مقاله پژوهشی

بررسی و مقایسه اثرات ضد تشنجی گیرندهای 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 ضدتشنجی آدنوزین ناشی از اثرات مهار عمومی مغز می‌باشد یا اینکه نواحی خاصی ازمغز نقش کلیدی در ایجاد اثرات ضد تشنجی آن دارد. در این‌راستا هدف مطالعه حاضر بررسی و مقایسه فعالیت گیرنده های آدنوزینی A1 ناحیهٔ 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^6 –سیکلوهگزیل آدنوزین (CHA)، آگونیست اختصاصی گیرندهٔ A_1 با غلظت های ۱، ۱۰ میکرومولار و ۱ و ۳- دی متیل- ۸- سیکلو پنتیل گزانتین (CPT)، آنتاگونیست اختصاصی گیرندهٔ A_1 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 ۲٤ 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 بعداز 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 ٤ 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 می شود. یکی از این مدلها، کیندلینگ الکتریکی می باشد 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 می شود و به مرور زمان همان تحریک ضعیف باعث بروز رفتارهای تشنجی در حیوان می گردد. پس از هر بار تحریک رفتار تشنجی شدیدتر شده و در نهایت به تشنج حرکتی یا عمومی منجر می شود(۱،۲). تشنجهایی که بدین روش ایجاد می شود مشابه رایجترین نوع تشنج در انسان یعنی تشنجهای پیچیده موضعی می باشد(۳).

به کمک کیندلینگ می توان 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 ناحیهCA1 هیپوکمپ با آمیگدال و قشر انتورینال احتمال می رود 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 انتوریتال 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 می باشد. در واقع افزایش غلظت داخل مغزی آدنوزین منجر به خاتمه و برقراری حالت پایدار بعد از تشنج می شود(۹-۶).

نتایج حاصل از آزمایشها نشان داده است که آدنوزین در مدلهای مختلف ایجاد صرع از جمله کیندلینگ اثرات ضد تشنجی آن عمدتا" از طریق گیرنده های A1 واسطه گری می شود(۱۱-۶). 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 رهایش نوروترنسمیترهای تحریکی می شود و از این طریق اثرات ضد تشنجی خود را اعمال می کند (۱۱-۶). 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 محققین با استفاده از تزریق داخل مغزی آنالوگهای آدنوزین به بعضی نواحی مغزی نقش ضد تشنجی ایجاد شده توسط گیرنده های آدنوزینیA1 را در آن نواحی تعیین نموده اند(۱۴-۱۱ ،۶).

از طرفی در مطالعات دیگر مشخص شده است که گیرنده های آدنوزینیA1 با تراکم زیاد در ناحیه CA1 هیپوکمپ وجود داشته و فعالیت گیرنده های A1 پیش سیناپسی در ناحیهCA1 هیپوکمپ باعث مهار رهایش گلوتامات برخلاف گابا (اثری بر رهایش گابا ندارد) شده و از انتقال اسپایک های خودبخودی وتشنجی جلوگیری می کند(۶،۷).

با توجه به وجود گیرنده های آدنوزینیA1 با تراکم زیاد در ناحیه CA1 هیپوکمپ و همچنین ارتباطات آناتومیک و فیزیولوژیک بین این ناحیه با آمیگدال و قشر انتورینال(۵،۶). هدف از این تحقیق بررسی و مقایسه فعالیت گیرنده های آدنوزینی A1 ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ بر شدت تشنجهای ناشی از کیندلینگ الکتریکی آمیگدال یا قشر انتورینال می باشد.

روش کار:

جراحی حیوانات : در این مطالعه تجربی از موشهای صحرایی نر از نژاد Sprague-Dawley (مؤسسه رازی تهران) در محدوده وزنی۳۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات باتزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین ۱۰۰mg/kg و رامپون (به نسبت هشت به یک) بیهوش شده و در استریوتاکس قرار می گرفتند. 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 و۷/۵ میلی متر پایین‌تر ازسخت شامه قرارمی‌گرفت ودر قشر انتورینال با مختصات ۶/۷ میلی متر به سمت عقب نسبت به برگما ، ۴/۷ میلی متر به سمت

راست و ۶/۸ میلی متر پایین‌تر ازسخت شامه قرار می‌گرفت. دو قطب از این الکترود برای تحریک و یک قطب آن برای ثبت در هر دو ناحیه به کار می‌رفت . کانولهای راهنما به صورت دوطرفه در ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ پشتی با مختصات ۶ /۳ 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 می‌شدند(۱۲،۱۵) . بعد از آن پینهای متصل به الکترودها را وارد سوکت مخابراتی کرده و سوکت بوسیله سیمان دندانپزشکی روی سطح جمجمه محکم می‌گردید.

یک هفته بعد از جراحی، ابتدا شدت آستانه تحریک تعیین می‌شد. 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 می‌شدند(۱۲). اگر این شدت جریان برای ایجاد امواج تخلیه متعاقب به مدت حداقل ۵ ثانیه کافی بود به عنوان جریان آستانه در نظر گرفته می‌شد. در غیر این صورت، با فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای، شدت جریان هر بار ۱۰ میکرو آمپر افزایش می‌یافت تا اینکه تخلیه‌های 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 وحرکت سر به بالا وپایین؛ 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.

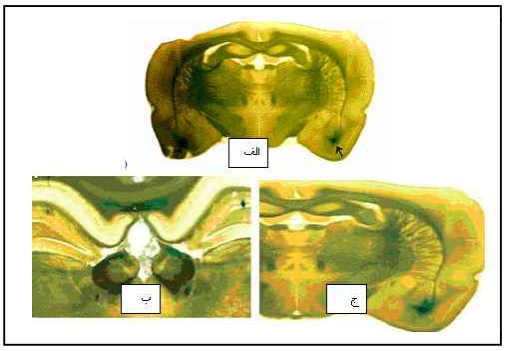
آزمایشها برروی حیواناتی صورت می گرفت که ۵ بارمرحله ۵ تشنج را نشان می دادند. کمیتهایی که در این تحقیق بعد از هر بار تحریک اندازه‌گیری می‌شدند عبارت بود از: مدت زمان تخلیه‌های متعاقب قشر انتورینال (Entorhinal cortex after discharge duration)؛ مدت زمان تخلیه‌های متعاقب ثبت شده از آمیگدال (Amygdala after discharge duration)؛ مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی و شروع مرحله ۴ تشنج (Stage 4 latency; S_4L)؛ مدت زمان مرحله ۵ تشنج (Stage 5 duration; S_5D)؛ مرحله حمله تشنج (Seizure stage;ss)؛ بجز کمیت های اول و دوم که الکترو فیزیولوژیک می باشند، سایر کمیتها رفتاری هستند که با مشاهده حیوان و ثبت زمان به وسیله کامپیوتر اندازه گیری می شدند. در این مطالعه۵۸ سر موش صحرایی در ۶ گروه استفاده شد که در۴۴ سر آنها الکترودها در موقعیت مناسب قرار داشتند. جهت اندازه گیری کمیتهای الکتروفیزیولوژی ورفتاری به ترتیب در تمامی آزمایشها از گروههای۶ و ۸ تایی که الکترودها در موقعیت مناسب قرار داشتند استفاده شد. بعضی از حیوانات که کمیتهای تشنجی آنها بعد از تزریق دارو وگذشت یک هفته ثابت می شد جهت آزمایش بعدی مورد استفاده قرار می گرفتند. ضوابط اخلاقی کار با حیوانات مطابق 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 و۱۰میکرومولار 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 می‌شد و از داده های حاصل به عنوان کنترل استفاده می گردید.

تزریقCHA همراه با CPT به CA1 هیپوکمپ : در این آزمایش تزریق CPT، (۱ میکرومولار) ۵ دقیقه قبل از تزریق CHA (۱۰ میکرومولار) صورت می‌گرفت و حیوانات در زمانهای۵ و۱۵دقیقه پس از اتمام تزریق CHA تحریک می شدند و مدت زمان تخلیه های متعاقب ثبت شده از آمیگدال و قشر انتورینال بعد از تحریک، اندازه‌گیری می گردید.

تأیید بافت شناسی : پس از پایان هر آزمایش جهت اطمینان از قرار داشتن الکترود و کانول ها در محل مورد نظر، به محل کانول، ۱ میکرولیتر رنگ آبی متیل تزریق شده و محل الکترود 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 الکترود و کانول برش‌گیری به عمل آمده تا محل الکترود و کانول مشخص گردد. فقط داده های حاصل از حیواناتی که الکترود آنها

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



شکل ۱: الف- نمایش محل الکترود تحریکی در آمیگدال وعکس برداری از آن ب- نمایش محل کانول تزریق در هیپوکمپ بوسیله تزریق رنگ وعکس برداری از آن ج- نمایش محل الکترود تحریکی در قشر انتورینال وعکس 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 کمیتها 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 وCPT در غلظتهای مورد استفاده اثر قابل توجهی بر رفتار و فعالیت حرکتی ناشی از مراحل حمله تشنج حیوان نداشتند. بررسیهای بافت شناسی نیز وجود الکترود 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 تاثیر 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 کمیت های اندازه گیری شده وابسته به غلظت بوده [$F_{(1و20)}$=۳/۲۴ ، p<۰/۰۵] اما وابسته به زمان [$F_{(1و20)}$=۱/۸، p=۰/۲] یا غلظت در زمان [$F_{(1و20)}$ =۷/۴، p=۰/۱۶] نیست(جدول۱).

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 [$F_{(1و20)}$=۶/۱۶ ، p<۰/۰۱] اما وابسته به زمان [$F_{(1و20)}$=۳/۸، p=۰/۳] یا غلظت در زمان [$F_{(1و20)}$ =۷/۴، p=۰/ ۲۶] 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 [$F_{(1و20)}$ =۴/۲۲ ، p<۰/۰۵] اما وابسته به زمان [$F_{(1و20)}$=۱/۶، p=۰/۴۲] یا غلظت در زمان [$F_{(1و20)}$ =۵/۲، p=۰/ ۴۶] 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 [$F_{(1و20)}$ =۴/۴۶ ، p<۰/۰۵] اما وابسته به زمان [$F_{(1و20)}$=۳/۶، p=۰/۱۲] یا غلظت در زمان [$F_{(1و20)}$ =۳/۲، p=۰/ ۷۶] نیست (جدول۲).

جدول ۱: اثر تزریقCHA (یک میکرومولار) به ناحیه CA1 هیپوکمپ بر کمیتهای تشنجی ناشی ازکیندلینگ آمیگدال و قشر انتورینال

زمان تحریک پس ازتزریق(دقیقه)	داروی تزریق شده	ADD		S4l		S5D	
		آمیگدال	انتورینال	آمیگدال	انتورینال	آمیگدال	انتورینال
۵	ACSF	۸۵±۴/۰۲	۹۶±۵/۳۵	۱۵±۴/۲۵	۱۶±۲/۷۵	۲۴±۳/۶۲	۲۷±۲/۳۵
	CHA(1μM)	۷۱±۲/۴۵*	۹۱±۳/۰۵	۲۲±۵/۰۶*	۱۸±۱/۲۵	۱۸±۲/۰۲*	۲۵±۲/۰۲
۱۵	ACSF	۹۲±۴/۷۵	۹۹±۶/۵۲	۱۴±۴/۴۲	۱۵±۲/۵۲	۲۵±۲/۲۵	۲۵±۱/۴۲
	CHA(1μM)	۷۳±۵/۲۵*	۹۵±۲/۲۵	۲۶±۳/۴۵*	۱۷±۲/۵۳	۱۷±۲/۴۲*	۲۳±۲/۱۲

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 الکترودها در موقعیت مناسب قرار داشتند. استفاده شد. * نشان دهنده P<۰/۰۵ 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 ازکیندلینگ آمیگدال و قشر انتورینال

زمان تحریک پس ازتزریق(دقیقه)	داروی تزریق شده	ADD آمیگدال	ADD انتورینال	S4l آمیگدال	S4l انتورینال	S5D آمیگدال	S5D 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*

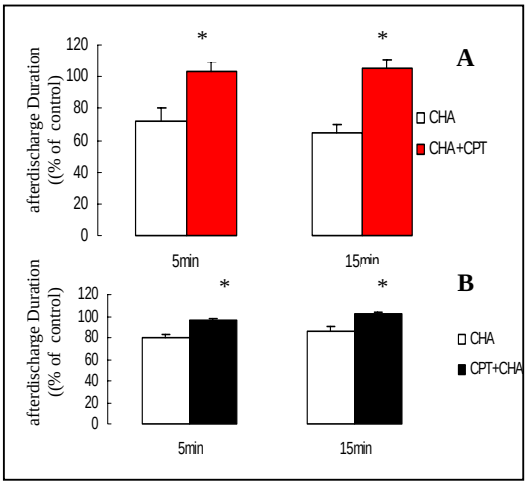
داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین بر حسب ثانیه نشان داده شده انـد. جهـت انـدازه گیـری کمیتهـای الکتروفیزیولـوژی و رفتـاری بـه ترتیـب از گروههای ۶ و ۸ تایی که الکترودها در موقعیت مناسب قرار داشتند. استفاده شد. * نشان دهنده **P<۰/۰۵** و ** نشان دهنده **P<۰/۰۱** در مقایسه با ACSF (گـروه کنترل) با استفاده از آزمون t – زوجهاست

اثر تزریق CPT به ناحیه CA1 هیپوکمپ:

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

اثر تزریق CHA همراه با CPT به ناحیه CA1 هیپوکمپ:

آزمـون آمـاری نـشان داد هنگـامی کـه CPT بـا غلظـت ۱ میکرومولار ۵ دقیقه قبـل از CHA ۱۰ میکرومـولار بـه حیوانات تزریق شود، اثرات کاهشی CHA بر ADD ثبـت شـده از آمیگـدال و قـشر انتورینـال کـه یـک کمیـت فیزیولوژیک می باشد، حذف می گردد(شکل۲).



شکل۲ : حذف اثرات کاهشی CHA بر ADD ثبـت شـده از آمیگدال (A) و قشر انتورینال(B) به دنبال تزریـق CPT بـا غلظـت ۱ میکرومـولار ۵ دقیقـه قبـل از تزریـق CHA ۱۰ میکرومولار.

داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین بر حسب ثانیه نشان داده شده اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ سر می باشد.* نشان دهنـده P<۰/۰۵ در گروه CHA با استفاده از آزمون t – غیر زوجهاست

بحث:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که تزریـق CHA ، آگونیست اختصاصی گیرنده A1 به ناحیـه CA1 هیپوکمپ در گسترش امواج تشنجی ناشـی از کینـدلینگ قشر انتورینال و آمیگدال نقش داشته و اثر ضد تشنجی آن در کینـدلینگ آمیگـدال بـارزتر از قـشر انتورینـال می باشد.

مطالعاتی که در گذشته انجام شده است نشان دهنده اثرات ضد تـشنجی آدنـوزین از طریـق گیرنـده هـای A1 می باشد(۶،۷). وجود تراکم زیـاد گیرنـده هـای آدنـوزینی A1 در ناحیه CA1 هیپوکمپ، اثرات مهاری آگونیـستهای این گیرنده بر رهایش میانجی های تحریکـی در برشـهای زنده ناحیهCA1 هیپوکمپ (۸،۱۰) عدم تـاثیر آن بـر روی رهایش میانجی های مهاری مثل گابا در هیپوکمپ (۱۱) و فقدان کـاهش گیرنـده هـای آدنـوزینیA1 هیپوکمـپ در بیماران مصروع با منشاء لب گیجگاهی (۱۶) نشان دهنـده نقش تعـدیلی قـوی آدنـوزین در ناحیـه CA1 هیپوکمـپ است. بنابراین به نظر می رسد هیپوکمپ از جملـه نـواحی مغزی است که اهمیت زیادی در ایجاد اثرات ضد تـشنجی آدنوزین از طریق گیرنـده هـای A1 دارد.نتـایج مطالعـات دیگـر نـشان داده اسـت کـه تزریـق سیـستمیک(۱۵) ۲- کلروآدنـوزین و داخـل آمیگـدالی و داخـل قـشر پـری راینـال آثـار ضـد صـرعی دارد (۱۸) همچنـین تزریـق آگونیستهای آدنوزین رهایش میـانجی تحریکـی(۱۹،۲۰) ، تعـداد اسـپایکهای صـرعی شـکل و انتقـال سیناپـسی برانگیخته شده را در برشهای زنده هیپوکمپ تضعیف مـی کند(۲۱-۱۹). بعلاوه در مطالعـات دیگـری نیـز آثـار ضـد تشنجی آدنوزین و آنالوگهـای آن و اثـر مهـاری CHA بـر حملات صرعی گزارش شده اسـت. در ایـن مطالعـه بـرای تایید اثر گیرنده های A1 آدنوزین ، نشان داده شده اسـت کـه تزریـق CPT بـه داخـل CA1 هیپوکمـپ ADD آمیگـدال و قـشر انتورینـال را طـولانی مـی کنـد و هـر گاه CPT قبل از CHA تزریق شود آثار ضد صرعـی 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 مهاری 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(۱۳). با این حال مطالعه در شرایط آزمایشگاهی(in vitro) روی برشهای قشر انتورینال نشاندهنده حساسیت بالای این ناحیه به تحریکات تشنج زا مثل کاهش غلظت منیزیم خارج سلولی که منجر به فعالیت گیرنده هایNMDA می شود، می باشد. مسدود کردن اثرات مهاری 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 ۳± ۱۸ روز به طور متوالی ۵ مرحلهٔ تشنج را نشان دادند در حالی که در حیواناتی که با تحریک الکتریکی قشر انتورینال کیندل شده اند به طور متوسط با ۲±۳۰ 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 ژیروس دندانه ای را احتمالاً به دلیل وجود مدارهای مهاری قوی در این مسیر تحت تاثیر قرار نمی دهد. در مطالعه ما نیز احتمالا تاخیر در عمومی شدن تشنج در گروهی که قشر انتورینال آنها تحریک شده اند را می توان به وجود اینترنورونهای مهاری قوی در مسیر پرفورانت دانست(۲۴،۲۵) ولی با این حال با گذشت زمان و تحریکات مکرر اینترنورونهای مهاری در اثر کیندلینگ (۲۴) تضعیف شده و مدارهای تحریکی تقویت می شود(۲۴،۲۵) یعنی امواج تشنجی تولید شده

در قشر انتورینال در مسیر پرفورانت تقویت شده و به ناحیه CA1 هیپوکمپ ارسال می شود. پس احتمالا 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 ژیروس 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 پچ 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 Neurosci1994;14:3413- 3425.
2. Metha R, Dasgupta C, Ulla R. A neural network model for kindling of focal epilepsy: basic mechanism. Biol Cybern1993; 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, Mclntyre DC. Kindling: basic mechanisms and clinical validity. Electroencephalogr Clin Neurophysiol1990; 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. Anschel DJ, Ortega EL, Kraus AC. Focally injected adenosine prevents seizures in the rat. Exp Neurol 2004; 190: 544-57.
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 homestatic 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 A1and 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 intraperitonealand 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 amygdalakindled seizures. Brain Res 1997;775:37-42.
19. Jeong HJ, Jang IS, Nabekura J. Adenosine A1 receptormediated 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-minobutyric acid. J Physiol 1991; 442: 377-90.
21. Thompson SM, Hass HL, Gahvailer BH. Com-

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, Gutie´rrez R. Spread of low Mg2+ 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.