



Effect of an ectonucleotidase inhibitor on anticonvulsant actions of low-frequency electrical stimulation in perforant path rapid kindling in rats

Maryam Zeraati, Javad Mirnajafi-Zadeh*, Mohammad Javan, Saeed Semnanian, Simin Namvar

Dept. Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 23 Apr 2010

Accepted: 27 Jun 2010

Abstract

Introduction: Considering high prevalence of epileptic disease and considering that 40 percent of epileptic patients are resistant to drug therapy, it needs more researches to find new therapeutic ways. LFS is among the new methods for epilepsy treatments. One possible mechanism involved in the anticonvulsant effect of LFS is increased adenosine. Therefore, in this study the role of adenosine production from ATP by ectonucleotidase enzyme pathway in exerting the anticonvulsant effects of LFS were evaluated.

Methods: Animals were kindled by electrical stimulation of perforant path in a rapid kindling manner (12 stimulation per day). One group of animals received LFS after kindling stimulation. In one another group, AOPCP a blocker of ectonucleotidase inhibitor was micro injected (50 micro molar) intra cerebro ventricular each day before LFS stimulation. Some group of animals were also received AOPCP (50 and 100 micro molar) but were not applied to LFS. Seizure behavior and electrophysiological parameters (including ADD and field potential) were recorded.

Results: Like previous investigations, application of LFS, decreased all seizure parameters significantly. Microinjection of AOPCP had no significant effect on anticonvulsant actions of LFS. However microinjection of AOPCP at doses of 100 micro molar in animals that received just kindling stimulations, increased the seizure parameters significantly.

Conclusion: The results show that adenosine production via ectonucleotidase enzyme pathway may has no role in anticonvulsant effects of LFS; however endogenous adenosine produced through this pathway has an important role in kindling development.

Key words: Seizure, Low frequency stimulation, Adenosine, AOPCP

*Corresponding author e-mail: mirnajaf@modares.ac.ir
Available online at www.phypha.ir/ppj

تأثیر مهار اکتونوکلئوتیداز بر شدت اثرات ضد تشنجی ناشی از اعمال تحریک الکتریکی با فرکانس پایین در مدل صرعی کیندلینگ مسیر پرفورنت در موش صحرایی

مریم زراعتی، سیدجواد میرنجفی زاده*، محمد جوان، سعید سمنانیان، سیمین نامور

گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

پذیرش: ۶ تیر ۸۹

دریافت: ۳ اردیبهشت ۸۹

چکیده

مقدمه: شیوع زیاد بیماری صرع و مقاومت ۴۰ درصد از بیماران صرعی به دارو درمانی، تحقیقات زیادی برای یافتن راه‌های درمانی جدید را باعث شده است. از روش‌های جدید در درمان صرع تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (LFS) است. یکی از مکانیسم‌های احتمالی اثر ضد تشنجی LFS، افزایش آدنوزین است. در این مطالعه نقش مسیر تولید آدنوزین از ATP توسط آنزیم اکتونوکلئوتیداز در ایجاد اثرات ضد تشنجی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: حیوانات با تحریک الکتریکی مسیر پرفورنت به روش سریع (۱۲ تحریک در روز) کیندل شدند. هر روز در گروهی از حیوانات به دنبال تحریکات کیندلینگ اعمال LFS صورت گرفت. در گروه دیگر قبل از اعمال LFS داروی AOPCP با دوز ۵۰ میکرومولار داخل بطن مغز تزریق گردید. گروهی از حیوانات نیز به دنبال تحریکات کیندلینگ فقط داروی AOPCP با دوز ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار دریافت کردند. کمیت‌های رفتاری تشنج و کمیت‌های الکتروفیزیولوژیک (شامل مدت زمان تخلیه‌های متعاقب و پتانسیل‌های میدانی) ثبت می‌گردید.

یافته‌ها: اعمال LFS همانند تحقیقات قبلی باعث کاهش معنی‌دار تمام کمیت‌های تشنجی گردید. تزریق AOPCP قبل از اعمال LFS تأثیر معنی‌داری بر اثرات ضد تشنجی آن نداشت اما تزریق AOPCP با دوز ۱۰۰ میکرومولار در حیواناتی که فقط تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند باعث افزایش معنی‌داری در کمیت‌های تشنجی گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصله نشان می‌دهد که احتمالاً تولید آدنوزین از طریق مسیر اکتونوکلئوتیداز نقش مهمی در بروز اثرات ضد تشنجی LFS ندارد اما تولید آدنوزین درون زاد از طریق این مسیر نقش مهمی بر روند کیندلینگ دارد.

واژه‌های کلیدی: تشنج، تحریک الکتریکی با فرکانس پایین، آدنوزین، AOPCP

مقدمه

است. با توجه به اینکه در ۴۰ درصد موارد بیماران صرعی به دارو درمانی مقاوم می‌باشند، تحقیقات زیادی برای دستیابی به شیوه‌های جدید درمان صرع در حال بررسی است. در بیشتر بیماران مبتلا به صرع لوب گیجگاهی، ساختارهای لوب گیجگاهی میانی از جمله تشکیلات هیپوکمپ ناحیه تولید کننده

صرع بعد از سکته‌های مغزی شایعترین اختلال عصبی

mirmajaf@modares.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

[۲۵]. در صورتی که الکتروترایی بخواهد به عنوان روشی مناسب برای درمان صرع معرفی شود باید مکانیسم دخیل در آن مورد شناسایی دقیق قرار گیرد و اثراتی که این روش بر فعالیت سلولهای عصبی دارد بررسی شوند.

مطالعات نشان داده است که در حین تحریک ناحیه CA1 هیپوکمپ مقدار زیادی ATP و مشتقات آدنوزین از انتهای پیش سیناپس به فضای سیناپس رها می شود که این رهائش وابسته به فرکانس است. به دنبال اعمال LFS رهائش آدنوزین زیاد می شود. آدنوزین اندوژن که در حین LFS و HFS رها می شود و از طریق گیرنده های A1 و A2 عمل می کند، می تواند در نورونهای CA1 به ترتیب تضعیف سیناپسی طولانی و تقویت سیناپسی طولانی ایجاد کند [۸]. در CNS آدنوزین یک نورومودلاتور قوی است و اثر مهار بر فعالیت نورونی دارد. در مغز سالم به نظر می رسد روند ایجاد تشنج به وسیله اثرات تونیک ضد تشنجی آدنوزین مهار می شود [۳]. میزان آدنوزین در زمانی که نیاز متابولیک زیاد است، مثل شرایطی که تشنج وجود دارد افزایش می یابد [۲]. در مطالعات قبلی نشان داده شده در حین LFS، آدنوزین از طریق گیرنده های A1 اثر مهار بر کیندلینگ دارد [۱۵] و میزان بیان ژن این گیرنده ها به دنبال اعمال LFS افزایش می یابد [۱۱]. در مطالعه ای در سال ۱۹۹۹ نشان داده شده است که کاربرد آگونیست گیرنده های A1 در حین LFS باعث تسهیل تضعیف پس از تقویت می شود اما گیرنده های A2 بر آن اثری ندارد [۸]. با توجه به نقش A1 در اثرات ضد تشنجی LFS، می توان انتظار داشت که تقویت مکانیسم هایی که باعث افزایش غلظت خارج سلولی آدنوزین می شوند، اثرات ضد تشنجی LFS را تقویت نمایند. آدنوزین توسط مسیرهای آنزیمی مختلفی تولید می شود. یکی از این مسیرها، تولید آن در خارج سلول توسط ۵'-اکتو نوکلئوتیداز است. بنابر این، هدف از مطالعه حاضر این است که اثر مهارگر اکتونوکلئوتیداز بر شدت اثرات ضد تشنجی ناشی از اعمال LFS در مدل صرعی کیندلینگ مسیر پرفورنت در موش صحرایی مشخص شود.

مواد و روشها

از موش صحرایی نژاد Wistar در محدوده وزنی ۲۸۵ تا

تشنجات می باشد [۱۲ و ۱۰]. تمایل هیپوکمپ به شروع تشنج به دلیل توانایی آن در ایجاد تقویت سیناپسی طولانی مدت (Long term potentiation; LTP) می باشد. وجود یک مدار داخلی یک طرفه تحریکی و محدود بودن نورونهای مهار بر هیپوکمپ، این ناحیه را مستعد تولید فعالیت تشنجی کرده است [۱۸]. برای بررسی نقش نواحی مختلف هیپوکمپ از جمله شکنج دنداندار در فرایند تشنج از مدل های آزمایشگاهی مختلفی از جمله کیندلینگ استفاده می شود.

کیندلینگ مدلی برای ایجاد تشنج می باشد و به پدیده ای اشاره می کند که در طی آن تحریکات الکتریکی مکرر زیر آستانه ای می تواند واقعه پیش رونده ای را ایجاد کند که در نهایت به صرع عمومی تبدیل می شود. کیندلینگ الکتریکی معمولاً به دو روش آهسته و سریع انجام می گیرد. در روش آهسته روزانه یک بار کانون تشنج تحریک داده می شود. در روش سریع تعداد تحریکها در یک روز بیشتر از یک بار است. یک اصل مهم در کیندلینگ این است که تحریک الکتریکی باید قادر به ایجاد تخلیه های متعاقب (Afterdischarge; AD) در EEG باشد [۱۴ و ۱۳]. تخلیه متعاقب یک پاسخ الکتروانسفالوگرافیک به تشنج است که ناشی از فعالیت جمعی نورون ها می باشد که دامنه اسپایک ها در آن حداقل ۱۰۰ میکروولت و فرکانس آنها حداقل ۱ اسپایک در ثانیه است [۱۷]. حداقل شدت تحریک که قادر به ایجاد تخلیه های متعاقب به مدت ۴ تا ۵ ثانیه باشد، آستانه تخلیه متعاقب نامیده می شود. با ادامه تحریکات الکتریکی در فواصل منظم، به تدریج زمان و دامنه امواج تخلیه متعاقب افزایش می یابد و علایم رفتاری تشنج ظاهر می گردد.

از روش های درمانی جدید در درمان صرع تحریک الکتریکی مستقیم کانون صرعی است [۲۲]. در هیپوکمپ اعمال تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (Low-frequency stimulation; LFS) می تواند منجر به ایجاد LTD شود و تقویت سیناپسی ایجاد شده به شکل LTP در ناحیه هیپوکمپ نیز توسط LFS زوده می شود، پدیده ای که به آن تضعیف پس از تقویت (Depotentiation) می گویند. با توجه به تشابه بین کیندلینگ و LTP احتمال داده می شود که مکانیسم اثر ضد تشنجی LFS در مدل کیندلینگ مشابه با مکانیسم های دخیل در LTD و یا تضعیف پس از تقویت (Depotentiation) باشد

بندی می‌شوند: مرحله یک، انقباضات عضلانی در صورت (Facial clonus)؛ مرحله دوم، حرکت دادن سر به طرف بالا و پایین (Head Nodding)؛ مرحله سوم، کلونوس اندام جلویی (Forelimb clonus)؛ مرحله چهارم، ایستادن روی هر دو پا (Rearing) توأم با کلونوس اندام جلویی و مرحله پنجم، ایستادن روی هر دو پا همراه با از دست دادن تعادل و افتادن (Rearing & Falling) [۱۹].

پس از اعمال تحریک کیندلینگ، امواج الکتریکی مغزی گرفته شده توسط الکتروود ثبت در آمپلی فایر تقویت و وارد کامپیوتر می‌شد. توسط برنامه کامپیوتری، کمیت های تشنجی اندازه گیری می‌گردید. این کمیت ها عبارت بود از: ۱- مدت زمان تخلیه های متعاقب (ADD)، ۲- تعداد تحریک‌های لازم تا مشاهده هر یک از مراحل تشنج و ۳- آستانه تحریک برای ایجاد امواج تخلیه متعاقب.

۲) اعمال LFS: در هر روز پس از پایان ۱۲ تحریک کیندلینگ، LFS به صورت ۸ بسته تحریکی هر ۵ دقیقه یک بار به حیوان اعمال می‌شد. مشخصات هر بسته تحریکی شامل ۲۰۰ پالس به شکل امواج مربعی با فرکانس ۱ هرتز، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و با شدت آستانه ایجاد تخلیه متعاقب بود که هر ۵ دقیقه یک بار به حیوان اعمال می‌شد.

۳) تحریک برای ثبت پتانسیل های برانگیخته میدانی: برای ثبت پتانسیل های میدانی مسیر پرفورنت تحریک شده و از سلول های گرانولی شکنج دنداندار ثبت به عمل می‌آمد. مسیر پرفورنت توسط الکتروودی که در آن کار گذاشته شده بود، تحریک می‌شد. الگوی تحریک به صورت پالس‌های مربعی با فرکانس ۱/۰ هرتز، مدت زمان هر پالس ۱۰۰ میکرو ثانیه و شدت جریان پالس آزمون، (شدتی که در آن ۵۰٪ پاسخ ماکزیمم به دست آید) بود. پس از ثبت پتانسیل‌های میدانی، شیب fEPSP و دامنه اسپایک‌های تجمعی اندازه گیری می‌شد.

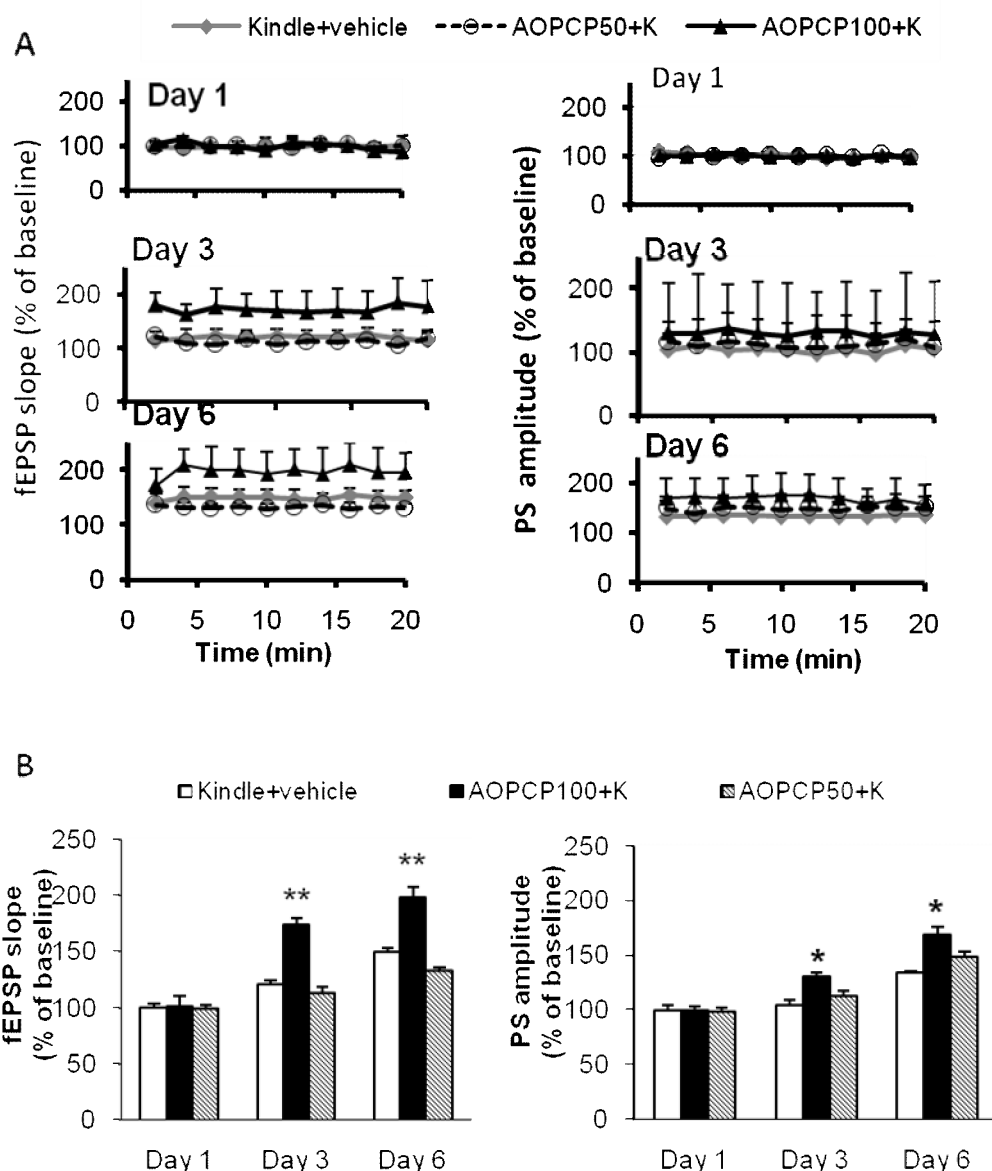
۴) تحریک برای اندازه گیری شاخص زوج پالس: برای بررسی مدارهای مهاری در ناحیه شکنج دنداندار هیپوکمپ، از تکنیک تحریک زوج پالس استفاده می‌شد. در این آزمایش‌ها زوج پالس ها با فواصل بین پالسی معین (۱۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۷۰، ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی ثانیه) با فرکانس ۱/۰ هرتز به مسیر پرفورنت اعمال می‌گردید. دامنه اسپایک تجمعی حاصل از هر یک از زوج پالس محاسبه و بر اساس آن شاخص زوج

۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوان توسط سدیم پنتوباریتال (mg/kg) ۴۰، داخل صفاقی) بیهوش شده و پس از ثابت کردن سر حیوان در دستگاه استریوتاکس و بتادینه کردن پوست سر، برشی در خط وسط با تیغ جراحی داده شد. پس از آشکار شدن کامل سطح استخوان جمجمه، و تمیز کردن آن با الکل، نقطه برگما مشخص گردید. موقعیت مسیر پرفورنت نسبت به برگما (بر حسب میلیمتر: $AP = -6.9$ و $L = +4.1$ و $V = 2.4-2.7$ نسبت به سطح سخت شامه) و همچنین شکنج دنداندار نسبت به برگما (بر حسب میلیمتر: $AP = -2.8$ ، $L = +1.8$ ، $V = 3.2$ نسبت به سطح سخت شامه) تعیین شد. موقعیت بطن جانبی راست نیز برای قرار دادن کانول راهنما مشخص گردید (بر حسب میلیمتر: $AP = -0.9$ ، $L = +1.5$ نسبت به برگما و $V = 3.2$ نسبت به سطح سخت شامه) [۱۶].

پس از بستن پیچ های لنگرگاه، الکترودهای تک قطبی و کانول راهنما، الکترودهای تحریک و ثبات به ترتیب در محل های تعیین شده برای مسیر پرفورنت و شکنج دنداندار قرار داده شد. با استفاده از استیمولاتور، تحریک الکتریکی با شدت ۵۰ میکروآمپر تا ۱ میلی آمپر از طریق الکتروود تحریک به مسیر پرفورنت اعمال گردید. در صورت قرار داشتن الکتروودها در محل مناسب از طریق الکتروود ثبات یک EPSP تجمعی (fEPSP) مشاهده می‌شد. در غیر این صورت، موقعیت الکترودهای تحریک و ثبات آن قدر تغییر داده می‌شد تا یک fEPSP با حداکثر دامنه (بین ۵-۳ میلی ولت) ثبت شود. سپس با سیمان دندانپزشکی کانول راهنما، الکتروودها و پیچ ها به جمجمه حیوان ثابت می‌گردیدند. برای بهبودی زخم ها و دست آموز شدن، ۱۰ روز به حیوان استراحت داده شد.

الگوهای تحریکی مورد استفاده در این تحقیق عبارت بود از:

۱) تحریک برای ایجاد کیندلینگ: برای ایجاد تشنج از روش کیندلینگ سریع استفاده شد. در این روش حیوانات با موج مربعی تک فاز با مشخصات فرکانس ۵۰ هرتز، شدت آستانه تولید امواج تخلیه متعاقب، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و به مدت ۳ ثانیه تحریک شدند. این تحریکات به فاصله هر ۵ دقیقه یک بار و ۱۲ بار در روز انجام شد و تا زمان نشان دادن مرحله ۵ تشنج تحریک‌ها اعمال می‌گردید. بر اساس مطالعات Racine، مراحل تشنج در روند کیندلینگ به صورت زیر تقسیم



شکل ۱- اثر تزریق AOPCP بر شیب پتانسیل های میدانی (fEPSP) و دامنه اسپایک های تجمعی (PS) در طی روند کیندلینگ (روزهای ۱، ۳ و ۶). (A) در طی روند کیندلینگ شیب پتانسیل های میدانی و دامنه اسپایک های تجمعی در گروه کیندل افزایش یافت. تزریق AOPCP با دوز ۱۰۰ میکرومولار (در گروه AOPCP ۱۰۰+K) شیب پتانسیل های میدانی و دامنه اسپایک های تجمعی را نسبت به گروه کیندل افزایش داد. تزریق این دارو با دوز ۵۰ میکرومولار در گروه AOPCP ۵۰+K اثری بر شیب پتانسیل های میدانی و دامنه اسپایک های تجمعی نسبت به گروه کیندل نداشت. (B) میانگین داده های نمایش داده شده در قسمت A در روزهای ۱، ۳ و ۶ به صورت نمودارهای ستونی آورده شده است. داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده اند. * نشان دهنده $P < 0.05$ و ** نشان دهنده $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کیندل است (در گروه کیندل و AOPCP ۱۰۰+K $n=6$ ، در سایر گروه ها $n=5$).

تزریق آن توسط پمپ میکرواینجکشن و سرنگ هامیلتون و با سرعت $1 \mu\text{l}/2 \text{ min}$ از طریق کانول به بطن طرفی مغز حیوانات صورت می گرفت. داروها قبل از تزریق از میکروفیلتر (با منافذ $2 \mu\text{m}$) عبور داده می شدند تا استریل گردند. گروه های آزمایشی مورد استفاده در این تحقیق عبارت

پالس به صورت "نسبت دامنه اسپایک تجمعی دوم به دامنه اسپایک تجمعی اول ضرب در ۱۰۰" محاسبه می شد. در این تحقیق از $\alpha, \beta\text{-methyleneadenosine } 5' \text{-diphosphate}$ (AOPCP) به عنوان مهارگر اکتو نوکلئوتیداز استفاده شد. این دارو به همراه GMP در ACSF حل شده و

بودند از:

۱) گروه کنترل: در این گروه به مدت شش روز (میانگین مدت زمان لازم برای رسیدن به مرحله ۵ در حیوانات گروه کیندل) منحنی های I/O و پتانسیل های میدانی از شکنج دنداندار مسیر پر فورنت با تک پالس و زوج پالس ثبت می شد تا اثر تحریکهای مکرر تک پالسی و زوج پالس بر پتانسیل های پس سیناپسی بررسی گردد.

۲) گروه کیندل: در این گروه روزانه ۱۲ تحریک (فرکانس ۵۰ هرتز، به مدت ۳ ثانیه و به فواصل ۵ دقیقه) به حیوانات اعمال می شد. این تحریکات تا رسیدن حیوان به مرحله ۵ ادامه می یافت. البته قبل از آغاز تحریکهای کیندلینگ همانند گروه اول ثبت پتانسیل های میدانی و زوج پالس صورت می گرفت.

۳) گروه KLFS: در این آزمایش الگوی تحریک LFS با فرکانس ۱ هرتز و بر اساس مشخصات ذکر شده در فوق در پایان تحریکهای کیندلینگ به حیوانات اعمال می شد. در این گروه آزمایشی نیز همانند گروه های قبل ثبت پتانسیل های میدانی با تک پالس و زوج پالس صورت می گرفت.

۵) گروه کیندل+حلال: در این گروه آزمایشی هر روز قبل از شروع ثبت ها حلال دارو به داخل بطن طرفی تزریق می شد و مراحل بعدی مشابه گروه کیندل صورت می گرفت.

۶) گروه KLFS+حلال: در این گروه آزمایشی هر روز قبل از شروع ثبت حلال به داخل بطن طرفی مغز تزریق می شد و مراحل بعدی مشابه گروه KLFS بود.

۷) گروه کیندل+AOPCP: در این گروه تمامی مراحل همانند گروه کیندل است اما هر روز قبل از شروع ثبت AOPCP به صورت داخل بطنی به حیوانات تزریق شد.

۸) گروه AOPCP + KLFS: در این گروه تمامی مراحل همانند گروه کیندل + LFS بود اما هر روز قبل از شروع ثبت AOPCP (آنتاگونیست اکتونوکلئوتیداز) به صورت داخل بطنی به حیوانات تزریق می شد.

برای مقایسه تأثیر LFS بر کمیت های مختلف از آزمون ANOVA دو طرفه از نوع Repeated Measures و آزمون متعاقب Tuckey برای مقایسه شاخص زوج پالس در گروه های مختلف از آزمون ANOVA یک طرفه و آزمون متعاقب Tuckey و برای مقایسه مرحله رفتاری تشنج ها نیز از آزمون

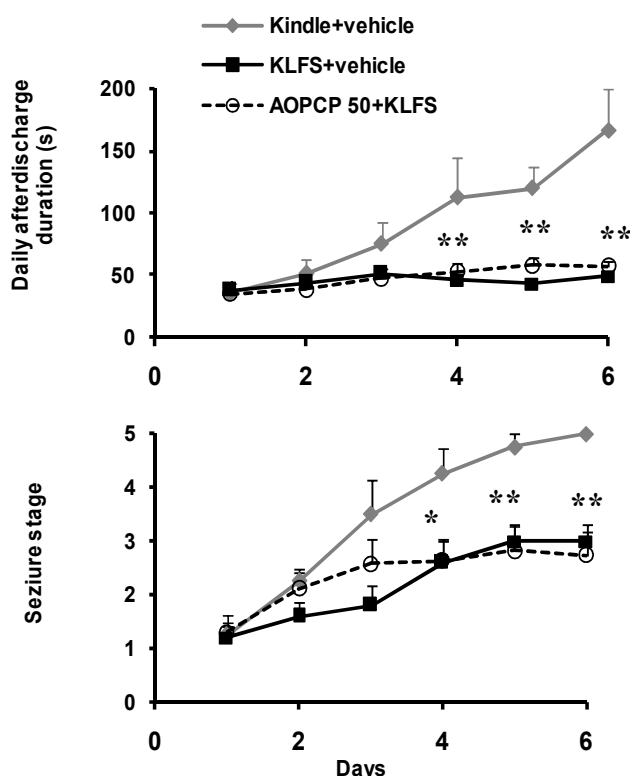
ناپارامتری Kruskal Wallis استفاده گردید. داده ها به صورت (میانگین $\pm$ خطای معیار میانگین) ارائه شده و $P < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

یافته ها

میانگین شدت تحریکات آستانه برای شروع تخلیه های متعاقب در گروه های مختلف تفاوت معنی داری نداشت و این بدین معنی است که استعداد ابتلا به حملات تشنجی در تمامی گروه ها یکسان بود. میانگین تعداد روزهای لازم برای رسیدن حیوانات گروه کیندل به مرحله ۵ تشنج 5 ± 0.7 روز بود. بنابراین، در گروه های دیگر حیوانات فقط ۶ روز تحریک داده شدند

در بررسی تأثیر AOPCP بر کمیت های تشنجی در گروه کیندل مشاهده شد که تزریق AOPCP با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار باعث تغییر معنی داری در مدت زمان تخلیه های متعاقب و مراحل تشنجی نسبت به گروه کیندل در مدت زمان تخلیه های متعاقب و مراحل تشنجی نگردید. تزریق AOPCP با دوز ۱۰۰ میکرومولار (در گروه کیندل+AOPCP) شیب پتانسیل های میدانی ($P < 0.01$) و دامنه اسپایک های تجمعی را نسبت به گروه کیندل به طور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش داد، تزریق این دارو با دوز ۵۰ میکرومولار (در گروه کیندل+AOPCP) اثر معنی داری بر شیب پتانسیل های میدانی و دامنه اسپایک های تجمعی نسبت به گروه کیندل نداشت (شکل ۱). همچنین، تزریق AOPCP با دوز ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار تغییر معنی داری در تضعیف زوج پالس اولیه، ثانویه و تسهیل زوج پالس نسبت به گروه کیندل ایجاد نکرد.

در بررسی تأثیر LFS بر کمیت های تشنجی مشاهده شد که اعمال LFS در گروه KLFS، باعث کاهش معنی داری ($P < 0.01$) در مدت زمان تخلیه های متعاقب و مراحل تشنجی در روزهای ۴، ۵ و ۶ نسبت به گروه کیندل شد (شکل ۲). مجموع کل مدت زمان تخلیه های متعاقب در گروه های KLFS $1/9 \pm 272/4$ ثانیه) نسبت به گروه کیندل $19/79 \pm 559/5$ ثانیه) نیز کاهش معنی داری ($P < 0.01$) نشان داد. همچنین در طی روند کیندلینگ شیب پتانسیل های میدانی و دامنه اسپایک های تجمعی افزایش یافت (شکل ۱) اما اعمال



شکل ۲- اثر اعمال LFS و تزریق AOPCP بر مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه و مراحل رفتاری تشنج طی روند کیندلینگ مسیر پرفورنت در حیوانات گروه KLFS. اعمال LFS در گروه KLFS، باعث کاهش معنی داری در مدت زمان تخلیه‌های متعاقب و مراحل تشنجی در روزهای ۴، ۵ و ۶ نسبت به گروه کیندل شد. تزریق AOPCP با دوز ۵۰ میکرومولار باعث تغییر معنی داری در مدت زمان تخلیه‌های متعاقب و مراحل تشنجی نسبت به گروه KLFS نگردید. * نشان دهنده $P < 0.05$ و ** نشان دهنده $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کیندل است. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده‌اند (در گروه کیندل $n=6$ ، در سایر گروه‌ها $n=5$).

گروهی از حیوانات که در روند کیندلینگ LFS دریافت می‌کردند (در گروه ۵۰+KLFS AOPCP) تغییر معنی داری بر کمیت‌های تشنجی نداشت (شکل‌های ۲-۴).

بحث

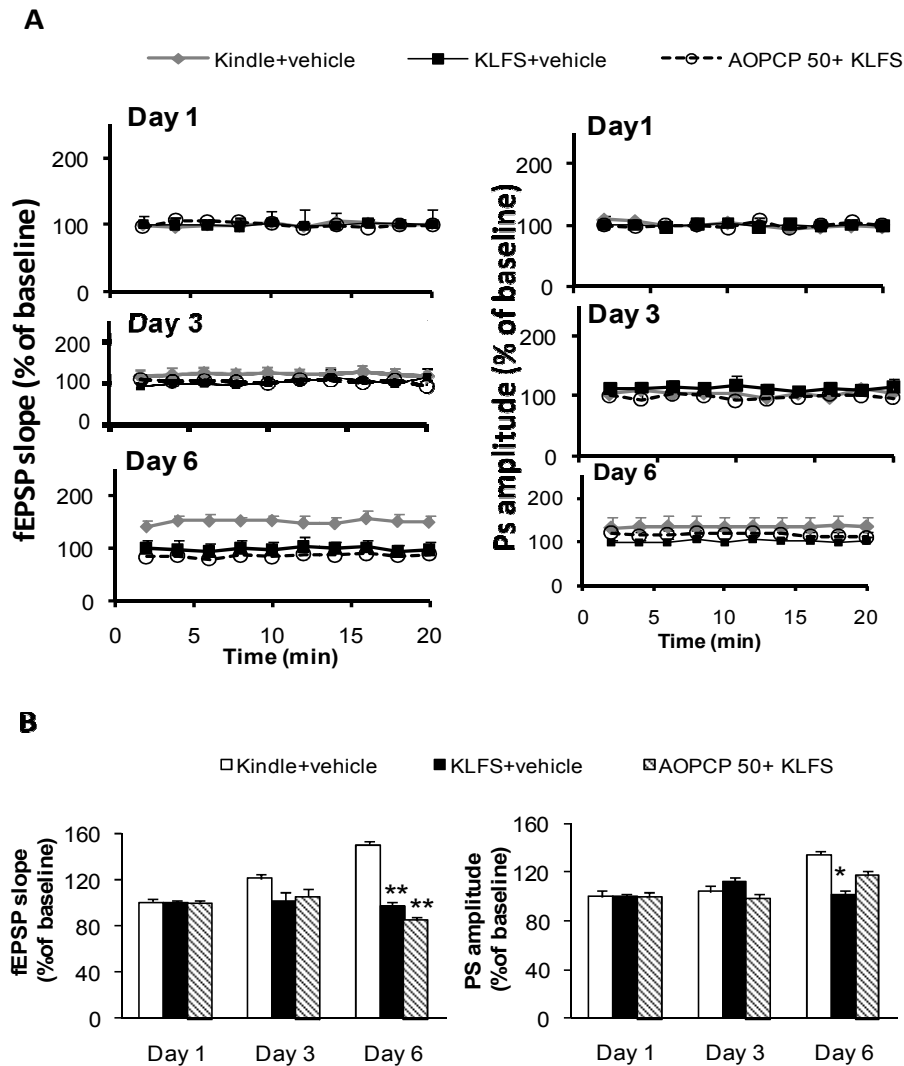
نتایج این تحقیق نشان داد که مدت زمان تخلیه‌های متعاقب، مراحل تشنجی و فعالیت سیناپسی در گروه کیندل نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشت. اعمال LFS به دنبال تحریکات کیندلینگ، باعث کاهش معنی داری در این کمیت‌ها در روزهای ۴، ۵ و ۶ نسبت به گروه کیندل شد. اما تزریق AOPCP (مهارگر اکتونوکلوئتیداز) به همراه اعمال LFS تأثیری بر این اثرات ضد تشنجی LFS نداشت.

مطالعات نشان می‌دهند که LFS باعث افزایش آستانه تشنج در کیندلینگ شده [۲۳] و همچنین مدت زمان امواج

LFS باعث کاهش معنی دار شیب پتانسیل‌های میدانی (۰.۱ $P < 0.05$) و دامنه اسپایک‌های تجمعی (۰.۵ $P < 0.05$) در طی روند کیندلینگ نسبت به گروه کیندل گردید (شکل ۳).

همانطور که قبلاً گزارش شده است در حیوانات گروه کیندل با گذشت زمان (روز ۶ نسبت به روز ۱) تضعیف زوج پالس اولیه در فواصل زمانی بین پالسی ۱۰ تا ۵۰ میلی ثانیه، و نیز تضعیف زوج پالس ثانویه در فواصل زمانی ۳۰۰ تا ۵۰۰ میلی ثانیه تقویت می‌شود. به علاوه در فواصل زمانی بین پالسی ۷۰ میلی ثانیه تسهیل زوج پالس تضعیف می‌گردد. اعمال LFS در طی روند کیندلینگ، از تضعیف تسهیل زوج پالس در فواصل زمانی بین پالسی ۵۰ تا ۱۰۰ میلی ثانیه در روز ۶ جلوگیری کرد که این تغییر در فاصله بین پالسی ۷۰ میلی ثانیه معنی دار بود (۰.۵ $P < 0.05$) (شکل ۴).

در بررسی تأثیر AOPCP بر اثرات ضد تشنجی LFS مشاهده شد که تزریق AOPCP با دوز ۵۰ میکرومولار در

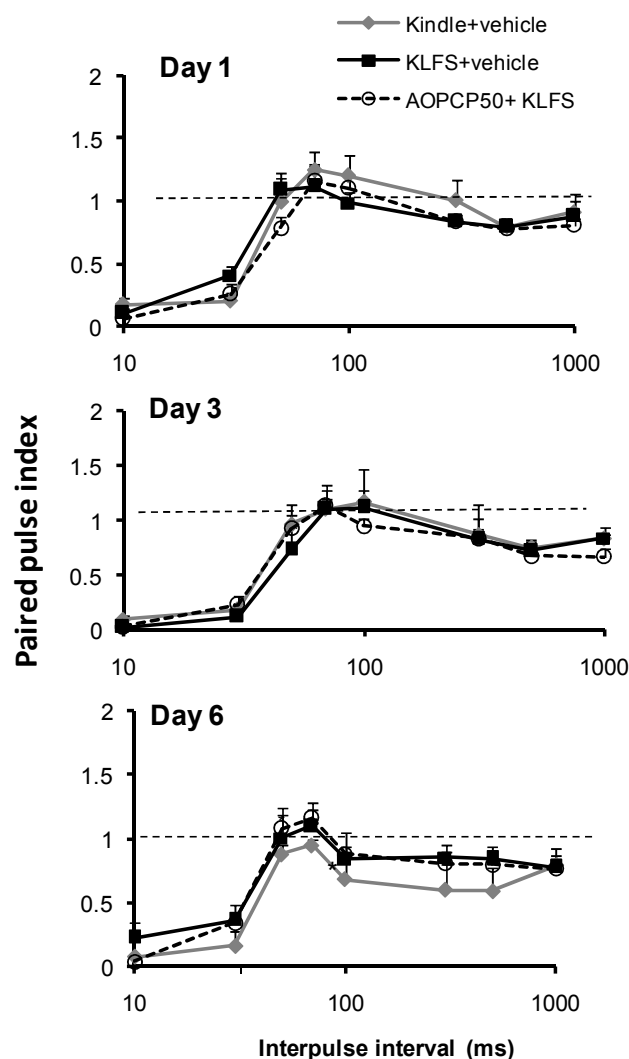


شکل ۳- اثر اعمال LFS و تزریق AOPCP بر شیب پتانسیل های میدانی (fEPSP) و دامنه اسپایک های تجمعی (PS) در روند کیندلینگ (روزهای ۱، ۳ و ۶). (A) اعمال LFS باعث کاهش شیب پتانسیل های میدانی و دامنه اسپایک های تجمعی در طی روند کیندلینگ نسبت به گروه کیندل اما تزریق AOPCP با دوز ۵۰ میکرومولار در گروهی از حیوانات که در روند کیندلینگ LFS دریافت می کردند (AOPCP ۵۰+KLFS) تغییری نسبت به گروه KLFS ایجاد نکرد. (B) میانگین داده های نمایش داده شده در قسمت A در روزهای ۱، ۳ و ۶ به صورت نمودارهای ستونی آورده شده است. داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده اند. ** نشان دهنده $P < 0.01$ و * نشان دهنده $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کیندل است (در گروه کیندل $n=6$ ، در سایر گروه ها $n=5$).

تکامل تشنج به وسیله اثرات تونیک ضد تشنجی آدنوزین مهار می شود. مطالعات نشان می دهد که میزان آدنوزین در دوره زمانی که نیاز متابولیک زیاد است، مثل شرایطی که تشنج وجود دارد، افزایش می یابد [۲].

در بدن انسان آدنوزین توسط دو مسیر آنزیماتیک تولید می شود: (۱) در داخل و یا خارج سلول به ترتیب توسط $5'$ - اندونوکلوئیداز و $5'$ - اکتونوکلوئیداز، که می توانند ATP را تبدیل به آدنوزین کنند، (۲) در داخل سلول توسط S- آدنوزیل هموسیستئین هیدرولاز، که می تواند S- آدنوزیل هموسیستئین را تبدیل به آدنوزین کند. آدنوزین تولید شده در داخل سلول

تخلیه متعاقب را کاهش می دهد [۲۴]. در مطالعات برش های زنده نیز نشان داده شده که LFS توانایی تولید تخلیه های صرعی را کاهش می دهد [۶]. به دنبال اعمال LFS رهایش آدنوزین زیاد می شود و پیشنهاد شده است که آدنوزین رها شده ممکن است مسئول مهار فعالیت سیناپسی باشد [۹]. آدنوزین یکی از اجزای ضروری سلول های زنده است و علاوه بر نقشهای متنوعی که در سلول دارد در سیگنالینگ سلولی نیز دخالت دارد و حساسیت به تشنج را نیز تنظیم می کند. در CNS آدنوزین یک نورومودلاتور قوی است و اثر مهاری بر فعالیت نورونی دارد. در مغز سالم به نظر می رسد کنترل و



شکل ۴- اثر اعمال LFS و تزریق AOPCP بر شاخص زوج پالس در روند کیندلینگ (روزهای ۱، ۳ و ۶). اعمال LFS از تقویت تضعیف زوج پالس اولیه در فواصل زمانی بین پالسی ۱۰ تا ۵۰ میلی ثانیه و تضعیف زوج پالس ثانویه در فواصل زمانی ۳۰۰ تا ۵۰۰ میلی ثانیه جلوگیری کرد. همچنین LFS از تضعیف تسهیل زوج پالس در فواصل زمانی بین پالسی ۷۰ تا ۱۰۰ میلی ثانیه در روز ۶ جلوگیری کرد. تزریق AOPCP با دوز ۵۰ میکرومولار در گروهی از حیوانات که در روند کیندلینگ LFS دریافت می کردند (AOPCP ۵۰+KLFS) تغییر معنی داری بر کمیت های تشنجی نداشت. داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده اند. * نشان دهنده $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کیندل است (در گروه کیندل $n=6$ ، در سایر گروه ها $n=5$).

در این مطالعه احتمال نقش داشتن مسیر اکتونوکلئوتیداز در افزایش آدنوزین به دنبال اعمال LFS بررسی گردید. در حین تحریک ناحیه CA1 هیپوکمپ مقدار زیادی ATP و مشتقات آدنوزین از انتهای پیش سیناپسی به فضای سیناپسی رها می شود که این رهاش وابسته به فرکانس است. همچنین نشان داده شده که ATP و مشتقات آدنوزین به عنوان کوترانسپورتر نیز از سیناپس های CA1 رها می شوند. آدنوزین اندوژن که در حین LFS و HFS رها می شود و از طریق گیرنده های A1 و A2 عمل می کند، می تواند به ترتیب تضعیف

می تواند از طریق ترانسپورترهای دوجهته به خارج سلول فرستاده شود. حذف آدنوزین نیز توسط دو مسیر آنزیماتیک صورت می گیرد: (۱) آدنوزین کیناز و (۲) آدنوزین دامیناز که به ترتیب اینوزین و 5'-AMP تولید می کنند [۴]. هنوز مشخص نیست که LFS بر کدامیک از مسیرهای تولید و یا متابولیسم آدنوزین اثر می گذارد. با توجه به نقش مسیر اکتونوکلئوتیداز در افزایش آدنوزین در طی فرایند تضعیف پس از تقویت (depotential) [۵] و با توجه به مشابهت اثرات ضد تشنجی LFS با پدیده تضعیف پس از تقویت [۲۵]،

سیناپسی طولانی مدت (LTD) و تقویت سیناپسی طولانی مدت (LTP) ایجاد کند [۸]. در همین راستا، در مطالعات قبلی نشان داده است که اعمال LFS از طریق فعال کردن گیرنده های A1 اثر مهارى بر روند کیندلینگ دارد و میزان بیان ژن گیرنده های A1 نیز به دنبال اعمال LFS در کیندلینگ افزایش می یابد [۱۵ و ۱۶]. بنابراین، اگر مسیر اکتونوکلئوتیداز در تولید آدنوزین به دنبال اعمال LFS نقش داشت، مهار این مسیر توسط AOPCP باید تا حدی اثرات ضد تشنجی LFS را کاهش می داد. اما نتایج به دست آمده هیچ گونه تفاوت معنی داری را بین گروه KLFS و گروه AOPCP+KLFS از نظر مراحل رفتاری تشنج، مدت زمان تخلیه متعاقب و شیب و دامنه پتانسیل های میدانی نشان نداد. این بدان معناست که تولید آدنوزین از این مسیر نقش مهمی را در ایجاد اثرات ضد تشنجی LFS در مدل کیندلینگ سریع مسیر پرفورنت ندارد.

البته باید در نظر داشت که با مهار اکتو نوکلئوتیداز ATP می تواند تجمع پیدا کند. شواهدی وجود دارد که ATP فعالیت تشنجی را کم می کند. تبدیل ATP به ADP، AMP و آدنوزین می شود که هر یک از این ها می توانند گیرنده خاصی را فعال کنند. ADP گیرنده P2 و AMP گیرنده P1 را فعال می کند. مطالعات نشان می دهد که افزایش ATP از طریق باعث کاهش فعالیت تشنجی می شود. همچنین فعالیت^{۵'} - نوکلئوتیداز می تواند از فعالیت مهارى ATP بر تخلیه های تشنجی جلوگیری کند [۷]. با توجه به این که مهار تولید آدنوزین از طریق مهارگر آنزیم اکتو نوکلئوتیداز می تواند باعث تجمع ATP، و به دنبال آن ADP و AMP گردد و با توجه به این که غلظت ATP در شرایط طبیعی ۵۰ برابر AMP است و تغییرات کم در غلظت ATP در شرایط طبیعی می تواند تغییرات زیادی در غلظت AMP ایجاد کند [۲۱]، AMP افزایش یافته ممکن است اثر مهارى القا کرده و باعث پوشانده شدن اثر تحریکی ایجادشده توسط مهار تولید آدنوزین با AOPCP گردد.

نتیجه دیگری که در این تحقیق به دست آمد این بود که تزریق AOPCP باعث افزایش احتمال بروز مراحل مختلف رفتاری تشنج و تقویت پاسخ های سیناپسی در طی روند کیندلینگ شد. مهار^{۵'} - نوکلئوتیداز احتمالاً جلوی افزایش آدنوزین را گرفته و از ایجاد مهار توسط آدنوزین بر تخلیه های

تشنجی ممانعت می کند. مشخص شده که آدنوزین اندوژن از طریق اثر بر گیرنده های A1 پیش سیناپسی باعث دپرسیون انتقال سیناپسی در ناحیه CA1 هیپوکمپ می شود. علاوه بر آن، گیرنده های A1 باعث کاهش دپولاریزاسیون پس سیناپسی از طریق فعال کردن کانالهای K می شوند [۱۰]. پس مهار تولید آدنوزین چنان که مشاهدات ما نشان می دهد جلوی دپرسیون انتقال سیناپسی را می گیرد. همچنین آدنوزین می تواند باعث کاهش رهايش نوروترانسمیترهای تحریکی به شکل پیش سیناپسی شود [۲۰]. بنابر این، مهار آنزیم اکتو نوکلئوتیداز توسط AOPCP احتمالاً باعث کاهش آدنوزین شده و اثرات مهارى ایجاد شده توسط آدنوزین را می کاهد. به عبارت دیگر می توان پیشنهاد کرد که تولید آدنوزین اندوژن از طریق مسیر اکتو نوکلئوتیداز نقش مهمی در روند کیندلینگ مسیر پرفورنت دارد.

در این مطالعه برای بررسی بهتر ارتباطات سیناپسی در DG، شاخص زوج پالس نیز اندازه گیری گردید. در شکنج دندانه دار، به دنبال ایجاد تشنج، تضعیف زوج پالس (Paired-pulse depression, PPD) تقویت می شود. PPD به این معنی است که پاسخ به پالس تحریکی دوم کمتر است و این منعکس کننده فعالیت های مهارى است. در جریان کیندلینگ PPD تقویت شده که این تقویت می تواند پاسخ جبرانی به کیندلینگ باشد. کاربرد AOPCP در گروه کیندل تغییر معنی داری در میزان PPD ایجاد نکرد. این نشان می دهد که مهار میزان آدنوزین تولید شده از طریق مسیر اکتو نوکلئوتیداز نمی تواند از افزایش پاسخ های مهارى در حین کیندلینگ جلوگیری کند و ایجاد این پاسخ ها تحت تأثیر این مسیر نیست.

لازم به ذکر است که همانند گزارش های قبلی، در این مطالعه نیز اعمال LFS باعث جلوگیری از تقویت PPD و PPF شد و از تقویت این مدارهای نورونی مهارى جلوگیری به عمل آورد. تزریق AOPCP به همراه اعمال LFS هیچ تأثیری بر این اثرات LFS نداشت و شاخص زوج پالس در گروه AOPCP+KLFS تغییر معنی داری نسبت به گروه KLFS نداشت. این نیز به این معناست که افزایش آدنوزین در اثر LFS احتمالاً از طریق مسیر^{۵'} - نوکلئوتیداز صورت نمی گیرد. بر اساس اطلاعات حاصل از این آزمایش می توان پیشنهاد کرد که مسیر تولید آدنوزین توسط آنزیم اکتو

دیدگاه بهتری رادر این زمینه فراهم نماید.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از صندوق حمایت از پژوهشگران کشور و معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس برای حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی به عمل می آورند.

نوکلئوتیداز، در ایجاد آدنوزین اندوژن و جلوگیری از روند صرع زایی می تواند نقش داشته باشد اما این مسیر آنزیمی در تولید آدنوزینی که به دنبال LFS در مغز افزایش می یابد احتمالا نقش نداشته یا اثر آن به حدی کم است که توسط عوامل جانبی مثل افزایش ATP (به دنبال مهار آنزیم اکتو نوکلئوتیداز) پوشانده می شود. مطالعات تکمیلی از جمله اندازه گیری میزان آدنوزین و ATP در آزمایش های صورت گرفته می تواند

References

- [1] Amaral D, Lavenex P, Hippocampal Neuroanatomy. In: *The hippocampus*. Oxford University; 2006, p.37-109.
- [2] Berman RF, Fredholm BB, Aden U, O'Connor WT, Evidence for increased dorsal hippocampal adenosine release and metabolism during pharmacologically induced seizures in rats. *Brain Res* 872(2000) 44-53.
- [3] Boison D, Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. *Neuroscientist* 11 (2005) 25-36.
- [4] Borowiec A, Lechward K, Tkacz-Stachowska K, Sktadanowski C, Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5-nucleotidase. *Acta Biochim Pol* 53(2006) 269-278.
- [5] Chiung-Chun Huang, Ying-Ching Liang, Hsu K-S, A Role for Extra cellular Adenosine in Time-Dependent Reversal of Long-Term Potentiation by Low-Frequency Stimulation at Hippocampal CA1 Synapses. *Neuroscience* 22(1999) 9728-9738.
- [6] dArcangelo G, panuccio G, tancredi V, Avoli M, Repetitive Low-frequency stimulation reduces epileptiform synchronization in limbic neuronal networks. *Neurobiol Dis* 19(2005) 119-128.
- [7] Fiona M, Martin J, Brodie & Trevor W, Stone, Adenosine monophosphate as a mediator of ATP effect at P1 purinoceptor. *Br J Pharmacol* 124 (1998) 818-824.
- [8] Fujii S, Kuroda Y, Ito K, Kaneko K, Kato H, Effects of adenosine receptors on the synaptic and EPSP-spike components of long-term potentiation and depotentiation in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol* 521 (1999) 451-466.
- [9] Fujii S, Kuroda Y, Ito KL, Yoshioka M, Kaneko K, Yamazaki Y, Sasaki H, Kato H, Endogenous adenosine regulates the effects of low-frequency stimulation on the induction of long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Neurosci Let* 279(2000) 121-12.
- [10] Haas HL, Selbach O, Functions of neuronal adenosine receptors. *Pharmacol Toxicol* 362(2000) 375-38.
- [11] Jahanshahi A, Mirnajafi-Zadeh J, Mi J, The antiepileptic effect of electrical stimulation at different low frequencies is accompanied with change in adenosine receptors expression in rats. *Epilepsia* 50(2009) 1768-1779.
- [12] McNamara J O, Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci* 14(1994) 3413-3425.
- [13] McNamara J O, Pursuit of the mechanism of kindling. *Trends Neurosci* 11(1988)33-36.
- [14] McNamara J O, Byrne MC, Dasheiff RM, Fitz JG, The kindling model of epilepsy. *Prog Neurobiol* 15(1980) 139-159.
- [15] Mohammad-Zadeh M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Javan M, The role of adenosine receptors in inhibitory effect of low frequency stimulation on kindling acquisition in the dentate gyrus in rats. *Neuroscience* 158(2009) 1632-1643.
- [16] Paxinos g, Watson c, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th edition, San Diego: Elsevier 2007.
- [17] Peterson SL, Albertson TE, Neurotransmitter and neuromodulator function in the kindled seizure and state. *Prog Neurobiol* 19(1982) 237-270.
- [18] Pritchard TC, Alloway KD, Limbic system. *Med Neurosci*. 15(1999) 369-390.
- [19] Racine RJ, Gartner JG, Burnham WM, Epileptiform activity and neural plasticity in limbic structures. *Brain*

- Res* 47 (1972) 262-8.
- [20] RIBEIRO J.A, Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. *Pharmacol Toxicol* 77(1995) 299-305.
- [21] Sawynok J, Liu XJ, Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol* 69(2003) 313-340.
- [22] Schiller Y, Bankirer Y, Cellular mechanisms underlying antiepileptic effects of low- and high-frequency electrical stimulation in acute epilepsy in neocortical brain slices in vitro. *J Neurophysiol* 97(2007) 887-1902.
- [23] Ullal GR, Ninchoji T, Uemura K, Low frequency stimulation induces an increase in after discharge threshold in hippocampal and amygdala kindling. *Epilepsy Res* 3(1989) 233-235.
- [24] Velisek L, Veliskova J, Stanton PK, Low frequency stimulation of the kindling focus delays basolateral amigdala kindling in immature rats. *Neurosci Let* 326 (2002) 61-63.
- [25] Weiss SR, Li XL, Rosen JB, Li H, Heynen T, Post RM, Quenching: inhibition of development and expression of amygdala kindled seizures with low frequency stimulation. *Neuroreport* 16(1995) 2171-2176.