

## بررسی و مقایسه اثرات ضد تشنجی گیرنده‌های آدنوزینی A1 در ناحیه CA1 هیپوکمپ بر شدت تشنجهای ایجاد شده به روش کیندلینگ الکتریکی آمیگدال و قشر انتورینال موش صحرایی

دکتر علی حیدریان پور\*، مسعود علاسوند\*\*، دکتر فرزاد ناظم\*، دکتر سیدجواد میرنجفی زاده\*\*\*  
دکتر محمدرضا بیگدلی\*\*\*\*

دریافت: ۸۶/۱۱/۱۱ ، پذیرش: ۸۷/۷/۱۳

### چکیده:

**مقدمه و هدف:** در سیستم اعصاب مرکزی، آدنوزین بعنوان تعدیل کننده درون زاد فعالیت نورونها و تنظیم تحریک پذیری آنها می باشد. در واقع افزایش غلظت داخل مغزی آدنوزین منجر به خاتمه و برقراری حالت پایدار بعد از تشنج می شود. بااین حال هنوز این سوال وجود دارد که آیا اثرات ضد تشنجی آدنوزین ناشی از اثرات مهار عمومی مغز می باشد یا اینکه نواحی خاصی از مغز نقش کلیدی در ایجاد اثرات ضد تشنجی آن دارد. در این راستا هدف مطالعه حاضر بررسی و مقایسه فعالیت گیرنده های آدنوزینی A1 ناحیه CA1 هیپوکمپ بر شدت تشنجهای ناشی از کیندلینگ الکتریکی آمیگدال و قشر انتورینال موش صحرایی می باشد.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی موشهای صحرایی با تحریک الکتریکی روزانه آمیگدال (گروه A) و قشر انتورینال (گروه B) کیندل شدند. به حیوانات کیندل شده N<sup>6</sup>-سیکلو هگزیل آدنوزین (CHA)، آگونیست اختصاصی گیرنده A<sub>1</sub> با غلظت های ۱، ۱۰، ۱۰۰ میکرومولار و ۱ و ۳- دی متیل - ۸- سیکلو پنتیل گزانتین (CPT)، آنتاگونیست اختصاصی گیرنده A<sub>1</sub> با غلظت ۱ میکرومولار به ناحیه CA1 هیپوکمپ هر دو گروه تزریق شد (۱ میکرو لیتر در دو دقیقه). حیوانات در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه پس از تزریق تحریک شدند. به تمامی حیوانات ۲۴ ساعت قبل از تزریق دارو، مایع مغزی- نخاعی مصنوعی تزریق و از داده های حاصل به عنوان کنترل استفاده گردید.

**نتایج:** کمیتهای تشنجی در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه بعد از تزریق اندازه گیری شد. نتایج بدست آمده نشان داد که CHA با غلظت ۱۰ میکرومولار باعث کاهش معنی داری در مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (ADD) ثبت شده از آمیگدال و قشر انتورینال و مدت زمان مرحله ۵ تشنج (S5D) می شود و زمان تأخیری بین تحریک تا شروع مرحله ۴ تشنج (S4L) را در هر دو گروه افزایش می دهد. CHA با غلظت یک میکرو مولار تأثیری بر کمیت های تشنجی گروه B نداشت ولی در گروه A کمیت های تشنجی را بطور معنی دار تغییر داد. CPT با غلظت ۱ میکرومولار تأثیری بر کمیت های تشنجی هر دو گروه نداشت. پیش درمانی حیوانات با CPT ۱ میکرو مولار بطور معنی داری اثرات CHA بر مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (ADD) ثبت شده از آمیگدال و قشر انتورینال را حذف کرد.

**نتیجه نهائی:** نتایج حاصله این احتمال را مطرح می کند که ناحیه CA1 هیپوکمپ در گسترش امواج تشنجی از آمیگدال یا قشر انتورینال به سایر نواحی مغزی نقش داشته و فعالیت گیرنده های آدنوزینی A1 در این ناحیه توسط CHA اثرات ضد تشنجی بیشتری در کیندلینگ آمیگدال نسبت به قشر انتورینال دارد.

کلید واژه ها: آدنوزین / آمیگدال / تشنج / قشر انتورینال / کیندلینگ / هیپوکمپ

\* استادیار گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشکده ادبیات و علوم انسانی دانشگاه بوعلی سینا (heidarian317@gmail.com)

\*\* عضو هیأت علمی گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان

\*\*\* دانشیار گروه فیزیولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

\*\*\*\* استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید بهشتی

**مقدمه:**

به دلیل غیر اخلاقی بودن مطالعه روی انسان برای شناسایی پاتوفیزیولوژی بیماری صرع و کشف داروهایی که بتواند مانع وقوع حملات صرع گردد از مدل‌های آزمایشگاهی مختلفی استفاده می‌شود. یکی از این مدل‌ها، کیندلینگ الکتریکی می‌باشد در این مدل حیوان مورد آزمایش بصورت مکرر و با فواصل زمانی مشخص توسط محرک ضعیف الکتریکی که در ابتدا قادر به ایجاد تشنج نیست، تحریک می‌شود و به مرور زمان همان تحریک ضعیف باعث بروز رفتارهای تشنجی در حیوان می‌گردد. پس از هر بار تحریک رفتار تشنجی شدیدتر شده و در نهایت به تشنج حرکتی یا عمومی منجر می‌شود (۱،۲). تشنجهایی که بدین روش ایجاد می‌شود مشابه رایجترین نوع تشنج در انسان یعنی تشنجهای پیچیده موضعی می‌باشد (۳).

به کمک کیندلینگ می‌توان نحوه ارتباط و عملکرد متقابل نواحی مختلف مغز را هنگام تشنج و نیز تاثیر داروها و مواد شیمیایی مختلف را بر روی فعالیت آنها مورد بررسی قرار داد (۴). از آنجائیکه منشاء ایجاد اکثر تشنجهای موضعی پیچیده در انسان سیستم لیمبیک است آمیگدال و قشر انتورینال از مهمترین بخشهای این سیستم بوده و ارتباطات وسیعی با سایر نواحی سیستم لیمبیک از جمله ناحیه CA1 هیپوکمپ دارد (۵). با توجه به ارتباط آناتومیکی و فیزیولوژیکی ناحیه CA1 هیپوکمپ با آمیگدال و قشر انتورینال احتمال می‌رود که ناحیه CA1 هیپوکمپ در انتشار یا توقف امواج تشنجی از این نواحی نقش مهمی داشته باشد در نتیجه عوامل مختلفی با تاثیر روی فعالیت نورونهای ناحیه CA1 هیپوکمپ بر انتشار امواج تشنجی از قشر انتورینال یا آمیگدال به سایر نقاط مغزی مؤثر خواهد بود. یکی از این عوامل آدنوزین است، بطور کلی در سیستم اعصاب مرکزی، آدنوزین بعنوان تعدیل کننده درون زاد فعالیت نورونها و تنظیم تحریک پذیری آنها می‌باشد. در واقع افزایش غلظت داخل مغزی آدنوزین منجر به خاتمه و برقراری حالت پایدار بعد از تشنج می‌شود (۶-۹).

نتایج حاصل از آزمایشها نشان داده است که آدنوزین در مدل‌های مختلف ایجاد صرع از جمله کیندلینگ اثرات ضد تشنجی آن عمدتاً از طریق گیرنده های A1 واسطه گری می‌شود (۶-۱۱). گیرنده های A1، G پروتئینی بوده و از طریق مهار کانالهای کلسیمی و مسیر آدنیلات سیکلاز و فعال کردن کانالهای پتاسیمی و مسیر فسفولیپاز C

منجر به مهار رهائش نوروترنسمیترهای تحریکی می‌شود و از این طریق اثرات ضد تشنجی خود را اعمال می‌کند (۱۱-۶). باین حال هنوز این سوال وجود دارد که آیا اثرات ضد تشنجی آدنوزین ناشی از اثرات مهار عمومی مغز می‌باشد یا اینکه نواحی خاصی از مغز نقش کلیدی در ایجاد اثرات ضد تشنجی آن دارد در این راستا محققین با استفاده از تزریق داخل مغزی آنالوگهای آدنوزین به بعضی نواحی مغزی نقش ضد تشنجی ایجاد شده توسط گیرنده های آدنوزینی A1 را در آن نواحی تعیین نموده اند (۱۴-۱۱، ۶). از طرفی در مطالعات دیگر مشخص شده است که گیرنده های آدنوزینی A1 با تراکم زیاد در ناحیه CA1 هیپوکمپ وجود داشته و فعالیت گیرنده های A1 پیش سیناپسی در ناحیه CA1 هیپوکمپ باعث مهار رهائش گلوتامات برخلاف گابا (اثری بر رهائش گابا ندارد) شده و از انتقال اسپایک های خودبخودی و تشنجی جلوگیری می‌کند (۶،۷).

با توجه به وجود گیرنده های آدنوزینی A1 با تراکم زیاد در ناحیه CA1 هیپوکمپ و همچنین ارتباطات آناتومیکی و فیزیولوژیکی بین این ناحیه با آمیگدال و قشر انتورینال (۵،۶). هدف از این تحقیق بررسی و مقایسه فعالیت گیرنده های آدنوزینی A1 ناحیه CA1 هیپوکمپ بر شدت تشنجهای ناشی از کیندلینگ الکتریکی آمیگدال یا قشر انتورینال می‌باشد.

**روش کار:**

**جراحی حیوانات:** در این مطالعه تجربی از موشهای صحرایی نر از نژاد Sprague-Dawley (مؤسسه رازی تهران) در محدوده وزنی ۳۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین ۱۰۰ mg/kg و رامپون (به نسبت هشت به یک) بیهوش شده و در استریوتاکس قرار می‌گرفتند. سپس دو الکترود تک قطبی به عنوان (Differential و Earth) توسط پیچهای متصل به آنها بر روی جمجمه محکم می‌شدند. در این مطالعه به دلیل اینکه حیوانات از طریق تحریکات الکتریکی آمیگدال و قشر انتورینال کیندل می‌شدند، الکترود سه قطبی به ترتیب در آمیگدال با مختصات ۲/۵ میلی متر به سمت عقب نسبت به برگما، ۴/۸ میلی متر به سمت راست و ۷/۵ میلی متر پایین تر از سخت شامه قرار می‌گرفت و در قشر انتورینال با مختصات ۶/۷ میلی متر به سمت عقب نسبت به برگما، ۴/۷ میلی متر به سمت

فیزیولوژیک می باشند، سایر کمیتهای رفتاری هستند که با مشاهده حیوان و ثبت زمان به وسیله کامپیوتر اندازه گیری می شدند. در این مطالعه ۵۸ سر موش صحرایی در ۶ گروه استفاده شد که در ۴۴ سر آنها الکترودها در موقعیت مناسب قرار داشتند. جهت اندازه گیری کمیتهای الکتروفیزیولوژی و رفتاری به ترتیب در تمامی آزمایشها از گروههای ۶ و ۸ تایی که الکترودها در موقعیت مناسب قرار داشتند استفاده شد. بعضی از حیوانات که کمیتهای تشنجی آنها بعد از تزریق دارو و گذشت یک هفته ثابت می شد جهت آزمایش بعدی مورد استفاده قرار می گرفتند. ضوابط اخلاقی کار با حیوانات با ضوابط تعیین شده توسط کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تربیت مدرس در نظر گرفته شد.

تزریق دارو: تزریق CHA یا CPT به ناحیه CA1 هیپوکمپ برای تزریق CHA یا CPT به ناحیه CA1 هیپوکمپ، این داروها در مایع مغزی نخاعی مصنوعی (ACSF) حل می شدند. CHA با دوزهای ۱ و ۱۰ میکرومولار و CPT با غلظت ۱ میکرومولار به حیوانات کیندل شده بصورت دو طرفه و همزمان بوسیله پمپ تزریق (ساخت شرکت WPI، انگلستان) با سرعت (۱ μl / ۲ min) تزریق و حیوانات در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه پس از اتمام تزریق تحریک شده و کمیتهای تشنجی آنها اندازه گیری می شد. در همه آزمایشها، ۲۴ ساعت قبل از تزریق داروها، به حیوانات ACSF تزریق می شد و از داده های حاصل به عنوان کنترل استفاده می گردید.

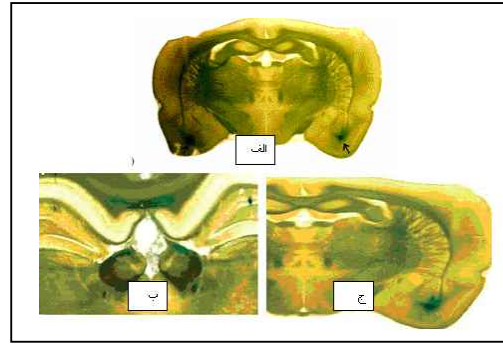
تزریق CHA همراه با CPT به CA1 هیپوکمپ: در این آزمایش تزریق CPT، (۱ میکرومولار) ۵ دقیقه قبل از تزریق CHA (۱۰ میکرومولار) صورت می گرفت و حیوانات در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه پس از اتمام تزریق CHA تحریک می شدند و مدت زمان تخلیه های متعاقب ثبت شده از آمیگدال و قشر انتورینال بعد از تحریک، اندازه گیری می گردید. تأیید بافت شناسی: پس از پایان هر آزمایش جهت اطمینان از قرار داشتن الکترودها و کانول ها در محل مورد نظر، به محل کانول، ۱ میکرولیتر رنگ آبی متیل تزریق شده و محل الکترودها نیز توسط جریان الکتریکی مستقیم با شدت ۱mA و به مدت زمان ۸ ثانیه تخریب گردید. سپس مغز حیوانات خارج و در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. بعد از یک هفته از محل الکترودها و کانول برش گیری به عمل آمده تا محل الکترودها و کانول مشخص گردد. فقط داده های حاصل از حیواناتی که الکترودها

راست و ۶/۸ میلی متر پایین تر از سخت شامه قرار می گرفت. دو قطب از این الکترودها برای تحریک و یک قطب آن برای ثبت در هر دو ناحیه به کار می رفت. کانولهای راهنما به صورت دوطرفه در ناحیه CA1 هیپوکمپ پشتی با مختصات ۳/۶ میلی متر به سمت عقب نسبت به برگما، ۲/۳ میلی متر به راست و چپ و ۲/۲ میلی متر پایین تر از سخت شامه کار گذاشته می شدند (۱۲، ۱۵). بعد از آن پینهای متصل به الکترودها را وارد سوکت مخابراتی کرده و سوکت بوسیله سیمان دندانپزشکی روی سطح مجموعه محکم می گردید.

یک هفته بعد از جراحی، ابتدا شدت آستانه تحریک تعیین می شد. بدین ترتیب که قشر انتورینال حیوانات توسط جریانی با شدت ۵۰ و آمیگدال با شدت ۳۰ میکرو آمپر که با آزمایشهای مقدماتی و مطالعات قبلی تعیین گردیده اند، تحریک می شدند (۱۲). اگر این شدت جریان برای ایجاد امواج تخلیه متعاقب به مدت حداقل ۵ ثانیه کافی بود به عنوان جریان آستانه در نظر گرفته می شد. در غیر این صورت، با فواصل زمانی ۵ دقیقه ای، شدت جریان هر بار ۱۰ میکرو آمپر افزایش می یافت تا اینکه تخلیه های متعاقب ثبت گردند. سپس حیوانات هر ۲۴ ساعت یکبار با شدت جریان آستانه تحریک شده تا کیندل شوند و ۵ مرحله تشنج را نشان دهند. مراحل حمله تشنجی در مدل کیندلینگ عبارتند از: مرحله ۱، حرکات دهان و صورت؛ مرحله ۲، انقباض عضلات گردن و حرکت سر به بالا و پایین؛ مرحله ۳، کلونوس در یکی از اندامهای جلویی؛ مرحله ۴، ایستادن حیوان روی اندامهای عقبی همراه با کلونوس دو اندام جلویی و مرحله ۵، از دست رفتن تعادل و به زمین خوردن.

آزمایشها بر روی حیواناتی صورت می گرفت که ۵ بار مرحله ۵ تشنج را نشان می دادند. کمیتهایی که در این تحقیق بعد از هر بار تحریک اندازه گیری می شدند عبارت بود از: مدت زمان تخلیه های متعاقب قشر انتورینال (Entorhinal cortex after discharge duration)؛ مدت زمان تخلیه های متعاقب ثبت شده از آمیگدال (Amygdala after discharge duration)؛ مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی و شروع مرحله ۴ تشنج (Stage 4 latency; S<sub>4</sub>L)؛ مدت زمان مرحله ۵ تشنج (Stage 5 duration; S<sub>5</sub>D)؛ مرحله حمله تشنج (Seizure stage; ss)؛ بجز کمیتهای اول و دوم که الکترو

در موقعیت مناسب قرار داشت، مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱: الف- نمایش محل الکتروود تحریکی در آمیگدال و عکس برداری از آن ب- نمایش محل کانول تزریق در هیپوکمپ بوسیله تزریق رنگ و عکس برداری از آن ج- نمایش محل الکتروود تحریکی در قشر انتورینال و عکس برداری از آن.

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات: برای مقایسه تأثیر غلظت های مختلف CHA و CPT در زمانهای پس از تزریق دارو بر کمیتهای تشنج از آزمون ANOVA دو طرفه (از نوع Completely randomized) و آزمون Tukey استفاده شد. جهت مقایسه هر یک از کمیتهای با کنترل مربوطه از آزمون t- زوجها استفاده گردید. همچنین برای مقایسه کمیتهای به دست آمده از گروهی که CHA دریافت کرده بودند با گروهی که CHA همراه با CPT دریافت کرده بودند، از آزمون t- غیر زوجها استفاده گردید.

**نتایج:**

تمامی حیواناتی که با تحریک آمیگدال و یا قشر انتورینال کیندل شده بودند، قبل و بعد از تزریق ACSF مرحله ۵ تشنج را نشان دادند. CHA و CPT در غلظتهای مورد استفاده اثر قابل توجهی بر رفتار و فعالیت حرکتی ناشی از مراحل حمله تشنج حیوان نداشتند. بررسیهای بافت شناسی نیز وجود الکتروود را در آمیگدال و قشر

انتورینال و کانول در ناحیه CA1 هیپوکمپ را تأیید کرد. اثر تزریق CHA به ناحیه CA1 هیپوکمپ:

CHA با غلظت ۱ میکرومولار تأثیر معنی داری روی کمیت های تشنجی حیواناتی که با تحریک الکتریکی قشر انتورینال کیندل شده بودند، نداشت ولی بطور معنی داری کمیت های تشنجی حیواناتی که با تحریک الکتریکی آمیگدال کیندل شده بودند را تغییر داد. آزمون آماری نشان داد این اثر نیز در تمامی کمیتهای اندازه گیری شده وابسته به غلظت بوده [  $F_{(1,32)} = 3/24, p < 0/05$  ] اما وابسته به زمان [  $F_{(1,32)} = 1/8, p = 0/2$  ] یا غلظت در زمان [  $F_{(1,32)} = 7/4, p = 0/16$  ] نیست (جدول ۱).

تزریق CHA با غلظت ۱۰ میکرو مولار باعث کاهش معنی داری در مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (ADD) ثبت شده از قشر انتورینال یا آمیگدال در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه پس از تزریق مشاهده شد. آزمون آماری نشان داد که این اثر وابسته به غلظت بوده [  $F_{(1,32)} = 6/16, p < 0/01$  ] اما وابسته به زمان [  $F_{(1,32)} = 3/8, p = 0/3$  ] یا غلظت در زمان [  $F_{(1,32)} = 7/4, p = 0/26$  ] نیست.

کمیت S4L نیز به دنبال تزریق CHA ۱۰ میکرومولار در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه پس از تزریق به طور معنی داری افزایش یافت. بر اساس آزمون آماری این اثر وابسته به غلظت بوده [  $F_{(1,32)} = 4/22, p < 0/05$  ] اما وابسته به زمان [  $F_{(1,32)} = 1/6, p = 0/42$  ] یا غلظت در زمان [  $F_{(1,32)} = 5/2, p = 0/46$  ] نیست.

کمیت S5D همچنین با تزریق CHA با غلظت ۱۰ میکرو مولار در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه بعد از تزریق بطور معنی داری کاهش یافت. طبق آزمون آماری این اثر نیز وابسته به غلظت بوده [  $F_{(1,32)} = 4/46, p < 0/05$  ] اما وابسته به زمان [  $F_{(1,32)} = 3/6, p = 0/12$  ] یا غلظت در زمان [  $F_{(1,32)} = 3/2, p = 0/76$  ] نیست (جدول ۲).

جدول ۱: اثر تزریق CHA (یک میکرومولار) به ناحیه CA1 هیپوکمپ بر کمیتهای تشنجی ناشی از کیندلینگ آمیگدال و قشر انتورینال

S5D		S4L		ADD		داروی تزریق شده	زمان تحریک پس از تزریق (دقیقه)
انتورینال	آمیگدال	انتورینال	آمیگدال	انتورینال	آمیگدال		
۲۷±۲/۳۵	۲۴±۳/۶۲	۱۶±۲/۷۵	۱۵±۴/۲۵	۹۶±۵/۳۵	۸۵±۴/۰۲	ACSF	۵
۲۵±۲/۰۲	۱۸±۲/۰۲*	۱۸±۱/۲۵	۲۲±۵/۰۶*	۹۱±۳/۰۵	۷۱±۲/۴۵*	CHA(1μM)	۱۵
۲۵±۱/۴۲	۲۵±۲/۲۵	۱۵±۲/۵۲	۱۴±۴/۴۲	۹۹±۶/۵۲	۹۲±۴/۷۵	ACSF	
۲۳±۲/۱۲	۱۷±۲/۴۲*	۱۷±۲/۵۳	۲۶±۳/۴۵*	۹۵±۲/۳۵	۷۳±۵/۲۵*	CHA(1μM)	

داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین بر حسب ثانیه نشان داده شده اند. جهت اندازه گیری کمیتهای الکتروفیزیولوژی و رفتاری به ترتیب از گروههای ۶ و ۸ تایی که الکتروودها در موقعیت مناسب قرار داشتند، استفاده شد. \* نشان دهنده  $P < 0/05$  در مقایسه با ACSF (گروه کنترل) با استفاده از آزمون t- زوجهاست.

جدول ۲: اثر تزریق CHA (۱۰ میکرومولار) به ناحیه CA1 هیپوکمپ بر کمیتهای تشنجی ناشی از کیندلینگ آمیگدال و قشر انتورینال

زمان تحریک پس از تزریق (دقیقه)	داروی تزریق شده	ADD		S4I		S5D	
		آمیگدال	انتورینال	آمیگدال	انتورینال	آمیگدال	انتورینال
۵	ACSF	۹۰±۶/۰۵	۸۷±۴/۲۵	۱۲±۱/۶۷	۲۱±۲/۰۵	۱۹±۲/۱۲	۲۵±۲/۱۴
	CHA(10μM)	۶۵±۲/۴۵**	۷۲±۳/۵۵*	۱۹±۲/۰۹**	۲۶±۱/۲۵*	۱۳±۱/۷۵**	۱۹±۲/۱۶*
۱۵	ACSF	۹۸±۷/۰۲	۱۰۲±۵/۱۲	۱۰±۱/۵۶	۱۷±۱/۷۲	۲۰±۲/۱۰	۲۶±۱/۴۲
	CHA(10μM)	۷۱±۴/۲۵**	۸۶±۴/۲۷*	۱۵±۲/۰۶**	۲۴±۱/۶۳**	۱۵±۲/۱۶**	۲۰±۲/۰۷*

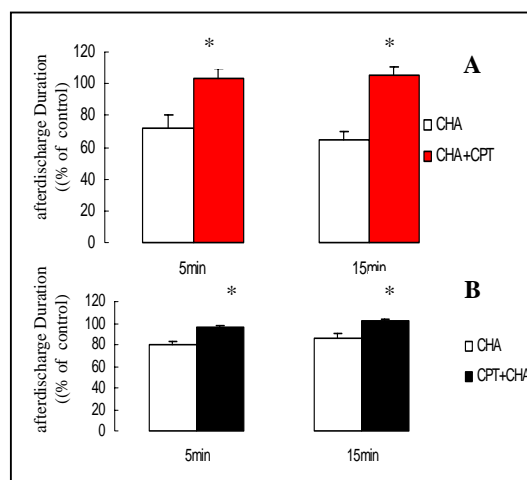
داده ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین بر حسب ثانیه نشان داده شده اند. جهت اندازه گیری کمیتهای الکتروفیزیولوژی و رفتاری به ترتیب از گروههای ۶ و ۸ تایی که الکترودها در موقعیت مناسب قرار داشتند. استفاده شد. \* نشان دهنده  $P < 0.05$  و \*\* نشان دهنده  $P < 0.01$  در مقایسه با ACSF (گروه کنترل) با استفاده از آزمون t - زوجی است

#### اثر تزریق CPT به ناحیه CA1 هیپوکمپ:

CPT با غلظت ۱ میکرومولار ۵ و ۱۵ دقیقه پس از تزریق تاثیر معنی داری روی کمیتهای تشنجی هر دو گروه A و B نداشت.

#### اثر تزریق CHA همراه با CPT به ناحیه CA1 هیپوکمپ:

آزمون آماری نشان داد هنگامی که CPT با غلظت ۱ میکرومولار ۵ دقیقه قبل از CHA ۱۰ میکرومولار به حیوانات تزریق شود، اثرات کاهشی CHA بر ADD ثبت شده از آمیگدال و قشر انتورینال که یک کمیتهای فیزیولوژیک می باشد، حذف می گردد (شکل ۲).



شکل ۲: حذف اثرات کاهشی CHA بر ADD ثبت شده از آمیگدال (A) و قشر انتورینال (B) به دنبال تزریق CPT با غلظت ۱ میکرومولار ۵ دقیقه قبل از تزریق CHA ۱۰ میکرومولار.

داده ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین بر حسب ثانیه نشان داده شده اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ سر می باشد. \* نشان دهنده  $P < 0.05$  در گروه CHA با استفاده از آزمون t - غیر زوجی است

#### بحث:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که تزریق CHA، آگونیست اختصاصی گیرنده A1 به ناحیه CA1

هیپوکمپ در گسترش امواج تشنجی ناشی از کیندلینگ قشر انتورینال و آمیگدال نقش داشته و اثر ضد تشنجی آن در کیندلینگ آمیگدال بارزتر از قشر انتورینال می باشد.

مطالعاتی که در گذشته انجام شده است نشان دهنده اثرات ضد تشنجی آدنوزین از طریق گیرنده های A1 می باشد (۶،۷). وجود تراکم زیاد گیرنده های آدنوزینی A1 در ناحیه CA1 هیپوکمپ، اثرات مهار آگونیستهای این گیرنده بر رهایش میانجی های تحریکی در برشهای زنده ناحیه CA1 هیپوکمپ (۸،۱۰) عدم تاثیر آن بر روی رهایش میانجی های مهاري مثل گابا در هیپوکمپ (۱۱) و فقدان کاهش گیرنده های آدنوزینی A1 هیپوکمپ در بیماران مصروع با منشاء لب گیجگاهی (۱۶) نشان دهنده نقش تعدیلی قوی آدنوزین در ناحیه CA1 هیپوکمپ است. بنابراین به نظر می رسد هیپوکمپ از جمله نواحی مغزی است که اهمیت زیادی در ایجاد اثرات ضد تشنجی آدنوزین از طریق گیرنده های A1 دارد. نتایج مطالعات دیگر نشان داده است که تزریق سیستمیک (۱۵) ۲- کلروآدنوزین و داخل آمیگدالی و داخل قشر پری اینال آثار ضد صرعی دارد (۱۸) همچنین تزریق آگونیستهای آدنوزین رهایش میانجی تحریکی (۱۹،۲۰)، تعداد اسپایکهای صرعی شکل و انتقال سیناپسی برانگیخته شده را در برشهای زنده هیپوکمپ تضعیف می کند (۲۱-۱۹). بعلاوه در مطالعات دیگری نیز آثار ضد تشنجی آدنوزین و آنالوگهای آن و اثر مهاري CHA بر حملات صرعی گزارش شده است. در این مطالعه برای تایید اثر گیرنده های A1 آدنوزین، نشان داده شده است که تزریق CPT به داخل CA1 هیپوکمپ ADD آمیگدال و قشر انتورینال را طولانی می کند و هر گاه CPT قبل از CHA تزریق شود آثار ضد صرعی CHA

از بین می رود. این شواهد اختصاصی بودن اثر CHA را نشان می دهد که به واسطه گیرنده A1 می باشد. اثر تزریق CHA به ناحیه CA1 هیپوکمپ بر ADD آمیگدال و قشر انتورینال وابسته به غلظت بوده و اثر الکتروفیزیولوژیک و رفتاری CHA با غلظت ۱ و ۱۰ میکرومولار به صورت کاهش در مدت زمان ADD آمیگدال و S5D و افزایش S4L می باشد در حالی که این اثرات فقط با غلظت ۱۰ میکرومولار در کمیت های تشنجی حاصل از کیندلینگ قشر انتورینال دیده شده است. ADD نشانگر فعالیت مدارهای موضعی در ناحیه ثبت شده است که به خاصیت ذاتی نورونهای و مدارهای آن بستگی دارد. وابسته به غلظت بودن کاهش ADD ثبت شده از آمیگدال و قشر انتورینال مؤید این است که اثرات مهاري CHA روی نورونهای CA1 باعث کاهش فعالیت نورونهای آمیگدال و قشر انتورینال می شود. افزایش S4L که شاخص سرعت عمومی شدن حملات تشنجی است و مربوط به درگیر شدن مدارهای ساقه مغز است، توسط CHA نیز وابسته به غلظت بوده که نشان دهنده نقش CA1 هیپوکمپ در گسترش امواج تشنجی از آمیگدال و قشر انتورینال به سایر نقاط مغزی می باشد. از طرفی کوتاه شدن S5D نشان دهنده این است که طول مدت حملات تونیک-کلونیک با فعال شدن گیرنده های A1 آدنوزینی در این ناحیه کاهش می یابد.

هیپوکمپ، آمیگدال و قشر انتورینال از مهمترین بخشهای سیستم لیمبیک هستند که در ایجاد و کنترل صرع لب گیجگاهی نقش دارند. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده اند که آمیگدال یک شبکه اینتگرال (integral) در تشنج سیستم لیمبیک بوده و آستانه کیندلینگ پایینی نسبت به هیپوکمپ و قشر انتورینال دارد (۲۲،۲۳). از طرفی نشان داده شده است که غیر فعال کردن آمیگدال توسط انفوزیون لیدوکائین حملات صرعی را در حیوانات مصروع متوقف کرده است که پیشنهاد کننده اهمیت این بخش از لیمبیک در تولید و گسترش امواج تشنجی می باشد (۱۲). با این حال مطالعه در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) روی برشهای قشر انتورینال نشاندهنده حساسیت بالای این ناحیه به تحریکات تشنجی زامثل کاهش غلظت منیزیم خارج سلولی که منجر به فعالیت گیرنده های NMDA می شود، می باشد. مسدود کردن اثرات مهاري گابا یا کاربرد بلوک کننده های کانالهای پتاسیمی (۲۳،۲۴) و همچنین کاهش حساسیت

حیوانات مستعد به تشنج و نیز متوقف کردن گسترش امواج تشنجی ایجاد شده توسط کیندلینگ الکتریکی در نواحی آمیگدال با لیژن قشر انتورینال همگی نشان دهنده نقش قشر انتورینال در تولید و گسترش امواج تشنجی می باشد (۲۴). در این مطالعه نیز حیواناتی که با تحریک الکتریکی آمیگدال نسبت به حیواناتی که با تحریک الکتریکی قشر انتورینال کیندل شده اند، آستانه کیندلینگ پایین داشته و بطور متوسط با تحریک  $3 \pm 18$  روز به طور متوالی ۵ مرحله تشنج را نشان دادند در حالی که در حیواناتی که با تحریک الکتریکی قشر انتورینال کیندل شده اند به طور متوسط با  $2 \pm 30$  روز به طور متوالی ۵ مرحله تشنج را نشان دادند که این احتمال را مطرح می کند که آمیگدال نقش مهمتری نسبت به انتورینال در تولید و گسترش امواج تشنجی دارد. از طرفی ناحیه CA1 هیپوکمپ از جمله نواحی از سیستم لیمبیک است که ارتباطات فیزیولوژیک و آناتومیک قوی با آمیگدال و قشر انتورینال دارد و تراکم گیرنده های آدنوزینی A1 در این ناحیه بیشتر است (۹،۱۰) و تزریق CHA با غلظت ۱۰ میکرومولار در این ناحیه باعث تغییرات معنی دار در کمیت های تشنجی در هر دو گروه از حیوانات شد ولی CHA با غلظت ۱ میکرومولار فقط اثر معنی دار روی کمیت های تشنجی حیواناتی که با تحریک الکتریکی آمیگدال کیندل شده بودند، گردید. در مطالعات آزمایشگاهی نشان داده اند که امواج تشنجی که از لایه های عمقی قشر انتورینال شروع شده به لایه های سطحی این قشر گسترش یافته و فعالیت نورونهای عمقی و سطحی سینکرونایز (Synchronized) می شود از طرفی مهمترین مسیر قشر انتورینال به ناحیه CA1 هیپوکمپ از طریق مسیر پرفورانت می باشد (۲۴) که در مراحل اولیه تحریکات امواج تخلیه همزمان در قشر انتورینال، تخلیه نورونهای مسیر پرفورانت یا سلولهای گرانولی ژيروس دندانیه ای را احتمالاً به دلیل وجود مدارهای مهاري قوی در این مسیر تحت تاثیر قرار نمی دهد. در مطالعه ما نیز احتمالاً تاخیر در عمومی شدن تشنج در گروهی که قشر انتورینال آنها تحریک شده اند را می توان به وجود اینترنورونهای مهاري قوی در مسیر پرفورانت دانست (۲۴،۲۵) ولی با این حال با گذشت زمان و تحریکات مکرر اینترنورونهای مهاري در اثر کیندلینگ (۲۴) تضعیف شده و مدارهای تحریکی تقویت می شود (۲۴،۲۵) یعنی امواج تشنجی تولید شده

7. Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24:31-55.
8. Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* 2005; 63: 191-270.
9. Pagonopoulou O, Efthimiadou A, Asimakopoulos B, Nikolettos NK. Modulatory role of adenosine and its receptors in epilepsy: Possible therapeutic approaches. *Neuroscience Res* 2006;56: 14-20.
10. Fredholm BB, Jzerman AP, Jacobson KA. International Union of Pharmacology: XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 527-52.
11. Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neuro Chem* 2001; 38:107-125.
12. Mohammad-Zadeh M, Amini A, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y. The role of adenosine A1 receptors in the interaction between amygdala and entorhinal cortex of kindled rats. *Epilepsy Res* 2005;65:1-9.
13. Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Pourgholami MH. Intraperitoneal and intraamygdala N6-cyclohexyladenosine suppress hippocampal kindled seizures in rats. *Brain Res* 2000; 858: 48-54.
14. Zeraati M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y. Adenosine A1 and A2A receptors of hippocampal CA1 region have opposite effects on piriform cortex kindled seizures in rats. *Seizure* 2006; 15: 41-8.
15. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press, 1986.
16. Glass M, Faull RM, Bullock JY, Janes K, Mee EW, Walker EB, Synck B, Draguno M. Loss of A1 adenosine receptors in human lobe epilepsy. *Brain Res* 1996; 710:56-68.
17. Pourgholami MH, Mirnajafi-Zadeh J, Behzadi J. Effect of intraperitoneal and intrahippocampal (CA1) 2-chloroadenosine in amygdaloid kindled rats. *Brain Res* 1997; 751: 259-64.
18. Pourgholami MH, Rostampour M, Mirnajafi-Zadeh J. Intraamygdala infusion of 2-chloroadenosine suppresses amygdaloid kindled seizures. *Brain Res* 1997;775:37-42.
19. Jeong HJ, Jang IS, Nabekura J. Adenosine A1 receptor mediated presynaptic inhibition of GABAergic transmission in immature rat hippocampal CA1 neurons. *J Neurophysiol* 2003; 89(3): 1214-22.
20. Yoon KW, Rothman SM. The modulation of rat hippocampal synaptic conductances by baclofen and gamma-aminobutyric acid. *J Physiol* 1991; 442: 377-90.
21. Thompson SM, Hass HL, Gahvailer BH. Com-

در قشر انتورینال در مسیر پرفورانت تقویت شده و به ناحیه CA1 هیپوکمپ ارسال می شود. پس احتمالاً عدم تاثیر CHA با غلظت ۱ میکرو مولار در کمیت های تشنجی حاصل از کیندلینگ قشر انتورینال نسبت به آمیگدال را می توان به اثرات سلولهای گرانولی ژيروس دندانه ای و مسیر پرفورانت دانست ولی این موضوع نیاز به مطالعات دقیق تر مثل تعیین ویژگیهای الکتروفیزیولوژیک نورونهای آمیگدال و قشر انتورینال در هنگام کیندلینگ الکتریکی و همچنین بررسی تغییرات ایجاد شده در ویژگیهای نورونهای مسیر پرفورانت در هنگام کیندلینگ قشر انتورینال با روشهای دقیق تر مثل پیچ کلمپ (Patch clamp) نیاز است.

### نتیجه نهایی :

نتایج حاصله این احتمال را مطرح می کند که ناحیه CA1 هیپوکمپ در گسترش امواج تشنجی از آمیگدال یا قشر انتورینال به سایر نواحی مغزی نقش مهمی داشته و فعالیت گیرنده های آدنوزینی A1 توسط CHA در این ناحیه باعث ایجاد اثرات ضد تشنجی می شود و این اثر در کیندلینگ آمیگدال نسبت به قشر انتورینال بیشتر می باشد. اگر چه فعالیت گیرنده های آدنوزینی A1 ناحیه CA1 هیپوکمپ در کیندلینگ آمیگدال و قشر انتورینال اثرات ضد تشنجی داشت با این حال اثر بارزی در توقف مرحله یا مراحل تشنجی دیده نشد، بنابراین ممکن است سایر نواحی مغزی نیز در تقویت و گسترش امواج تشنجی حاصل از آمیگدال یا قشر انتورینال نقش داشته باشند که جای مطالعه دارد.

### منابع :

1. McNamara JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci* 1994;14:3413- 3425.
2. Metha R, Dasgupta C, Ulla R. A neural network model for kindling of focal epilepsy: basic mechanism. *Biol Cybern* 1993; 68: 335-340.
3. Simonato M, Varani K, Muzzolini A, Bianchi C, Beani L, Borea PA. Adenosine A receptors in the rat brain in the kindling model of epilepsy. *Eur J Pharmacol* 1994;262:121-24.
4. Sato M, Racine RJ, McIntyre DC. Kindling: basic mechanisms and clinical validity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1990; 76: 459-72.
5. Dugladze T, Heinemann U, Gloveli T. Endorhinal cortex projection cells to the hippocampal formation in vitro. *Brain Res* 2001; 905: 224-31.
6. Ansel DJ, Ortega EL, Kraus AC. Focally injected adenosine prevents seizures in the rat. *Exp Neurol* 2004; 190: 544-57.

- parison of the action of adenosine at pre and post synaptic receptors in the hippocampus in vitro. *J Physiol* 1992; 451: 347-63.
22. Behr J, Lyson KJ, Mody I. Enhanced propagation of epileptiform activity through the kindled dentate gyrus. *J Neurophysiol* 1998;79:1726-32.
23. Bradford HF. Glutamate, GABA and Epilepsy. *Prog Neurobiol* 1995; 47: 477-511.
24. Behr J, Gloveli T, Gutierrez R. Spread of low Mg<sup>2+</sup> induced epileptiform activity from the rat entorhinal cortex to the hippocampus after kindling studied in vitro. *Neurosci Lett* 1996; 216: 41-4.
25. Barbarosie M, Louvel J, Kurcewicz I. CA3-released entorhinal seizures disclose dentate gyrus epileptogenicity and unmask a temporoammonic pathway. *J Neurophysiol* 2000; 83: 1115-24.