پاکسینوس واتسون مختصات AP: -0.8mm و ML: +1.6 mm از برگما محاسبه و در محل ناحیه بطنی مشخص شده، کانول راهنما به طول ۳/۴ mm (تهیه شده از سر سوزن ۲۱) قرار داده شد و اطراف آن توسط آکریل و منومر دندانپزشکی پرشد تا به طور محکم و ثابت نگه داشته شود. تزریق ویتامین C بعد از ۵ روز ریکاوری به وسیله یک کانول تزریق ۲۷ Gauge که توسط یک رابط پلی اتیلنی به سرنگ همیلتون متصل بود؛ انجام شد (۲۰).

برای تزریق ویتامین C به داخل بطن جانبی از سرسوزن ۲۷ G دندانپزشکی به عنوان کانول تزریق و از سرسوزن ۲۲ G به عنوان کانول راهنما استفاده شد. پس از این که سرسوزن ۲۲ G به طول مناسب بریده شد؛ طول سرسوزن ۲۷ G به گونه‌ای اندازه‌گیری شد که پس از قرار گرفتن در کانول راهنما (۲۲ G) نوک آن به اندازه یک میلی‌لیتر از نوک کانول راهنما بلندتر بود. برای قرار گرفتن کانول تزریق در محل مورد نظر، کانول راهنما هنگام جراحی در فاصله یک میلی‌متر بالاتر از منطقه مورد نظر قرار گرفت و توسط سیمان دندانپزشکی ثابت شد. بعد از جراحی به منظور جلوگیری از ورود مواد خارجی به درون کانول راهنما از یک سرسوزن ۲۷ G دیگر استفاده شد که طول آن به نحوی تنظیم گردید که پس از قرار گرفتن در کانول راهنما، نوک آن هم سطح با سرسوزن ۲۲ G بود (۲۱).

موش‌های صحرایی پس از گذراندن دوره درمان ۴ هفته‌ای با کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلزین (۱۰ mg/kg) به صورت داخل صفاقی بیهوش شدند و پس از پرفیوژن سرم فیزیولوژی و فرمالدئید، هیپوکامپ حیوان با دقت خارج و در داخل محلول فیکساتیو قرار گرفت. پس از پاساژ بافتی مقطع‌گیری کرونال و سریال به صورت تصادفی از هیپوکامپ با میکروتوم انجام گردید. اسلایدها با هماتوکسیلین اتوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری

التهاب ناشی از پنتلین تترازول (Pentylentetrazol: PTZ) می‌تواند موجب آسیب نورونی شود (۷). ویتامین C یک نقش ضد اکسیدانی در متابولیسم داخل سلولی دارد. در مورد اثر ویتامین C بر روی فعالیت سلول‌های بدن اطلاعات مختلفی گزارش شده است (۸). بعضی گزارشات نشان می‌دهند ویتامین C اثرات حاد PTZ را در بروز مراحل تشنجی به تأخیر انداخته است (۹). مطالعه Santos و همکاران نشان داده ویتامین C با کاهش لیپید پروکسیداز و افزایش فعالیت کاتالاز یک نقش محافظتی برای نورون‌ها در تشنجات ناشی از پیلوکارپین دارد (۱۰). در همین راستا مشاهده شده ویتامین C تا حد اثرات تشنجی ناشی از صرع را بر روی نورون‌های لوب تمپورال کاهش می‌دهد (۱۱). ویتامین C در افزایش فعالیت ایمنی بدن و سمیت‌زدایی از بدن نقش دارد (۱۲). ویتامین C از طریق واسطه‌های عصبی بر روی حافظه و یادگیری اثر می‌گذارد (۱۳). ناحیه شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ قشر مغز از این نظر مهم است که نه تنها در حافظه کوتاه مدت نقش دارد؛ بلکه یک محل تولید نورن در بالغین است (۱۴). از نظر تشریح ناحیه‌ای شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ بخشی از لوب گیجگاهی است که در صرع لوب تمپورال در گیر می‌شود. لذا بررسی این ناحیه از نظر بالینی هم اهمیت ویژه‌ای دارد (۱۵). ناتوانی و مرگ و میر در بیماران مبتلا به صرع بیش از گروه‌های دیگر گزارش شده است (۱۶). تزریق داخل بطنی ویتامین C از طریق اثر بر روی نوروترانسمیترها می‌تواند بر روی یادگیری و حافظه فضایی اثر گذارد؛ به طوری که مقادیر کم و متوسط اسید آسکوربیک یادگیری فضایی را بهبود می‌بخشد؛ ولی دوز بالای آن یادگیری را مختل می‌کند (۱۷). نقش موثر ویتامین C بر عملکرد اعضای دیگر بدن گزارش شده است (۱۸). این مطالعه به منظور تعیین اثر تزریق داخل بطنی ویتامین C بر ساختار بافتی شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ موش‌های صحرایی صرع شده انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰ گرم تهیه شده از حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی سبزوار طی سال ۱۳۹۳ انجام شد.

پروتکل بین‌المللی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. موش‌ها در شرایط مناسبی از نظر دسترسی آزادانه به آب و غذا و روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته قرار داشتند.

برای صرع کردن (کیندل شدن) موش‌های صحرایی، پنتلین تترازول (PTZ) با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن هر ۴۸ ساعت یک بار به صورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق شد تا زمانی که هر حیوان ۳ تا ۴ بار مرحله ۵ تشنج را نشان داد (۱۲). حیوانات به طور تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی به شرح زیر تقسیم شدند (۱۰ و ۱۹).

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار تعداد نورون‌های سالم شکنج دندانهای هیپوکامپ موش‌های صحرایی صرعی شده با پنتلین ترازول دریافت کننده ویتامین C داخل بطنی و گروه صرعی شده و سالم دریافت کننده سرم فیزیولوژی

گروه‌ها	میانگین و انحراف معیار تعداد نورون‌های سالم	p-value
اول صرعی شده دریافت کننده ویتامین C دوز ۱۲/۵ mg/kg/bw	۸/۶۷۵۰±۲/۹۲۹۸۴	>۰/۰۵ با گروه سوم
دوم صرعی شده دریافت کننده ویتامین C دوز ۲۵ mg/kg/bw	۱۲/۲۷۵۰±۲/۷۳۶۱۵	<۰/۰۵ با گروه اول و سوم
سوم صرعی شده دریافت کننده ویتامین C دوز ۵۰ mg/kg/bw	۸/۵۷۵۰±۲/۷۶۳۲۰	>۰/۰۵ با گروه اول
چهارم صرعی شده دریافت کننده سرم فیزیولوژی	۶/۶۰۰±۲/۱۲۱۹۲	<۰/۰۰۱ با گروه دوم و پنجم
پنجم سالم دریافت کننده سرم فیزیولوژی	۱۴/۴۲۵۰±۳/۴۲۶۰۵	>۰/۰۰۱ با گروه اول و دوم و سوم و چهارم

شدند.

یافته‌ها

نتایج شمارش سلولی شکنج دندانهای هیپوکامپ: میانگین تعداد نورون‌های سالم سلول‌های شکنج دندانهای هیپوکامپ موش‌های صحرایی گروه دوم (دریافت کننده ویتامین C به میزان ۲۵ mg/kg/bw)، بیش از گروه‌های اول و سوم بود ($P < 0/001$). میانگین تعداد سلول‌های سالم شکنج دندانهای هیپوکامپ گروه اول (دریافت کننده ویتامین C به میزان ۱۲/۵ mg/kg/bw) در مقایسه با گروه سوم (دریافت کننده ویتامین C به میزان ۵۰ mg/kg/bw) از نظر آماری معنی‌دار نبود. میانگین تعداد سلول‌های سالم شکنج دندانهای هیپوکامپ گروه چهارم (صرعی شده دریافت کننده سرم فیزیولوژی) کمتر از گروه پنجم (سالم) ($P < 0/05$) و نیز کمتر از گروه‌های اول و دوم و سوم بود ($P < 0/05$) (جدول یک).

نتایج مورفولوژی و ایمونوهیستوشیمی: تغییرات مورفولوژی مانند متراکم شدن هسته، پیکنوتیک شدن، تغییر مکان هسته از مرکز به محیط، مشخص نبودن محدوده هسته از سیتوپلاسم و اسیدوفیلی زیاد سلول‌های شکنج دندانهای هیپوکامپ در موش‌های صحرایی گروه چهارم (صرعی شده دریافت کننده سرم فیزیولوژی) مشاهده شد ($P < 0/001$) که احتمالاً نشان‌دهنده مرگ فیزیولوژی سلول‌های شکنج دندانهای هیپوکامپ ناشی از پنتلین ترازول است.

کمترین تغییرات مورفولوژی یعنی کاهش اسیدوفیلی سیتوپلاسم و کاهش متراکم شدن هسته سلول شکنج دندانهای هیپوکامپ در موش‌های صحرایی گروه دوم (دریافت کننده ویتامین C به میزان ۲۵ mg/kg/bw) مشاهده شد ($P < 0/05$) (شکل یک).

رنگ‌پذیری قهوه‌ای هسته سلول‌های شکنج دندانهای هیپوکامپ گروه اول (دریافت کننده ویتامین C به میزان ۱۲/۵ mg/kg/bw) و گروه سوم (دریافت کننده ویتامین C به میزان ۵۰ mg/kg/bw) بیش از گروه دوم بود. بیشترین رنگ‌پذیری هسته

Motic و نرم‌افزار Advanced motic plus2 با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر، چهل میدان دید میکروسکوپی (۱۰ لام از هر گروه و ۴ میدان از هر لام) به صورت تصادفی سیستماتیک انتخاب شد و تصویر گرفته شد. سپس شمارش نورون‌های سالم و شکنج دندانهای توسط دونفر به صورت مجزا از یکدیگر (دو سوکور) به ابعاد $8 \times 8 \text{ mm}^2$ شمارش و ثبت گردید. در نورون‌های سالم هسته عموماً در موقعیت مرکزی پریکاریون قرار دارد؛ پیکنوتیک نیست و سیتوپلاسم اسیدوفیلی طبیعی و مناسب دارد (۶).

پس از مقطع گیری ۵ میکرونی از ناحیه قشر هیپوکامپ با میکروتوم بر روی تعداد محدودی از لام‌های تهیه شده از گروه‌های صرعی شده تحت درمان با ویتامین C و گروه صرعی نشده رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین انجام شد. مراحل انجام کار، دما و غلظت‌های آنتی‌بادی بر طبق دستور کیت (Roche) انجام گردید. بدین ترتیب که پس از پارافین‌زدایی نمونه‌ها با گزلیل، ماسک‌زدایی محل شاخص‌های آنتی ژنیک با میکروویو بافر سترات انجام شد. برای مهار فعالیت اندوژن پراکسیداز به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ۳ درصد آب اکسیژنه قرار داده شد و مجدداً لام‌ها با بافر فسفات سالین شستشو داده شدند. با آنتی‌بادی اولیه Biotinylated (rabbit anti-cleaved caspase 3 antibody) روی لام‌ها چکانده شد و پس از سه بار شستشو با آب مقطر آنتی‌بادی ثانویه روی لام‌ها چکانده شد. از استرپتو آویدین متصل به HRP که قادر است دی‌آمینو بنزیدین را اکسید کند؛ با استفاده از روش معمول آویدین - بیوتین - ایمونوپراکسیداز برای رنگ‌آمیزی هسته استفاده گردید و با میکروسکوپ نوری (Motic ساخت اسپانیا) بررسی و تصویربرداری شد (۲۲ و ۲۳).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16 و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه با استفاده از تست‌های Dunnett برای مقایسه میانگین گروه‌های تجربی با شاهد و تست Duncan برای میانگین داخل گروه‌های تجربی در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل

بحث

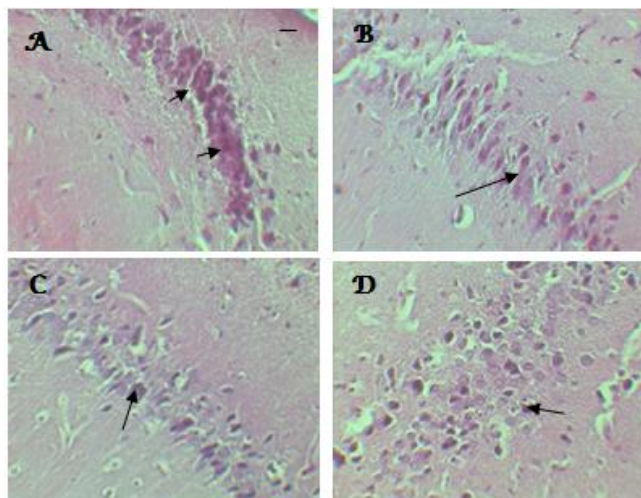
با توجه به نتایج مطالعه حاضر میانگین تعداد نورون‌های سالم شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ در موش‌های صحرایی صرعی شده دریافت کننده ویتامین C به‌طور معنی‌داری بیشتر از موش‌های صحرایی صرعی شده دریافت کننده سرم فیزیولوژی بود.

ویتامین C پس از تشنجات با پنتلین تترازول، نقش حفاظتی-عصبی دارد. به طوری که پیش‌درمانی با ویتامین C دوره تأخیری را برای شروع تشنجات اولیه افزایش می‌دهد (۲۴). در مطالعه حاضر میانگین سلول‌های سالم شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ در موش‌های صحرایی بالغ نر صرعی شده دریافت کننده ویتامین C بیشتر از گروهی بود که به جای ویتامین C، سرم فیزیولوژی دریافت نمودند. شاید افزایش میانگین سلول‌های سالم در حیوانات صرعی شده دریافت کننده ویتامین C ناشی از خاصیت ضد اکسیدانی و ضد التهابی ویتامین C بوده باشد. به طوری که توانسته تا حد زیادی مضرات پنتلین تترازول را بر روی سلول‌های سالم شکنج دندانه‌ای به تاخیر اندازد.

ویتامین C موجب کاهش واکنش‌های استرسی در سلول و کاهش آسیب DNA، TNF-a و انترلوکین ۶ می‌شود (۱). در مطالعه حاضر میانگین تعداد سلول‌های سالم شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ در دوز ۲۵ mg/kg ویتامین C از دوز ۱۲/۵ mg/kg و ۵۰ mg/kg بیشتر بود. بنابراین می‌توان گفت دوز ۲۵ mg/kg برای کاهش اثرات پنتلین تترازول بر روی سلول‌های شکنج دندانه‌ای لازم است تا نتیجه مطلوب به‌دست آید. در مطالعه Manjula و همکاران تزریق ویتامین C در موش‌هایی که تحت تاثیر سرما قرار داشتند؛ یک نقش محافظتی داشت و این اثر از طریق تنظیم چندین آنزیم داخل سلولی از جمله کاتالاز، سوپرا اکسیداز و دسموتاز موجب می‌شود (۲۵). نتیجه مطالعه حاضر با تحقیق فوق همخوانی دارد؛ هرچند روش مطالعه متفاوت بود.

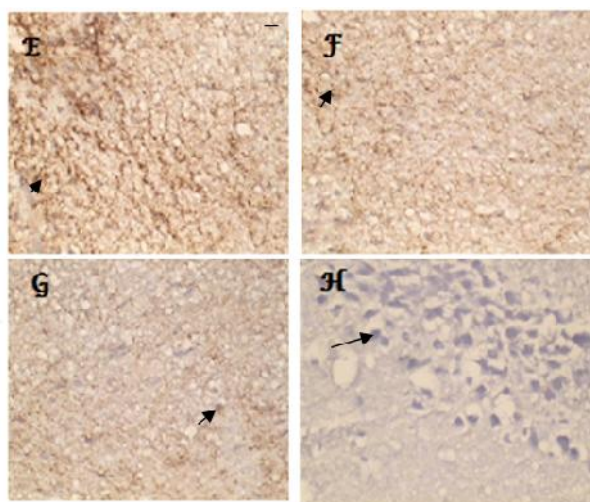
ناحیه شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ از این نظر مهم است که نه تنها در حافظه کوتاه‌مدت فعال است؛ بلکه جزء نواحی محدودی از مغز فرد بالغ است که در نورون‌زایی نقش دارد. در فرآیند مرگ سلول‌های دایمی یا نورونی که منجر به تشکیل اجسام آپوپتیک و تغییر موقعیت هسته در سلول می‌شود؛ عوامل سلولی و مولکولی زیادی نقش دارند. به طوری که چندین ژن فعال می‌شوند و ژن P53 یکی از مهم‌ترین این ژن‌ها است که بر فعالیت و بیان چندین ژن دیگر اثر می‌گذارد (۲۶ و ۲۷). در مطالعه حاضر کاهش معنی‌داری بین تعداد نورون‌های سالم شکنج دندانه‌ای در موش‌های صحرایی صرعی شده در مقایسه با گروه صرعی نشده (سالم) مشاهده شد. این کاهش می‌تواند احتمالاً ناشی از اثرات پنتلین تترازول باشد که برای کیندل شدن موش‌های صحرایی استفاده شد و به‌طور مستقیم و یا

در سلول‌های شکنج دندانه‌ای موش‌های صحرایی گروه چهارم مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۱: رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین سلول‌های شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ (بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر)

A: متراکم شدن هسته و اسیدوفیلی زیاد سیتوپلاسم در سلول‌های شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ در گروهی از موش‌های صحرایی صرعی شده با پنتلین تترازول با پیکان مشخص شده است؛
B: موش‌های صحرایی صرعی شده دریافت کننده دوز ۱۲/۵ mg/kg/bw از ویتامین C به صورت داخل بطنی؛ C: موش‌های صحرایی صرعی شده دریافت کننده دوز ۵۰ mg/kg/bw از ویتامین C به صورت داخل بطنی؛ D: شکنج دندانه‌ای موش‌های صحرایی صرعی شده دریافت کننده دوز ۲۵ mg/kg/bw از ویتامین C به صورت داخل بطنی.



شکل ۲: رنگ‌آمیزی اختصاصی ایمونوهیستوشیمی مقطع کرونال ۵ میکرونی بافت مغزی نورون‌های شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ (بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر)

پیکان‌ها تغییرات رنگ‌پذیری هسته را در گروه‌های مورد مطالعه در موش‌های صحرایی نر بالغ صرعی شده نشان می‌دهد؛ E: موش‌های صحرایی صرعی شده با پنتلین تترازول؛ F: موش‌های صحرایی صرعی شده دریافت کننده دوز ۵۰ mg/kg/bw از ویتامین C به صورت داخل بطنی؛ G: موش‌های صحرایی صرعی شده دریافت کننده دوز ۲۵ mg/kg/bw از ویتامین C به صورت داخل بطنی؛ H: موش‌های صحرایی صرعی نشده (سالم)

بیماران مبتلا به صرع منجر به افزایش خطر و کاهش عمر مفید آنها می شود (۳۱). با توجه به این که درصدی از جامعه جهانی مبتلا به صرع هستند؛ پیشنهاد می شود مطالعات سلولی و مولکولی بیشتری از ویتامین C بر روی سیستم عصبی مرکزی حیوانات صرعی شده با پنتلین ترازول انجام گردد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق داخل بطنی ویتامین C در موش های صحرایی صرعی شده با PTZ اثر حفاظتی بر روی نورون های هیپوکامپ داشته و این اثر وابسته به دوز است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۹۶۳۴/۱۲۲ پ/ژ) معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی سبزوار بود. بدین وسیله از جناب آقای دکتر حسن رخشانی به خاطر انجام آنالیز آماری سپاسگزاری می گردد.

References

1. Camfield P, Camfield C. Incidence, prevalence and aetiology of seizures and epilepsy in children. *Epileptic Disord.* 2015 Jun; 17(2):117-23. doi: 10.1684/epd.2015.0736
2. Sankaraneni R, Lachhwani D. Antiepileptic drugs--a review. *Pediatr Ann.* 2015 Feb; 44(2):e36-42. doi: 10.3928/00904481-20150203-10
3. Morleo M, Woolfall K, Dedman D, Mukherjee R, Bellis MA, Cook PA. Under-reporting of foetal alcohol spectrum disorders: an analysis of hospitalepisode statistics. *BMC Pediatrics.* 2011; 11:14. doi: 10.1186/1471-2431-11-14
4. Farinelli E, Giampaoli D, Cenciari A, Cercado E, Verrotti A. Valproic acid and nonalcoholic fatty liver disease: A possible association? *World J Hepatol.* 2015 May; 7(9): 1251-57.
5. Bromley R, Weston J, Adab N, Greenhalgh J, Sanniti A, McKay AJ, et al. Treatment for epilepsy in pregnancy: neurodevelopmental outcomes in the child. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Oct; 10: CD010236. doi: 10.1002/14651858.CD010236.pub2
6. Golmohammadi R, Pejhan A, Azhdari-Zarmehri H, Mohammad-Zadeh M. The role of ethanol on the anticonvulsant effect of valproic acid and cortical microvascular changes after epileptogenesis in mice. *Neurol Sci.* 2013 Jul; 34(7):1125-31. doi: 10.1007/s10072-012-1190-y
7. Galic MA, Riaz K, Heida JG, Mouihate A, Fournier NM, Spencer SJ, et al. Postnatal inflammation increases seizure susceptibility in adult rats. *J Neurosci.* 2008 Jul; 28(27): 6904-13. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1901-08.2008
8. Chen Y, Luo G, Yuan J, Wang Y, Yang X, Wang X, et al. Vitamin C mitigates oxidative stress and tumor necrosis factor-alpha in severe community-acquired pneumonia and LPS-induced macrophages. *Mediators Inflamm.* 2014; 426740. doi: 10.1155/2014/426740
9. González-Ramírez M, Razo-Juárez LI, Sauer-Ramírez JL, González-Trujano ME, Salgado-Ceballos H, Orozco-Suarez S. Anticonvulsive effect of vitamin C on pentylenetetrazol-induced seizures in immature rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010 Dec; 97(2):267-72. doi: 10.1016/j.pbb.2010.08.009
10. Santos LF, Freitas RL, Xavier SM, Saldanha GB, Freitas RM.

غیرمستقیم موجب کاهش نورون های شکنج دندانهای گردید. کاهش تعداد نورون های سالم به هر عللی که ایجاد شود؛ از نظر بالینی مهم است. زیرا مقدمه ای بر افزایش بیماری های عصبی است (۲۸). در مطالعه Tveden-Nyborg و همکاران بر روی هیپوکامپ کبوتران نشان داد کاهش کمبود ویتامین C فرآیند نورون زایی را مختل می کند (۲۹). مطالعه حاضر با تحقیق فوق همخوانی دارد؛ هر چند روش این مطالعه با پژوهش فوق تفاوت داشت. مطالعه Naseer و همکاران روی موش های صحرایی نشان داد نورون های پرناتال هیپوکامپ به پنتلین ترازول حساس هستند و تغییرات دژنراتیو را نشان می دهند که می تواند ناشی از مرگ نورون ها و یا کاهش تولید نورون ها از نوروبلاست ها باشد (۳۰). نتایج این مطالعه با پژوهش فوق همخوانی دارد؛ هر چند روش مطالعه حاضر با تحقیق فوق تفاوت داشت.

کاهش تعداد نورون های سالم ناشی از داروهای شیمیایی در

Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008 Mar; 89(1):1-5.

11. Sawicka-Glazer E, Czuczwar SJ. Vitamin C: a new auxiliary treatment of epilepsy? *Pharmacol Rep.* 2014 Aug; 66(4):529-33. doi: 10.1016/j.pharep.2014.02.016

12. Chambial S, Dwivedi S, Shukla KK, John PJ, Sharma P. Vitamin C in disease prevention and cure: an overview. *Indian J Clin Biochem.* 2013 Oct; 28(4):314-28. doi: 10.1007/s12291-013-0375-3

13. Kesner RP. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn Mem.* 2007 Nov; 14(11):771-81.

14. Genin EC, Caron N, Vandenbosch R, Nguyen L, Malgrange B. Concise review: forkhead pathway in the control of adult neurogenesis. *Stem Cells.* 2014 Jun; 32(6):1398-407. doi: 10.1002/stem.1673

15. Tóth K, Maglóczy Z. The vulnerability of calretinin-containing hippocampal interneurons to temporal lobe epilepsy. *Front Neuroanat.* 2014 Sep; 8:100. doi: 10.3389/fnana.2014.00100

16. Robertson J, Hatton C, Emerson E, Baines S. Mortality in people with intellectual disabilities and epilepsy: A systematic review. *Seizure.* 2015 Jul; 29:123-33. doi: 10.1016/j.seizure.2015.04.004

17. Esmailpour K, Abbasnejad M, Esmaili Mahani S, Masomi Ardakani Y. The effect of intrahippocampal injection of ascorbic acid on spatial learning and memory in adult male rats. *Physiol Pharmacol.* 2010; 13 (4) :353-61

18. Chen S, Roffey DM, Dion CA, Arab A, Wai EK. Effect of perioperative Vitamin C supplementation on postoperative pain and the incidence of chronic regional pain syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Clin J Pain.* 2016 Feb; 32(2):179-85. doi: 10.1097/AJP.0000000000000218

19. Golmohammadi R, Kamalimanesh B. [Protective effect of ascorbic acid on histology of purkinje neurons of cerebellum in pentylenetetrazol-induced epileptic rats]. *J Mazandaran Univ Med Sci.* 2015; 25(123): 45-53. [Article in Persian]

20. Majlessi N, Kadkhodae M, Parviz M, Naghdi N. Serotonin

depletion in rat hippocampus attenuates L-NAME-induced spatial learning deficits. *Brain Res.* 2003 Feb; 963 (1-2): 244-51. doi: 10.1016/S0006-8993(02)03987-2

21. Ghiasi S, Vaezi Gh, Keramati K. [Effects of intracerebroventricular injection of alcoholic extract of hypericum perforatum on fear behavior in presence pentylenetetrazole (PTZ) in adult male rat]. *J Ilam Univ Med Sci.* 2010; 17(4): 36-44. [Article in Persian]

22. Gown AM, Willingham MC. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem.* 2002 Apr; 50(4):449-54.

23. Ansorg A, Bornkessel K, Witte OW, Urbach A. Immunohistochemistry and multiple labeling with antibodies from the same host species to study adult hippocampal neurogenesis. *J Vis Exp.* 2015 Apr; (98). doi: 10.3791/52551

24. Naseer MI, Ullah I, Ullah N, Lee HY, Cheon EW, Chung J, et al. Neuroprotective effect of vitamin C against PTZ induced apoptotic neurodegeneration in adult rat brain. *Pak J Pharm Sci.* 2011 Jul; 24(3):263-8.

25. Manjula KR, Subramanyam MV, Asha Devi S. Protection against oxidative stress caused by intermittent cold exposure by combined supplementation with vitamin E and C in the aging rat hypothalamus. *Neurochem Res.* 2013 Apr; 38(4):876-85. doi: 10.1007/s11064-013-0993-4

26. Nikbakht Dastjerdi M, Salahshoor MR, Mardani M, Rabbani M, Hashemibeni B, Gharagozloo M, et al. The apoptotic effects of sirtuin1 inhibitor on the MCF-7 and MRC-5 cell lines. *Res Pharm Sci.* 2013 Apr-Jun; 8(2): 79-89.

27. Golmohammadi R, Namazi MJ, Nikbakht M, Salehi M, Derakhshan MH. Characterization and prognostic value of mutations in exons 5 and 6 of the p53 gene in patients with colorectal cancers in central Iran. *Gut Liver.* 2013 May; 7(3):295-302. doi: 10.5009/gnl.2013.7.3.295

28. Goh KJ, Tian S, Shahrizaila N, Ng CW, Tan CT. Survival and prognostic factors of motor neuron disease in a multi-ethnic Asian population. *Amyotroph Lateral Scler.* 2011 Mar; 12(2):124-9. doi: 10.3109/17482968.2010.527986

29. Tveden-Nyborg P, Vogt L, Schjoldager JG, Jeannot N, Hasselholt S, Paidi MD, et al. Maternal vitamin C deficiency during pregnancy persistently impairs hippocampal neurogenesis in offspring of guinea pigs. *PLoS One.* 2012; 7(10):e48488. doi: 10.1371/journal.pone.0048488

30. Naseer MI, Ullah N, Ullah I, Koh PO, Lee HY, Park MS, Kim MO. Vitamin C protects against ethanol and PTZ-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat hippocampal neurons. *Synapse.* 2011 Jul; 65(7):562-71. doi: 10.1002/syn.20875

31. Tseng YL, Huang CR, Lin CH, Lu YT, Lu CH, Chen NC, et al. Risk factors of hyperammonemia in patients with epilepsy under valproic acid therapy. *Medicine (Baltimore).* 2014 Sep; 93(11): e66. doi: 10.1097/MD.0000000000000066

Original Paper

Effect of interaventricular injection of Vitamin C on the histological structural of dentate gyrus of hippocampus in epileptic rats

Golmohammadi R (Ph.D)*¹, Kmalimansh B (B.Sc)²

¹Associate Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzvar, Iran. ²Miswifer, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzvar, Iran.

Abstract

Background and Objective: Hippocampus is the main region in cortex of the brain that involved in epilepsy. This study was done to determine the effect of intraventricular injection of vitamin C on histological structure of dentate gyrus of hippocampus in adult male epileptic rats.

Methods: In this experimental study, 40 adult male rats were randomly allocated into 5 groups (n=8). Animals in three groups were received vitamin C at dose (12.5, 25 and 50 mg/kg/bw) during 28 days, intraventricularly after were kindled by (pentylentetrazol; 40 mg/kg). Animals in fourth group were received normal saline after were kindled by (pentylentetrazol; 40 mg/kg). Animals in the fifth group were received normal saline. After 28 days, rats were anesthetized by ketamin, then structure of hippocampus dissected. Histological passage was done in samples and coronal section was carried out. The sections of samples were stained by Hematoxyline-eosin. Forty fields systematically were counted the normal neurons in dentate gyrus. Morphological change was determined by immunohistochemical method.

Results: The mean number of normal neurons in dentate gyrus in epileptic rats which received 25 g/kg vitamin C was more than animals in groups which were received doses of 12.5, 25 and 50 mg/kg vitamin C (P<0.05). This mean number of normal neurons in dentate gyrus of hippocampus in epileptic rats which received normal saline was lower than control and other experimental groups (P<0.05). Extensive morphological change in neurons of dentate gyrus in epileptic rats which received normal saline were observed (P<0.05). The lowest morphological change were observed in neurons of dentate gyrus in epileptic rats which received at dose 25 mg/kg vitamin C in compared to the other groups (P<0.05).

Conclusion: Intraventricular injection of vitamin C in epileptic rat's dose dependly had neuroprotective effect on dentate gyrus neurons.

Keywords: Hippocampus, Dentate gyrus, Neuron, Epilepsy, Pentylentetrazol, Vitamin C, Rat

* **Corresponding Author:** Golmohammadi R (Ph.D), E-mail: rahimgolmohammadi@yahoo.com

Received 15 Mar 2015

Revised 29 Jun 2015

Accepted 26 Sep 2015