

## Enriched Environment Protects Against Seizures, and Associated Anxiety and Cognitive Impairment in Mouse

Zeraati M\*<sup>1</sup>, Mosaferi B<sup>2</sup>

1. Physiology and Pharmacology Department, Faculty of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

2. Department of Basic Sciences, School of Nursing and Midwifery, Maragheh University of Medical Sciences, Maragheh, Iran.

*Corresponding author.* Tel: +989122454174, Fax: 02634287311, E-mail: maryamzeraati@gmail.com

Received: Apr 7, 2021

Accepted: Jun 20, 2021

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Epilepsy is one of the most common problems in the health system, of which some cases are resistant to treatment. Recently, environmental enrichment has shown beneficial results in the recovery of some cases of epilepsy.

**Methods:** Male mice were reared in an enriched or normal medium during their growth period. To induce seizures, at adult age, each group was divided into two subgroups, which one of them received pentylentetrazole eleven times, with two days interval.

**Results:** The enriched environment greatly reduced seizure behaviors and prevented the occurrence of anxiety-like behavior and cognitive disorders. It also prevented an increase in the inflammatory cytokine of TNF- $\alpha$  in the hippocampus .

**Conclusion:** Therefore, a suitable growth environment in childhood and adolescence can be useful in preventing seizure disorders in adulthood.

**Keywords:** Epilepsy; Child Rearing; Cognitive Dysfunction; Tumor Necrosis Factor-alpha

# محیط غنی‌سازی شده باعث محافظت در برابر تشنج، اضطراب و اختلالات شناختی همراه آن در موش آزمایشگاهی می‌شود

مریم زراعتی<sup>۱\*</sup>، بلال مسافری<sup>۲</sup>

۱. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

۲. گروه علوم پایه، دانشکده پرستاری مامایی، دانشکده علوم پزشکی مراغه، مراغه، ایران

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۲۲۴۵۴۱۷۴ فاکس: ۰۲۶۳۴۲۸۷۳۱۱ پست الکترونیک: maryamzeraati@gmail.com

## چکیده

**زمینه و هدف:** صرع یکی از مشکلات شایع در حوزه سلامت است که برخی از انواع آن مقاوم به درمان هستند. اخیراً غنی‌سازی محیطی در بهبودی برخی موارد صرع نتایج مفیدی نشان داده‌است.

**روش کار:** موش‌های آزمایشگاهی نر در دوران رشد خود، در محیط غنی‌سازی شده و یا محیط معمولی پرورش یافتند و در سن بلوغ هر گروه به دو زیرگروه تقسیم شده که یکی از هر کدام از آنها جهت ایجاد رفتارهای تشنجی، یازده مرتبه با فاصله زمانی دو روزه تحت تیمار پنتیلن-تترازول قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** محیط غنی‌سازی شده تا حدود زیادی باعث کاهش رفتارهای تشنجی شده و از بروز رفتارهای اضطرابی و اختلالات شناختی تحت آن شرایط جلوگیری کرد. همچنین از افزایش سیتوکین التهابی TNF- $\alpha$  در هیپوکمپ نیز جلوگیری کرد.

**نتیجه‌گیری:** محیط رشد مناسب دوران کودکی و نوجوانی می‌تواند در جلوگیری و محافظت از اختلالات تشنج در سنین بلوغ مفید واقع شود.

**واژه‌های کلیدی:** صرع، محیط رشد کودک، اختلال شناختی، TNF- $\alpha$

دریافت: ۱۴۰۰/۱/۱۸ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۳۰

## مقدمه

بیماری صرع یکی از مشکلات اساسی در حوزه سلامت می‌باشد که شیوع سالانه آن در سراسر جهان حدود ۷۰ میلیون نفر می‌باشد [۱]. برخی از انواع این بیماری در برابر درمان نیز مقاوم هستند [۲]. اخیراً گزارشات امیدبخشی از اثرات روش‌های درمانی جدید همچون بهره‌گیری از شرایط محیط پیرامونی کم‌استرس و غنی از محرکات گوناگون سیستم عصبی در تحقیقات بالینی و آزمایشگاهی دیده شده‌است [۲،۳]. محیط غنی‌شده در خصوص حیوانات آزمایشگاهی عبارت است از قفس‌های بزرگتر با تعدادی از وسایل بازی

مثل نردبان و لوله‌های پلاستیکی همراه با حیوانات هم‌قفس به تعداد بیشتر از حد معمول که باعث تحریک سیستم عصبی می‌شود [۴]. بیماری صرع معمولاً با اختلالات دیگر رفتاری مثل اضطراب و مشکلات شناختی نیز همراه می‌باشد [۵،۶]. از طرفی هیپوکمپ طبق تحقیقات پیشین یکی از نواحی مغزی است که در بیماری صرع معمولاً تحت تاثیر قرار می‌گیرد [۷،۸]. بعلاوه، محیط غنی‌سازی شده نیز بر این ناحیه اثرات ژرفی می‌گذارد [۸،۹]. مشخص شده‌است که التهاب در مغز می‌تواند در ایجاد تشنج دخیل باشد [۱۰،۱۱]. بطور کلی برخی

تشنج‌زا، اختلالات رفتارهای اضطرابی و شناختی همراه آن و نیز افزایش TNF- $\alpha$  در هیپوکمپ مقاومت کنند؟

### روش کار

در این مطالعه تجربی، موش‌های نژاد NMRI جنس نر و ماده با سن تقریبی ۸۰-۷۰ روزه از انستیتو اختلالات شناختی و رفتاری سالاری (SICBD) تهیه و در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای  $23 \pm 1$  درجه سانتیگراد در همان مرکز نگهداری شدند. آب و غذای کافی در اختیار آنها قرار گرفت. پس از دو هفته سازگاری با محیط، یک جفت موش نر و ماده برای جفت‌گیری در یک قفس قراردادده شد. سپس روز اول بارداری با بررسی پلاک واژینال روزانه تعیین گردید. سپس هر موش باردار به یک قفس منفرد منتقل شد. زاده‌ها در روز ۲۱ پس از تولد از شیر گرفته شده و جنس نرها به تعداد ۴۸ عدد جهت مطالعه در دو شرایط محیطی متفاوت نگهداری شدند که ذیلاً بطور مفصل شرح داده می‌شوند.

### محیط غنی‌سازی شده

فرزندان نر پس از رسیدن به سن ۲۱ روزگی به تعداد ۴۸ سر در دو محیط متفاوت: (۱) استاندارد، و (۲) غنی‌شده تا سن بلوغ (۱۲۰ روزگی) نگهداری شدند. محیط غنی‌شده متشکل از قفس‌های بزرگتر از حد معمول به ابعاد  $58 \times 38 \times 20$  سانتیمتر بوده که هر یک دارای دو چرخ دوار و برخی محرک‌ها مثل نردبان و تونل پلاستیکی سفت و الیاف کتان برای لانه‌سازی بودند [۱۸]. قفس‌های معمولی دارای ابعاد  $27 \times 21 \times 13$  سانتیمتر بوده و صرفاً حاوی الیاف کتان لانه‌سازی بودند. قابل ذکر است که حیوانات پس از انجام آزمایشات مربوطه به قفس خودشان (استاندارد یا غنی‌شده) بازگردانده می‌شدند.

محققان توانسته‌اند که با کمک عوامل ضدالتهابی در درمان نوعی صرع کودکان مقاوم به دارو موفقیت‌هایی کسب کنند [۱۱]. برخی مطالعات قبلی پیشنهاد کرده‌اند که سیتوکین التهابی TNF- $\alpha$  در این بین نقش مهمی بازی می‌کند [۱۲].

با اینکه مطالعات نشان داده‌اند که محیط غنی‌سازی شده می‌تواند حیوانات با آسیب دیدگی مغزی را در برابر خطر بروز رفتارهای تشنجی محافظت کند [۲]، ولی برخی مطالعات نشان داده‌اند که مواجهه با محیط غنی در برخی مراحل ایجاد اختلالات تشنجی ممکن است باعث وخیم‌تر شدن این اختلالات شود [۱۳]. بعلاوه، محققان در اکثر مطالعات، ابتدا تشنج یا آسیب مغزی را ایجاد کرده‌اند و سپس به دنبال اثر التیام‌بخشی محیط غنی‌سازی شده رفته‌اند [۱۴-۱۷]. یک راهکار مقابله با اختلالات صرع می‌تواند اینگونه باشد که بتوان از قبل افراد را در مقابل شرایط تشنج‌زا مقاوم کرد. خصوصاً با توجه به اثرات بسیار مفیدی که غنی‌سازی محیطی در دوران رشد کودکی و نوجوانی بر روی مغز و قابلیت مقابله با شرایط تشنج‌زا می‌گذارد [۱۵، ۱۸].

از طرفی، محققین مطالعه حاضر در مطالعه قبلی خود نشان داده‌اند که موش‌های جنس نر مواجهه شده با عفونت مادر در دوران جنینی نسبت به ایجاد اختلالات تشنجی در سنین بلوغ آسیب پذیرتر از جنس ماده هستند و محیط غنی‌شده توانست فرزندان را تا حدودی در برابر این خطر محافظت نماید. با توجه به نقش موثر جنسیت در میزان آسیب‌پذیری در برابر عوامل تشنج‌زا و خصوصاً بروز اختلالات رفتاری همراه آن بایستی توجه ویژه‌ای به متغیر جنسیت شود و جنس‌های نر و ماده بصورت مجزا بررسی شوند [۱۹]. بنابر جمیع موارد مذکور محققین در مطالعه حاضر به دنبال این هدف بودند که آیا موش‌های جنس نر که دوران حساس نوجوانی خود را در یک محیط غنی همراه با محرکات گوناگون سپری کرده‌اند، می‌توانند در برابر خطر ایجاد اختلالات تشنجی تحت شرایط

### القای صرع و بررسی علائم رفتاری آن

حیوانات نگهداری شده در هر دو محیط در سن بلوغ ۱۲۱ روزگی به دو زیرگروه به تعداد حیوان مساوی (n=12) تقسیم شدند: گروه آب (Water) و گروه پنتیلن-تترازول (PTZ)<sup>۱</sup>. بنابراین تعداد گروه‌ها در نهایت به ۴ عدد و هر کدام حاوی ۱۲ حیوان رسید که بطور خلاصه عبارت بودند از: ۱) پرورش یافته در قفس معمولی (Normal) بعلاوه تزریق سالیین بر صفاق (Water)<sup>۲</sup>؛ ۲) پرورش یافته در قفس معمولی (Normal) بعلاوه تزریق پنتیلن-تترازول بر صفاق (PTZ)<sup>۳</sup>؛ ۳) پرورش یافته در قفس غنی‌سازی شده (Enriched) بعلاوه تزریق سالیین بر صفاق (Water)<sup>۴</sup>؛ ۴) پرورش یافته در قفس غنی‌سازی شده (Enriched) بعلاوه تزریق پنتیلن-تترازول بر صفاق (PTZ)<sup>۵</sup>. هر یک از حیوانات موجود در هر گروه فقط متعلق به یک جفت والد بودند.

به منظور القای تشنج در گروه‌های PTZ از پنتیلن-تترازول محلول در آب مقطر با دوز ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در ۲۰۰ μl هر دو روز یکبار در مجموع به تعداد ۱۱ تزریق صفاقی (طی ۲۲ روز) استفاده شد [۲۰]. به گروه مقابل صرفاً ۲۰۰ μl سالیین تزریق شد. بمنظور ارزیابی شدت تشنج پس از تزریق PTZ به مدت ۳۰ دقیقه شاخص‌های رفتاری زیر طبق مطالعات قبلی [۲۰] بررسی شدند. مرحله صفر: فاقد علائم، مرحله ۱: انقباض‌هایی در گوش و صورت، مرحله ۲: تکانه‌های انقباضی عضلات محوری، مرحله ۳: تکانه‌های انقباضی همراه با لرزش، مرحله ۴: افتادن به پهلو حین دویدن و پریدن، مرحله ۵: افتادن به پشت به همراه تشنج‌های سراسری، مرحله ۶: مرگ. مرحله ۱ بیانگر کمترین و مرحله ۵ بیانگر شدیدترین

عمق تشنج می‌باشند. میزان تاخیر زمانی تا شروع علائم نیز ثبت گردید.

### سنجش رفتارهای شبه اضطرابی با Open field

سنجش رفتارهای شبه اضطرابی در ۱۲۸ روزگی و طبق مطالعات پیشین انجام شد [۲۱]. ماز این تست متشکل از یک جعبه سفید (۴۰×۴۰×۲۰ سانتیمتر) تقسیم شده به نواحی مرکزی (۴ مربع ۱۰×۱۰) و پیرامونی (۱۲ مربع ۱۰×۱۰) است. هر حیوان برای ۵ دقیقه در ناحیه وسط ماز رهامی شد. مدت زمان سپری شده در ناحیه مرکزی و دفعات ورود به آن ناحیه بعنوان شاخص ضداضطرابی لحاظ می‌شد. تعداد عبورها از کل خطوط نیز به عنوان شاخص میزان فعالیت حرکتی لحاظ می‌شد [۲۲].

### سنجش توانایی‌های شناختی با Y maze

فرزندان بالغ در سن ۱۳۶ روزگی از لحاظ توانایی‌های شناختی در این تست مورد بررسی قرار گرفتند [۲۳]. این ماز متشکل از ۳ بازوی هم‌اندازه (۸×۸×۱۵ سانتیمتر) جداشده با زاویه ۱۲۰ درجه از یکدیگر است و هر کدام تقسیم شده به دو ناحیه تاریک و روشن می‌باشد. به هر حیوان ۸ دقیقه اجازه جستجو در ماز داده شد. تعداد ورود به هر بازو ثبت شد. ورود به سه بازوی متفاوت بصورت پشت‌سرهم به مثابه تعویض خودجوش بازوها ثبت گردید. درصد تعویض خودجوش طبق فرمول  $\{ \times 100 - (2) \}$  (تعداد کل ورودها / تعداد تعویض خودجوش) بعنوان توانمندی حافظه جاری محاسبه شد [۲۳].

### جداسازی هیپوکمپ و سنجش سیتوکین TNF-α

با توجه به نقش هیپوکمپ در بیماری صرع، موش‌ها پس از تکمیل تست‌های رفتاری در سن ۱۴۲ روزگی از طریق تزریق صفاقی کنامین (۶۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) بی‌هوشی عمیق داده شدند، سپس به منظور خارج‌سازی خون از مغز عمل پرفیوژن با محلول نمک ۰/۹ درصد صورت گرفته و حیوان کشته می‌شد. مغز فوراً خارج شده و هیپوکمپ آن جداسازی می‌شد و در دمای ۸۰ - درجه سانتیگراد نگهداری می‌گردید.

<sup>1</sup> Pentylenetetrazol

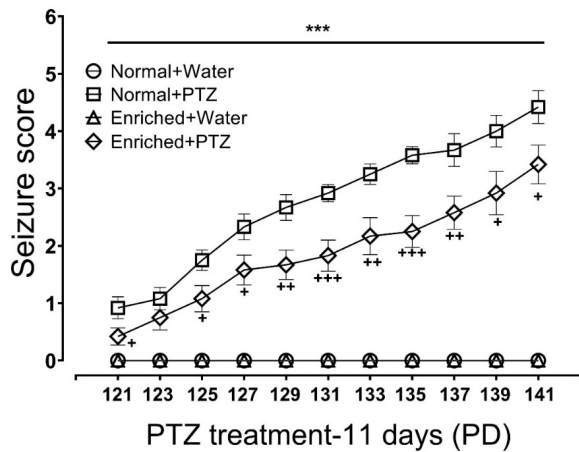
<sup>2</sup> Normal+Water

<sup>3</sup> Normal+PTZ

<sup>4</sup> Enriched+Water

<sup>5</sup> Enriched+PTZ

از شدت این رفتارهای تشنجی تحت تیمار PTZ بجز دوز دور دوم بطور معنی‌داری بکاهد ( $p < 0.02$ ) به ( $p < 0.001$ ).



شکل ۱. تاثیر تیمار با PTZ و محیط غنی‌سازی شده بر رفتارهای تشنجی. مقادیر بصورت میانگین بعلاوه خطای استاندارد (M+SEM) ارائه شده‌اند. مقادیر معنی‌داری آماری در مقایسه گروه معمولی تیمار شده با PTZ و گروه کنترل قفس معمولی:  $***p < 0.001$ . مقادیر معنی‌داری آماری در مقایسه گروه معمولی تیمار شده با PTZ و گروه محیط غنی‌سازی تیمار شده با PTZ:  $^+p < 0.02$ ,  $^{**}p < 0.002$ ,  $^{***}p < 0.001$

### رفتارهای شبه اضطرابی

آزمون ANOVA دوطرفه نشان‌دهنده وجود اثر برای محیط  $[F(1,44)=7.57, p < 0.01]$  و القای تشنج  $[F(1,44)=7.66, p < 0.01]$  بر روی میزان حضور حیوان در ناحیه مرکزی ماز Open Field بود (شکل ۲-A). آزمون آماری تعقیبی نشان داد که حیوان پرورش یافته در قفس معمولی تحت تیمار PTZ به میزان کمتری در ناحیه مرکزی ماز در قیاس با گروه قفس معمولی حضور پیدا کرد ( $p < 0.04$ ). جالب است که پرورش حیوان در محیط غنی توانست این اثر اجتناب از حضور در ناحیه مرکزی تحت تیمار PTZ را برطرف نماید ( $p < 0.04$ ).

در خصوص میزان عبور حیوان از روی خطوط ماز در گروه‌های مختلف، همانطور که در شکل ۲-B نشان داده شده است، هیچگونه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

بافت هیپوکمپ با مخلوطی از مهارگرهای پروتئاز در بافر (TBS plus 0.2% Triton X-100, 2mM EDTA, PBS 1 mM PMSF min, 4°C; Eppendorf ۱۵, ۱۵۰۰۰) از سانتریفیوژ (Centrifuge, 5427R) محلول رویی آن جمع‌آوری می‌شد. پروتئین کل به کمک کیت Bicinchoninic Acid از شرکت (Sigma, Co) سنجیده شد. تمام مراحل سنجش TNF- $\alpha$  بر اساس روش کار موجود در کیت الیزآ (MyBioSource) انجام شد.

### روش‌های آماری

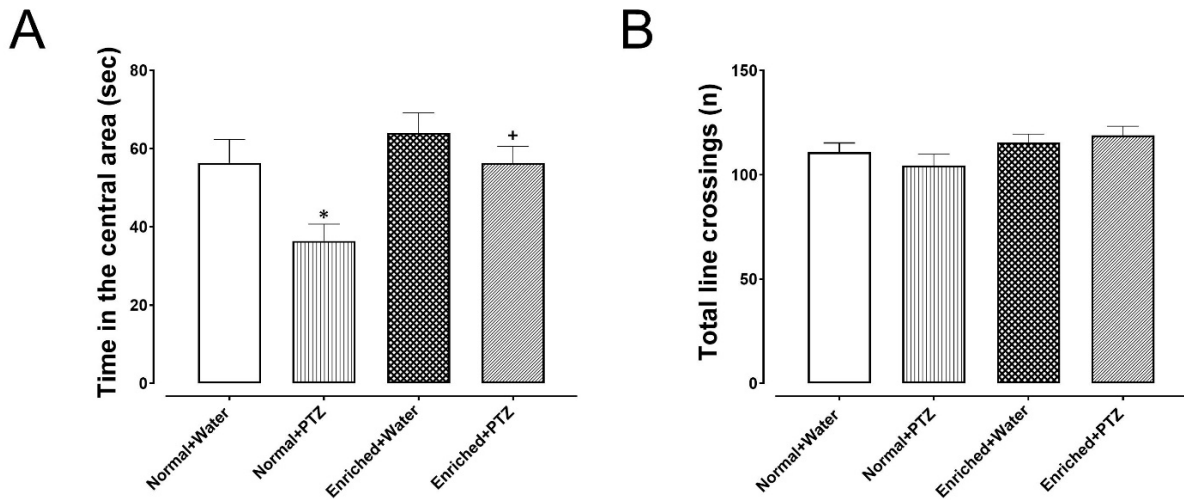
داده‌های مربوط به متغیر رفتار تشنجی بوسیله آزمون پارامتریک Three-Way Repeated Measure ANOVA تجزیه و تحلیل شدند. محیط و تشنج بعنوان متغیرهای Between-Subject Factors و روزها بعنوان متغیر Within-Subject (Repeated Measure) Factor (توسط سایر داده‌ها توسط آزمون پارامتریک ANOVA دوطرفه بررسی شدند. تست Tukey's HSD Post Hoc برای سنجش تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد. داده‌ها بصورت Mean+SEM نشان داده شدند.  $p < 0.05$  به عنوان مرز معنی‌داری لحاظ شد.

### یافته‌ها

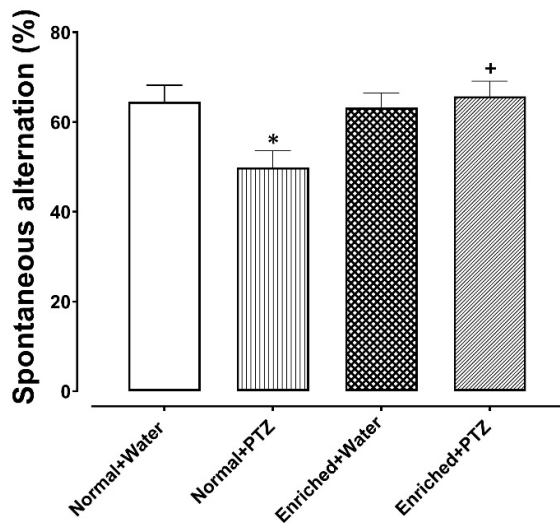
#### خطر بروز رفتارهای تشنجی

تست ANOVA سه‌طرفه نشان‌دهنده وجود اثر برای روز  $[F(5.38, 236.85)=40.30, p < 0.001]$ ، محیط  $[F(1,44)=28.61, p < 0.001]$  و القای تشنج  $[F(1,44)=764.37, p < 0.001]$  بود. همچنین اثرات تعاملی معنی‌دار بین محیط و القای تشنج  $[F(1,44)=28.61, p < 0.001]$  مشاهده شد.

همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، PTZ در تمامی دوره‌های تزریقی در حیوان‌های نگهداری شده در قفس معمولی توانست در قیاس با گروه کنترل همان قفس‌ها رفتارهای تشنجی ایجاد کند ( $p < 0.001$ ). قرارگیری در محیط غنی شده توانست



شکل ۲. تاثیر تیمار با PTZ و محیط غنی‌سازی‌شده بر رفتارهای شبه‌اضطرابی (میزان حضور در ناحیه میانی ماز) (A) و فعالیت‌های حرکتی (میزان عبور از خطوط ماز) (B). مقادیر بصورت میانگین بعلاوه خطای استاندارد (M+SEM) ارائه شده‌اند. سطوح معنی‌داری آماری در مقایسه گروه معمولی تیمار شده با PTZ و گروه کنترل قفس معمولی:  $p < 0.04$ \*. مقادیر معنی‌داری آماری در مقایسه گروه معمولی تیمار شده با PTZ و گروه محیط غنی‌سازی تیمار شده با PTZ:  $p < 0.04$ \*



شکل ۳. تاثیر تیمار با PTZ و محیط غنی‌سازی‌شده بر توانایی‌های شناختی (میزان تردد به هر سه بازو بصورت پشت سر هم). مقادیر بصورت میانگین بعلاوه خطای استاندارد (M+SEM) ارائه شده‌اند. سطوح معنی‌داری آماری در مقایسه گروه معمولی تیمار شده با PTZ و گروه کنترل قفس معمولی:  $p < 0.03$ \*. مقادیر معنی‌داری آماری در مقایسه گروه معمولی تیمار شده با PTZ و گروه محیط غنی‌سازی تیمار شده با PTZ:  $p < 0.02$ \*

### توانایی‌های شناختی

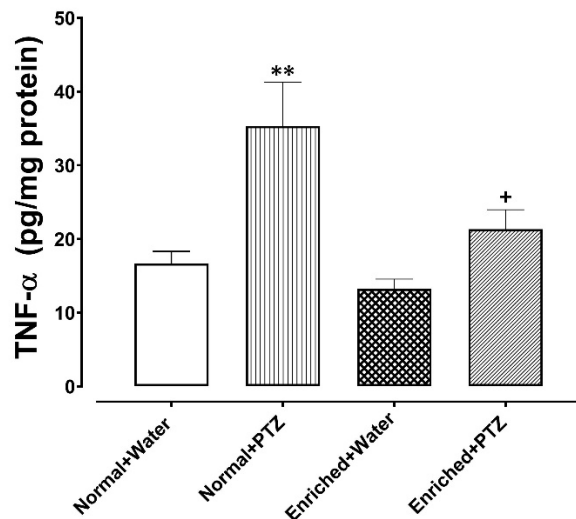
آزمون ANOVA دو طرفه نشان‌دهنده وجود اثر خالص محیط [F (1,44)=4.38,  $p < 0.05$ ] و اثر ناچیز حاشیه‌ای القای تشنج [F (1,44)=3.08,  $p = 0.08$ ] بر میزان تردد حیوان در هر سه بازوی ماز Y maze بود (شکل ۳). ولی هنگامی که اثرات تعاملی بررسی گردید، شاهد اثر تعاملی متغیرهای محیط و القای تشنج بر میزان تردد حیوان در هر سه بازوی ماز بودیم [F(1,44)=6.14,  $p < 0.02$ ]. آزمون آماری تعقیبی نشان داد (شکل ۳) که حیوان پرورش‌یافته در قفس معمولی تحت تیمار PTZ نسبت به گروه کنترل قفس معمولی به میزان کمتری اقدام به تغییر حرکت در هر سه بازوی ماز کرده‌است ( $p < 0.03$ ). جالب‌است که پرورش حیوان در محیط غنی توانست این عدم حرکت متناوب خودجوش حیوان در هر سه بازوی ماز تحت تیمار PTZ را برطرف نماید ( $p < 0.02$ ).

گذشت زمان عمدتاً شاهد شدیدتر شدن این رفتارهای اختلالی بودیم. مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که تیمار با PTZ با پرتکل مشابه مطالعه حاضر موجب ایجاد رفتارهای تشنجی می‌شود [۱۹،۲۰]. پرورش موش‌های نر در محیط غنی در دوران نوجوانی تا بلوغ بطور بارزی توانست از شدت بروز رفتارهای تشنجی تحت تیمار PTZ در مطالعه حاضر بکاهد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که قرارگیری حیوان در یک محیط همراه با کمبود تحریکات حسی مغز می‌تواند به تحریک پذیرتر شدن مغز منجر شده و زمینه ایجاد اختلالات تشنجی را فراهم کند [۲۴،۲۵]. از طرف دیگر، یک محیط استرس‌زا نیز می‌تواند در بروز علائم تشنج دخیل باشد [۲۶]. البته تاکنون به نقش استرس در خصوص صرع کمتر پرداخته شده است [۲۷]. بنابراین در مطالعه حاضر نیز فراوانی انواع محرک‌ها در محیط غنی‌سازی شده در کنار کمبود استرس در این محیط‌ها نسبت به قفس‌های معمولی [۲۸] ممکن است در ایجاد مقاومت در حیوان تحت شرایط تشنج‌زا کمک کرده باشد. البته باید توجه داشت که محیط غنی‌سازی شده در فاز خاموش اختلالات صرعی می‌تواند باعث وخیم‌تر شدن وضعیت تشنجی شود [۱۳]. عدم توانایی محیط غنی‌سازی شده در مطالعه حاضر در تقلیل علائم تشنج در دوز دوم PTZ نسبت به گروه قفس‌های معمولی نیز شاید مرتبط با این مدعا باشد.

داده‌های مطالعه حاضر همانند بسیاری از مطالعات قبلی نشان داد که حیوانات آزمایشگاهی تحت شرایط تشنج‌زا دچار اختلالات رفتاری از قبیل رفتارهای شبه‌اضطرابی می‌شوند [۲،۶]. از طرفی، نگهداری حیوان در محیط غنی‌سازی شده توانست مانع ایجاد اضطراب در حیوان صرعی شود. در خصوص اثرات مفید محیط غنی‌سازی شده بر رفتار اضطرابی چونندگان گزارشات زیادی وجود دارد که این اثرات را به مکانیسم‌های گوناگونی در مغز مرتبط دانسته‌اند

### میزان سیتوکین TNF- $\alpha$ در هیپوکمپ

در این مطالعه شاهد تاثیرپذیری TNF- $\alpha$  هیپوکمپ از محیط نگهداری موش [F (1,44)=6.54,  $p<0.02$ ] و تیمار با PTZ [F (1,44)=15.43,  $p<0.001$ ] بودیم. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، قیاس بین گروه‌ها نشان داد که تیمار PTZ بطور بارزی باعث افزایش TNF- $\alpha$  هیپوکمپ در گروه قفس معمولی می‌شود ( $p<0.003$ ). پرورش حیوان در محیط غنی توانست مانع افزایش معنی‌دار TNF- $\alpha$  هیپوکمپ تحت تیمار PTZ شود ( $p<0.03$ ).



شکل ۴. تاثیر تیمار با PTZ و محیط غنی‌سازی شده بر مقدار TNF- $\alpha$  در هیپوکمپ. مقادیر بصورت میانگین بعلاوه خطای استاندارد (M+SEM) ارائه شده‌اند. سطوح معنی‌داری آماری در مقایسه گروه معمولی تیمار شده با PTZ و گروه کنترل قفس معمولی:  $p<0.003$ \*. مقادیر معنی‌داری آماری در مقایسه گروه معمولی تیمار شده با PTZ و گروه محیط غنی‌سازی تیمار شده با PTZ:  $p<0.03$ †

### بحث

داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که محیط غنی‌سازی شده در دوران نوجوانی می‌تواند در برابر بروز رفتارهای شدید تشنجی، و اختلالات اضطرابی و شناختی همراه آن تحت شرایط القای صرع با PTZ تا حدود زیادی محافظت ایجاد کند.

تیمار موش‌ها با PTZ توانست انواع رفتارهای تشنجی در آنها ایجاد کند که متعاقب با افزایش دفعات تیمار و

[۳۱-۲۹]. از جمله این مکانیسم‌های ضداضطرابی به اثرات ضدالتهابی و کاهش TNF- $\alpha$  با کمک غنی‌سازی محیطی اشاره شده است [۳۱]. در خصوص میزان فعالیت‌های حرکتی حیوان تحت شرایط القای تشنج شاهد تفاوت معنی‌داری در مطالعه حاضر نبودیم هرچند که افزایش فعالیت حرکتی در موش صحرایی مستعد صرع در برخی مطالعات قبلی گزارش شده است [۳۲].

تیمار موش‌ها با PTZ باعث ایجاد اختلال در حافظه جاری حیوان شد، ولی موش‌های پرورش‌یافته در محیط غنی‌سازی شده از این آسیب شناختی در چنان شرایطی مصون ماندند. برخی مطالعات پیشین نیز اثرات مفید غنی‌سازی محیطی بر جنبه‌هایی از توانایی‌های شناختی از جمله LTP هیپوکامپ [۱۵] و میزان فعالیت هیپوکامپ [۸] را گزارش کرده‌اند.

نهایتاً داده‌های مطالعه حاضر در این مطالعه نشان دادند که مقدار TNF- $\alpha$  در هیپوکامپ تحت شرایط تشنجی افزایش پیدا می‌کند. جالب توجه است که TNF- $\alpha$  هیپوکامپ در موش‌های پرورش یافته در محیط غنی‌سازی شده تحت شرایط تشنج و صرع افزایش پیدا نکرد. در واقع بروز التهاب نورونی بعنوان یکی از عوامل مهمی است که در ایجاد مقاومت به درمان صرع مطرح است [۳۳]. TNF- $\alpha$  احتمالاً واسطه افزایش تحریک‌پذیری در شرایط صرع در برخی نقاط مغز باشد [۳۴]. لذا احتمالاً شرایط محیطی غنی‌سازی شده در مطالعه حاضر توانسته به واسطه ممانعت از افزایش TNF- $\alpha$  هیپوکامپ از آسیب شناختی حیوان تحت شرایط صرع جلوگیری کند.

بطور کلی، یافته‌های مطالعه حاضر در راستای نظریه امکان درمان تشنج‌های مقاوم به درمان با بکارگیری محیط‌های غنی‌سازی شده می‌باشد [۲]. پیشنهاد می‌گردد که در مطالعات آتی به پنجره زمانی استفاده از غنی‌سازی محیطی جهت بررسی اثر آن بر اختلالات صرع، و نیز مدت زمان آن توجه شود. همچنین بهتر است که فاکتور استرس نیز در این گونه مطالعات مدنظر قرار گیرد.

### نتیجه گیری

پرورش و نگهداری موش آزمایشگاهی در محیط غنی‌سازی شده قادر بود که از شدت رفتارهای تشنجی تحت شرایط القای آن بکاهد و نیز مانع اختلالات اضطرابی و شناختی همراه آن شود. لذا غنی‌سازی محیطی ممکن است که در بهینه‌سازی روش‌های درمانی صرع موثر واقع شود.

### ملاحظات اخلاقی

تمامی فرایندهای مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی البرز (IR.ABZUMS.REC.1397.218) تایید شده است، ضمن اینکه این فرایندها در مطابقت با راهنمای نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی NIH (NIH; Publication No. 85-21, Revised 1985) بودند.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از دانشگاه علوم پزشکی البرز به جهت حمایت این پژوهش بشماره گرنت ۳۶۸۹۳۴۹ تشکر و قدردانی می‌گردد.

### References

- 1- Thijs RD Surges R, O'Brien TJ, and Sander JW. Epilepsy in adults. Lancet, Lond. 2019 Feb; 393(10172):689-701.
- 2- Vrinda M, Sasidharan A, Aparna S, Srikumar BN, Kutty BM., and Shankaranarayana Rao BS. Enriched environment attenuates behavioral seizures and depression in chronic temporal lobe epilepsy. Epilepsia. 2017 May;58(7):1148-1158.



- 3- Zhao X, Rondón-Ortiz AN, Lima EP, Puracchio M, Roderick RC, and Kentner AC. Therapeutic efficacy of environmental enrichment on behavioral, endocrine, and synaptic alterations in an animal model of maternal immune activation. *Brain Behav Immun Health*. 2020 Mar; 3: 100043.
- 4- Piña JA, Namba MD, Leyrer-Jackson JM, Cabrera-Brown G, and Gipson CD. Social influences on nicotine-related behaviors. *Int Rev Neurobiol*. 2018 Jan; 140:1-32.
- 5- Engel J. Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 1996 Dec; 26(1): 141-50.
- 6- Araujo Furtado de, Rossetti MF, Chanda S, and Yourick D. Exposure to nerve agents: from status epilepticus to neuroinflammation, brain damage, neurogenesis and epilepsy. *Neurotoxicology*. 2012 Dec; 33(6):1476-90.
- 7- Manno I, Macchi F, Caleo M, and Bozzi Y. Environmental enrichment reduces spontaneous seizures in the Q54 transgenic mouse model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2011 Sep; 52(9):e113-7.
- 8- Korbey, SM, Heinrichs S.C, and Leussis M.P. Seizure susceptibility and locus ceruleus activation are reduced following environmental enrichment in an animal model of epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2008 Jan; 12(1):30-38.
- 9- Auvergne R, Leré C, Bahh B El, Arthaud S, Lespinet V, Rougier A, et al. Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment. *Brain Res*. 2002 Nov; 954(2):277-85.
- 10- Pracucci, E, Pillai V, Lamers D, Parra R, and Landi S. Neuroinflammation: a signature or a cause of epilepsy? *Int J Mol Sci*. 2021 Jun; 22(13):6981.
- 11- Ma Y, Cheng Q, Wang E, Li L, and Zhang X. Inhibiting tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling attenuates postoperative cognitive dysfunction in aged rats. *Mol Med Rep*. 2015 Aug; 12(2):3095-100.
- 12- Dhanushkodi A and Shetty AK. Is exposure to enriched environment beneficial for functional post-lesional recovery in temporal lobe epilepsy? *Neurosci Biobehav Rev*. 2008 Jan; 32(4):657-74.
- 13- Passineau MJ, Green EJ, and Dietrich WD. Therapeutic effects of environmental enrichment on cognitive function and tissue integrity following severe traumatic brain injury in rats. *Exp Neurol*. 2001 Apr; 168(2):373-84.
- 14- Morelli E, Ghiglieri V, Pendolino VV, Bagetta, Pignataro A, Fejtova A, et al. Environmental enrichment restores CA1 hippocampal LTP and reduces severity of seizures in epileptic mice. *Exp Neurol*. 2014 Nov; 261:320-7.
- 15- Fares RP, Belmeguenai A, Sanchez PE, Kouchi HY, Bodennec J, Morales A, et al. Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats. *PLoS One*. 2013 Jan; 8(1): e53888.
- 16- Zhou Z, Liu T, Sun X, Mu X, Zhu G, Xiao T, et al. CXCR4 antagonist AMD3100 reverses the neurogenesis promoted by enriched environment and suppresses long-term seizure activity in adult rats of temporal lobe epilepsy. *Behav Brain Res*. 2017 Mar 30; 322(Pt A):83-91.
- 17- Zeraati M, Najdi N, Mosaferi B, and Salari A-A. Environmental enrichment alters neurobehavioral development following maternal immune activation in mice offspring with epilepsy. *Behav Brain Res*. 2021 Feb; 399: 112998.
- 18- Medina AE, Manhães AC, and Schmidt SL. Sex differences in sensitivity to seizures elicited by pentylentetrazol in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2001 Mar; 68(3):591-6.
- 19- Zhu X, Dong J, Shen K, Bai Y, Zhang Y, Lv X, et al. NMDA receptor NR2B subunits contribute to PTZ-kindling-induced hippocampal astrocytosis and oxidative stress. *Brain Res Bull*. 2015 May; 114: 70-78.
- 20- Kosari-Nasab M, Shokouhi G, Ghorbanihaghjo A, Mesgari-Abbasi M, and Salari A.A. Quercetin mitigates anxiety-like behavior and normalizes hypothalamus-pituitary-adrenal axis function in a mouse model of mild traumatic brain injury. *Behav Pharmacol*. 2019 Apr; 30(2 and 3-Spec Issue): 282-289.
- 21- de Paiva VN, Lima SN, Fernandes MM, Soncini R., Andrade CA, and Giusti-Paiva A. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. *Behav Brain Res*. 2010 Dec; 215(1): 146-51.

- 22- Makinodan M, Yamauchi T, Tatsumi K, Okuda H, Takeda T, Kiuchi K, et al. Demyelination in the juvenile period, but not in adulthood, leads to long-lasting cognitive impairment and deficient social interaction in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009 Aug; 33(6): 978-985.
- 23- Sun W, Manohar S, Jayaram A, Kumaraguru A, Fu Q, Li J, et al. Early age conductive hearing loss causes audiogenic seizure and hyperacusis behavior. *Hear Res*. 2011 Dec; 282(1-2): 178-183.
- 24- Salami M, Fathollahi Y, Semnianian S, and Atapour N. Differential effect of dark rearing on long-term potentiation induced by layer IV and white matter stimulation in rat visual cortex. *Neurosci Res*. 2000 Dec; 38(4): 349-356.
- 25- Van Campen JS, Jansen FE, Pet MA, Otte WM, Hillegers MH, Joels M, et al. Relation between stress-precipitated seizures and the stress response in childhood epilepsy. *Brain*. 2015 Aug; 138(8): 2234-2248.
- 26- Espinosa-Garcia C, Zeleke H, and Rojas A. Impact of Stress on Epilepsy: Focus on Neuroinflammation-A Mini Review. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr; 22(8): 4061.
- 27- Solinas M, Thiriet N, Chauvet C, and Jaber M. Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. *Prog Neurobiol*. 2010 Dec; 92(4): 572-592.
- 28- Ashokan A, Hegde A, Balasingham A, and Mitra R. Housing environment influences stress-related hippocampal substrates and depression-like behavior. *Brain Res*. 2018 Mar; 1683: 78-85..
- 29- Sampedro-Piquero P, Castilla-Ortega E, Zancada-Menendez C, Santín LJ, and Begega A. Environmental enrichment as a therapeutic avenue for anxiety in aged Wistar rats: Effect on cat odor exposition and GABAergic interneurons. *Neuroscience*. 2016 Aug; 330: 17-25.
- 30- Ashokan A, Hegde A, and Mitra R. Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular plasticity in basolateral amygdala. *Psychoneuroendocrinology*. 2016 Jul; 69: 189-96.
- 31- Gong X, Chen Y, Chang J, Huang Y, Cai M, and Zhang M. Environmental enrichment reduces adolescent anxiety- and depression-like behaviors of rats subjected to infant nerve injury. *J Neuroinflammation*. 2018 Sep; 15(1): 262.
- 32- Nizinska K, Szydłowska K, Vouros A, Kiryk A, Stepniak A, Vasilaki E, et al. Behavioral characteristics as potential biomarkers of the development and phenotype of epilepsy in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Sci Rep*. 2021 Apr; 11(1): 8665.
- 33- Avanzini G, Depaulis A, Tassinari A, and de Curtis M. Do seizures and epileptic activity worsen epilepsy and deteriorate cognitive function? *Epilepsia*. 2013 Nov; 54 Suppl: 14-21.
- 34- Haji N, Mandolesi G, Gentile A, Sacchetti L, Fresegna D, Rossi S, et al. TNF- $\alpha$ -mediated anxiety in a mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol*. 2012 Oct; 237(2): 296-303.