



The role of adenosine A₁ receptors in post seizure depression period in rats

Tahereh Zeinali¹, Javad Mirnajafi-Zadeh^{3*}, Vahid Sheibani³, Mahdi Abbasnejad¹, Mohammad Reza Palizvan⁴

1. Dept. Biology, Faculty of Sciences, Shaheed Bahonar University, Kerman, Iran

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

3. Neuroscience Research Centre, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

4. Dept. Physiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Abstract

Introduction: Epilepsy is among the most common disorders of the central nervous system and there is not an absolute method for its treatment. It has been shown that each seizure has a depressing effect on the following seizure. Thus, finding the mechanisms responsible in this phenomenon can improve our knowledge toward new ways for epilepsy treatment. In this study, the role of adenosine A₁ receptors in post seizure depressing period was investigated in amygdala kindling model of epilepsy.

Methods: Rats were kindled by daily electrical stimulation of amygdala. At first, different groups of kindled animals were stimulated at different times after the first stimulation and the percent of suppression of seizure parameters were calculated. Then, 8-cyclopentyl-1, 3-dimethylxanthine (CPT), a selective adenosine A₁ receptor antagonist (50 and 200 μM) were intracerebroventricularly microinjected before the second stimulation and its effect on percent of suppression induced by the first stimulation was investigated.

Results: In the second stimulation, applied at 10 and 30 min after the first stimulation, the seizure parameters were significantly reduced. CPT microinjection (50 and 200 μM) significantly decreased the percent of suppression of seizure parameters. This decrease was significant at 10 and 30 min after the first stimulation with compare to the groups received the drug solvent.

Conclusion: Obtained results showed that endogenous adenosine has a role in post seizure depression period through A₁ receptors. As the blocking of A₁ receptors by CPT could not completely prevent this period, other factors may also play role in this suppression.

Keywords: Epilepsy; Kindling; Post seizure suppression; Adenosine

* Corresponding Author Email: mirnajaf@modares.ac.ir
Available online @: www.phypha.ir/ppj

نقش گیرنده‌های آدنوزینی در دوره "تضعیف پس از تشنج" در موش صحرائی

طاهره زینلی^۱، سید جواد میر نجفی زاده^{۳*}، وحید شبانی^۳، مهدی عباس نژاد^۱، محمد رضا پالیزوان^۴

۱. بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

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

۳. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان

۴. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک

دریافت: مرداد ۸۶ بازبینی: مهر ۸۶ پذیرش: آبان ۸۶

چکیده

مقدمه: صرع یکی از شایعترین اختلالات سیستم اعصاب مرکزی است که روش درمان قطعی برای آن پیدا نشده است. نشان داده شده است که هر تشنج اثری تضعیفی بر روی تشنج بعدی دارد؛ بنابراین، شناخت دقیق مکانیسم‌های دخیل در این پدیده می‌تواند دانش ما را برای یافتن راهکارهای بهتر برای درمان صرع بهبود بخشد. در این تحقیق نقش گیرنده‌های آدنوزینی A₁ در دوره تضعیفی پس از تشنج در مدل صرعی کیندلینگ آمیگدال مطالعه شد.

روش‌ها: حیوانات با تحریک الکتریکی آمیگدال کیندل شدند. ابتدا، در گروه‌های مختلف حیوانات کیندل شده در زمان‌های مختلف پس از تحریک اول، تحریک دوم اعمال شد و درصد تضعیف کمیت‌های تشنجی پس از تحریک دوم محاسبه گردید. سپس ۱ و ۳ - دی متیل - ۸ - سیکلوپنتیل گزانتین (CPT)، آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های آدنوزینی A₁، قبل از تحریک دوم به داخل بطن مغز تزریق شد اثر آن بر درصد تضعیف ناشی از تحریک اول بررسی گردید.

یافته‌ها: اعمال تحریک دوم در فواصل زمانی ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول کاهش معنی داری در کمیت‌های تشنجی ایجاد کرد. تزریق CPT با دوزهای ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار درصد تضعیف کمیت‌های تشنجی به دنبال تحریک اول را بطور معنی داری کاهش داد. کاهش درصد تضعیف این کمیت‌ها در زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول در گروه‌های دریافت کننده CPT نسبت به گروه دریافت کننده حلال دارو معنی دار بود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق فعالیت آدنوزین اندوژن از طریق گیرنده‌های A₁ را در ایجاد دوره تضعیفی پس از تشنج نشان می‌دهد؛ اما با توجه به اینکه مهار گیرنده‌های A₁ توسط CPT بطور کامل این دوره تضعیفی را از بین نمی‌برد، عوامل دیگری نیز در ایجاد آن نقش دارند.

واژه‌های کلیدی: صرع، کیندلینگ، تضعیف پس از تشنج، آدنوزین

مقدمه

تحقیق و بررسی در زمینه هر پدیده‌ای، در مورد صرع نیز از مدل‌های مختلفی از جمله کیندلینگ الکتریکی استفاده می‌شود. در این مدل، تحریکات الکتریکی ضعیف با فواصل زمانی مشخص به منطقه خاصی از مغز اعمال می‌شود و این تحریکات به مرور زمان سبب رفتار تشنجی کلینیکی در حیوان می‌گردند [۱۲، ۱۸]. کیندلینگ به عنوان مدل مناسبی برای صرع موضعی پیچیده که شایعترین نوع صرع در انسان می‌باشد، معرفی شده

صرع یکی از شایعترین اختلالات سیستم اعصاب مرکزی است که به دلیل عدم شناخت دقیق مکانیسم‌های مسئول، هنوز روش درمان قطعی برای آن پیدا نشده است [۲، ۱۳، ۳۴]. همانند

mirnajaf@modares.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

از بیهوش کردن، حیوان درون دستگاه استریوتاکسی قرار می‌گرفت. براساس اطلس Paxinos و Watson [۲۸] مختصات محل کارگذاری الکتروود سه قطبی در آمیگدال (۲/۵ میلی متر به عقب، ۴/۸ میلی متر به سمت راست نسبت به برگما و ۷/۵ میلی متر پایین‌تر از سخت شامه) و مختصات محل کارگذاری کانول راهنما در بطن جانبی (۱/۰ میلی متر به عقب، ۱/۲ میلی متر به سمت راست نسبت به برگما و ۳/۶ میلی متر زیر سخت شامه) مشخص گردید. دو الکتروود تک قطبی به عنوان الکتروودهای earth و differential، توسط پیچ‌های متصل به آنها بر روی جمجمه محکم شدند. دو پیچ دیگر نیز در دو نقطه دیگر از جمجمه بسته می‌شد تا به استحکام سیمان دندانپزشکی روی سطح جمجمه کمک کند. پس از پایان کارگذاری الکتروودها و کانولها، پین‌های متصل به الکتروودها وارد مادگی سوکت مخابراتی شده و سوکت بوسیله سیمان دندانپزشکی روی سطح جمجمه متصل می‌گردید.

حداقل یک هفته بعد از جراحی، حیوانات با شدت جریان آستانه تحریک می‌شدند. برای تحریک حیوان از موج مربعی تک فازی با تواتر ۶۰ هرتز که مدت زمان هر فاز موج ۱ میلی ثانیه بود استفاده می‌شد که این تحریک هر بار به مدت ۲ ثانیه به حیوان اعمال می‌گردید. برای به دست آوردن شدت آستانه، ابتدا حیوان توسط جریانی به شدت ۱۰ میکرو آمپر تحریک می‌گردید. در صورتیکه امواج تخلیه متعاقب (حداقل به مدت ۵ ثانیه) ثبت می‌شدند، این شدت جریان به عنوان شدت جریان آستانه شناخته می‌شد. در غیر این صورت، به تدریج شدت جریان هر بار ۱۰ میکرو آمپر، با فواصل ۵ دقیقه‌ای افزایش داده می‌شد تا اینکه اولین تخلیه‌های متعاقب ثبت گردد. سپس حیوانات هر ۲۴ ساعت یک بار با همین شدت جریان آستانه تحریک می‌شدند تا مراحل مختلف تشنج را نشان داده و 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- تکان دادن سر به طرف بالا و پایین، مرحله ۳- کلونوس یک اندام جلویی (که در سمت مخالف ناحیه تحریک شده می‌باشد)، مرحله ۴- ایستادن روی دو اندام عقبی، همراه با کلونوس دو اندام جلویی، مرحله ۵- ایستادن روی دو اندام عقبی، از دست دادن تعادل و به زمین خوردن [۳۱]. هنگامی که حیوان ۵ بار مرحله ۵ تشنج را نشان داد و کمیتهای تشنجی ثابت گردیدند، آماده انجام آزمایش می‌شد.

است [۳]. این نوع صرع غالباً از لوب گیجگاهی و بویژه سیستم لیمبیک منشأ می‌گیرد [۱۳، ۳۴]. در میان اجزای سیستم لیمبیک و ساختارهای مربوطه، آمیگدال با تعداد تحریکات کمی کیندل می‌شود و مدارک زیادی در زمینه نقش آن در تولید، گسترش و تداوم حملات تشنجی وجود دارد [۱۵، ۱۹].

هر چند در هنگام ایجاد پدیده کیندلینگ وقوع هر تشنج باعث تسهیل وقوع تشنج بعدی می‌شود، اما ثابت شده است که کیندلینگ با دوره‌های تضعیفی نیز همراه می‌باشد [۲۲]. Goddard و همکارانش نشان دادند که با کاهش فاصله بین دو تحریک، پدیده کیندلینگ رخ نمی‌دهد و نیز هر تشنج کیندلینگ اثری تضعیفی بر روی تشنج بعدی دارد [۱۲]. علت این پدیده هنوز به درستی مشخص نشده است، اما احتمالاً فعال شدن برخی سیستمهای نوروترانسمیتری و یا نورومودولاتوری در این پدیده نقش دارد.

یکی از این سیستمها، سیستم پورینرژیک است که روی فعالیت نورونها اثرات تعدیلی اعمال می‌کند. این سیستم نقش مهمی در تولید و یا توقف حملات تشنجی بازی می‌کند [۳۴]. آدنوزین به عنوان یکی از اجزای این سیستم، یک تعدیل کننده نورونی درون زاد است که دارای اثرات مهارتی روی عمل مغز می‌باشد [۵، ۱۷]. در وضعیتهای پاتولوژیک نظیر ایسکمی مغزی، ضربات وارده به سر و تشنج، غلظت آدنوزین به سرعت افزایش می‌یابد [۳۳، ۳۷]. به نظر می‌رسد که این افزایش غلظت آدنوزین در خاتمه دادن به تشنج، دپرسیون پس از حمله و محافظت مغز در برابر اسیدهای آمینه تحریکی آزاد شده در جریان تشنج نقش مهمی داشته باشد [۴].

بنابراین، احتمال دارد رهایش آدنوزین که به دنبال هر حمله تشنجی رخ می‌دهد [۳۳، ۳۷]، در بوجود آمدن دوره تضعیف پس از تشنج نیز نقش داشته باشد. برای بررسی این موضوع، در این تحقیق با استفاده از آنتاگونیست گیرنده‌های آدنوزینی A_1 ، نقش این گیرنده‌ها در دوره تضعیفی پس از تشنج در مدل صرعی کیندلینگ آمیگدال مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام آزمایش‌ها از موشهای صحرایی نر از نژاد Dawley – Sprague در محدوده وزنی ۳۵۰ - ۳۰۰ گرم استفاده شد. برای بیهوش کردن حیوان از کتامین (۱۰۰ mg/kg) و رامپون (۱۲mg/kg) به صورت تزریق داخلی صفاقی استفاده گردید. پس

پس از پایان هر آزمایش جهت اطمینان از قرار داشتن الکتروود و کانول در محل مورد نظر، مغز حیوانات خارج و در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. بعد از یک هفته از محل الکتروود و کانول برش گیری به عمل آمده تا محل الکتروود و کانول مشخص گردد. فقط داده‌های حاصل از حیواناتی که الکتروود و کانول آنها در موقعیت مناسب قرار داشت، مورد استفاده قرار می‌گرفت.

داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (SEM) بیان شده اند. مقایسه داده‌های حاصل از تحریک اول و دوم در گروه کنترل با آزمون t زوجها و یا آزمون Wilcoxon انجام گرفت. برای بررسی تاثیر CPT بر میزان تضعیف پس از تشنج، کمیتهای تشنجی حاصل از تحریک دوم بر حسب درصد کاهش کمیتهای تشنجی نسبت به تحریک اول محاسبه و با استفاده از آزمون ANOVA دوطرفه و آزمون Tukey، تغییرات این کمیتهای در فواصل زمانی مختلف بین دو تحریک، مقایسه گردید. برای مقایسه مراحل مختلف تشنج در فواصل زمانی مختلف بین دو تحریک از آزمون ناپارامتری Kruskal Wallis و Mann Withney U-test استفاده شد. در هر مورد سطح معنی دار آماری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

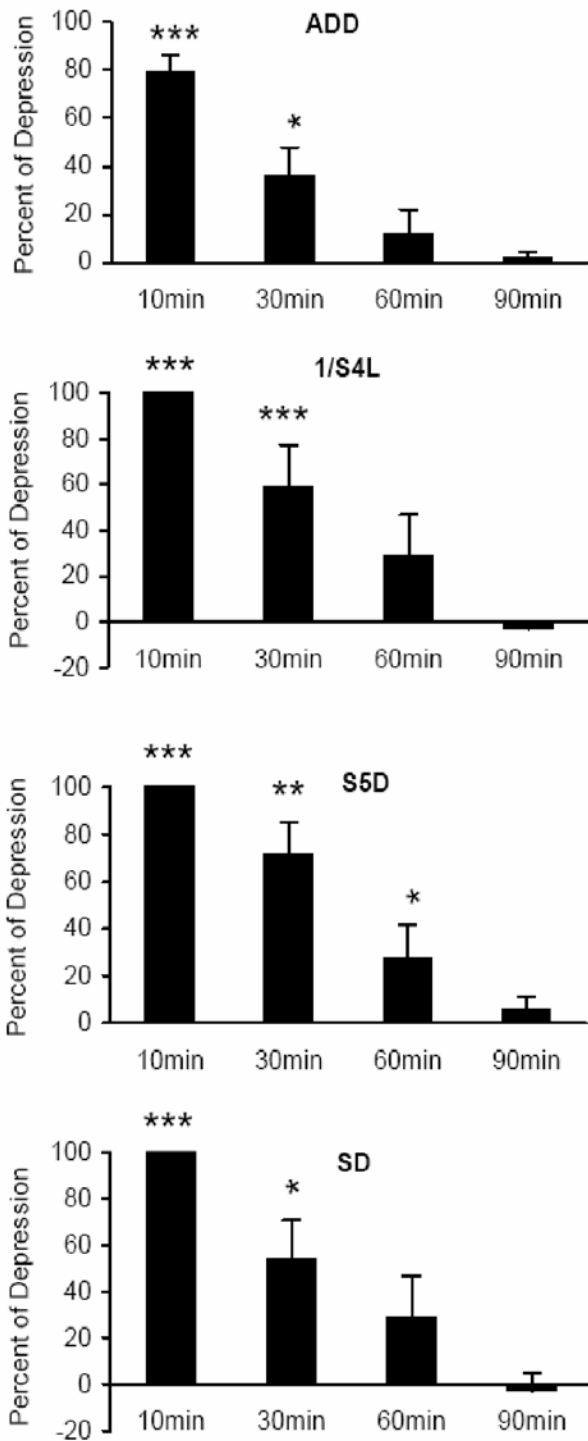
در تمامی آزمایش‌ها تزریق داخل بطن مغزی ACSF تفاوت معنی داری نسبت به گروه کنترل (گروه اول) در کمیت‌های تشنجی به وجود نیامد و هیچ تغییری در رفتار حرکتی و فعالیت صرعی حیوان ایجاد نکرد. ارزیابی بافت شناسی نشان داد که الکتروودها و کانول در موقعیت خود (آمیگدال و بطن جانبی) قرار داشتند. داده‌های حاصل از گروه کنترل نشان داد که اگر تحریک دوم در فواصل زمانی ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول باشد، کاهش معنی داری در تمام کمیتهای تشنجی ایجاد می‌شود (شکل ۱). به علت اینکه در این دو فاصله زمانی بعضی از حیوانات به مرحله ۴ تشنج نمی‌رسیدند، کمیت S4L آنها برابر با بینهایت می‌شد و لذا نمی‌توان از این کمیت در محاسبات آماری استفاده کرد. برای حل این مشکل از کمیت 1/S4L استفاده شد. چنانچه حیوانی به مرحله ۴ نمی‌رسید، 1/S4L آن برابر با صفر می‌شد. کاهش معنی دار کمیت 1/S4L در فواصل زمانی ۱۰ و ۳۰ دقیقه

پس از هر بار تحریک حیوان، کمیتهای تشنجی زیر ثبت و اندازه‌گیری می‌شدند: مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (Afterdischarge duration: ADD)، مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۴ تشنج (Stage4 latency: S4L)، مدت زمان مرحله ۵ تشنج (Stage5 duration: S5D)، مدت زمان حمله تشنج (Seizure duration: SD) و مرحله حمله (Seizure stage: SS).

در این تحقیق از ۸- سیکلوپنتیل-۱،۳- دی متیل گزانتین (8-Cyclopenthy-1,3-dimethyl-xanthine ;CPT) (خریداری شده از شرکت RBI) به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های A_1 آدنوزین استفاده شد. برای تزریق CPT به داخل بطن مغز، پس از توزین آن به مقدار لازم، در مایع مغزی- نخاعی مصنوعی (ACSF) حل می‌گردید. برای تهیه ACSF مواد تشکیل دهنده آن، برحسب غلظتشان، در حجم خاصی از آب مقطر حل می‌شدند. این مواد عبارتند از: NaH_2PO_4 (۱/۲۵ mM)، KCl (۳ mM)، $NaHCO_3$ (۲۶ mM) و گلوکز (۱۰ mM).

به منظور استریل کردن، دارو از میکرو فیلتر ($0.2 \mu m$) گذرانده می‌شد. میزان تزریق دارو ۱ میکرو لیتر در دو دقیقه در داخل بطن مغزی بود. حیوانات ۵ دقیقه پس از تزریق داخل بطن مغزی تحریک شدند و کمیتهای تشنجی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

حیواناتی که به مرحله کیندیلینگ کامل رسیدند، به چهار گروه تقسیم شدند. در گروه اول (گروه کنترل) حیوانات با شدت آستانه تحریک و مرحله ۵ تشنج را نشان دادند؛ سپس به چهار زیر گروه تقسیم شدند. در زیر گروه‌های اول تا چهارم، حیوانات به ترتیب ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه پس از تحریک اول مجدداً تحریک شده و کمیتهای تشنجی آنها اندازه‌گیری و بر حسب درصد کاهش پاسخ (درصد تضعیف) نسبت به تحریک اول محاسبه گردید. در گروه‌های دوم و سوم نیز ابتدا حیوانات با شدت آستانه تحریک و مرحله ۵ تشنج را نشان دادند. سپس حیوانات به چهار زیر گروه تقسیم و همانند گروه اول در زمانهای مختلف تحریک شدند، اما در این گروه‌ها، ۱۰ دقیقه قبل از تحریک دوم به حیوانات CPT با دوزهای ۵۰ (گروه دوم) و ۲۰۰ (گروه سوم) میکرومولار به صورت داخل بطن مغزی تزریق شد. در گروه چهارم مراحل آزمایش همانند گروه‌های دوم و سوم بود، با این تفاوت که به حیوانات ACSF به طریق داخل بطن مغزی تزریق گردید.



شکل ۱- تاثیر فاصله زمانی بین دو تحریک بر درصد تضعیف ناشی از تحریک اول. همانگونه که در شکل مشاهده می‌شود، کاهش فاصله زمانی به ۳۰ دقیقه یا کمتر باعث تضعیف کمیت‌های تشنجی در تحریک دوم می‌شود. فقط در مورد کمیت S5D، در فاصله زمانی ۶۰ دقیقه نیز کاهش معنی داری ایجاد شده است. مقادیر به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین و بر حسب درصد تضعیف نسبت به تحریک اول می‌باشند. * نشان دهنده $P < 0.05$ ، ** نشان دهنده $P < 0.01$ و *** نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با کنترل مربوطه است. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ سر است.

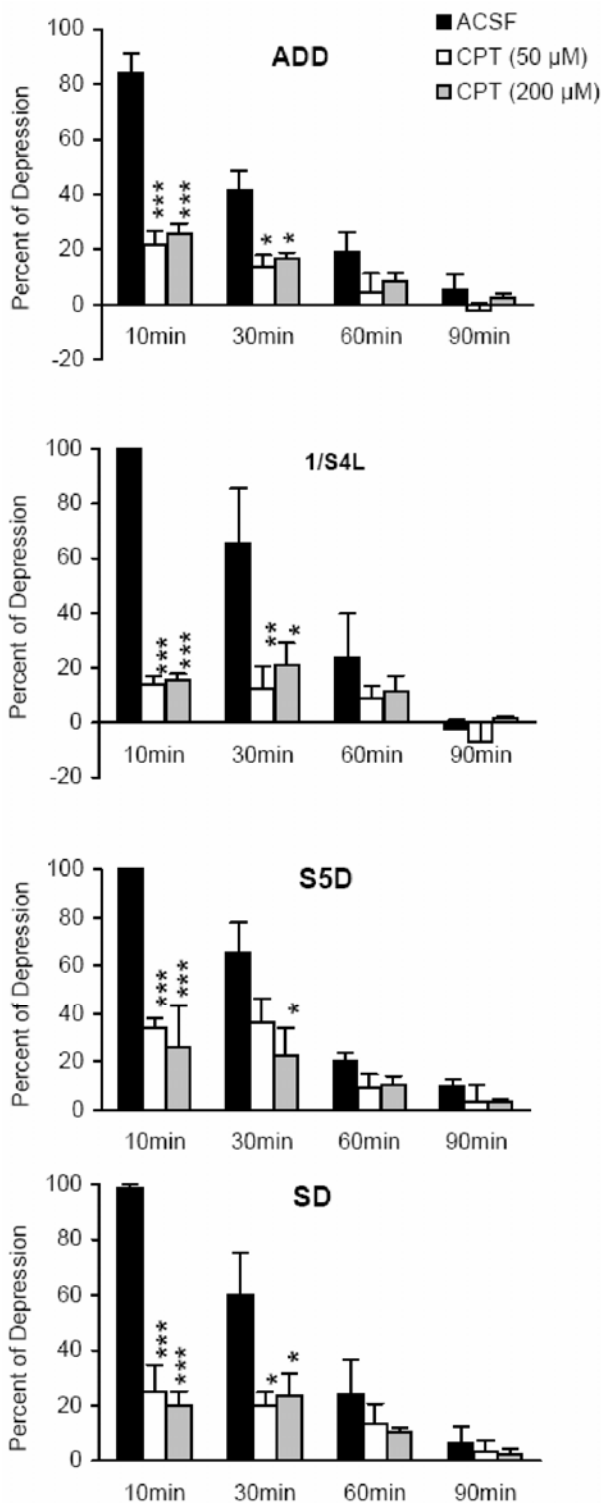
پس از تحریک اول، به مفهوم افزایش S4L و در نتیجه کاهش شدت تشنج می‌باشد. با افزایش فاصله زمانی بین دو تحریک از میزان این کاهش در شدت تشنج کاسته شد؛ به طوریکه در فاصله زمانی ۶۰ دقیقه پس از تحریک اول، این تفاوت فقط در کمیت S5D دیده شد و در فاصله زمانی ۹۰ دقیقه پس از تحریک اول، این تفاوت از بین رفت (شکل ۱). این بدان معنی است که پس از ۹۰ دقیقه تضعیف کاملاً حذف شده است.

مرحله حمله تشنجی در تمام حیوانات پس از تحریک اول 5 ± 0 بود. هنگامی که تحریک دوم در فاصله زمانی ۱۰ دقیقه بعد از تحریک اول اعمال شد، حیوانات هیچ مرحله حمله‌ای را نشان ندادند ($P < 0.05$). در فاصله زمانی ۳۰ دقیقه، که مرحله حمله تشنجی در حیوانات به $1/5 \pm 0/9$ رسید، باز هم تفاوت معنی دار بود ($P < 0.05$). در فواصل زمانی ۶۰ دقیقه (مرحله حمله = $4/4 \pm 0/4$) و ۹۰ دقیقه (مرحله حمله = 5 ± 0) تفاوت معنی داری بین دو تحریک وجود نداشت.

تزریق حلال داروها تاثیر معنی داری بر پاسخهای به دست آمده نداشت و مقایسه آماری درصد کاهش کمیت‌ها در گروه دریافت کننده ACSF با گروه کنترل تفاوت معنی داری را نشان نداد. تزریق CPT نیز تاثیر معنی داری بر کمیت‌های تشنجی نداشت و در فاصله زمانی ۹۰ دقیقه همانند گروه‌های کنترل و ACSF تغییری در این کمیت‌ها ایجاد نکرد. مطالعات قبلی ما نیز حاکی از عدم ایجاد تاثیر CPT بر کمیت‌های تشنجی در زمان‌های مختلف پس از تشنج می‌باشد [۱،۲۰].

آزمون تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه نشان داد که تزریق CPT با دوزهای ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار درصد تضعیف کمیت ADD به دنبال تحریک اول را بطور وابسته به دارو \times زمان ($F_{(56,6)} = 7/86$ و $P < 0.001$) بطور معنی داری کاهش داد. آزمون Tukey نشان داد که کاهش درصد تضعیف ADD در زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول در گروه‌های دریافت کننده CPT نسبت به گروه ACSF معنی دار بوده است (شکل ۲).

تزریق CPT درصد تضعیف کمیت 1/S4L به دنبال تحریک اول را نیز بطور معنی داری کاهش داد. آزمون تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه نشان داد که این اثر وابسته به دارو \times زمان ($F_{(56,6)} = 5/79$ و $P < 0.001$) می‌باشد. آزمون Tukey نشان داد که کاهش درصد تضعیف 1/S4L در زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول در گروه‌های دریافت کننده CPT نسبت به



شکل ۲- تاثیر تزریق داخل بطن مغزی CPT با دوزهای ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار بر درصد تضعیف کمیت‌های تشنجی در فواصل مختلف پس از تشنج. CPT درصد تضعیف ایجاد شده در تمامی کمیت‌های تشنجی در زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول را بطور معنی داری کاهش داد. هیچ گونه تفاوت معنی داری بین دو دوز CPT مشاهده نشد. مقادیر به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین و بر حسب درصد تضعیف نسبت به تحریک اول می‌باشند. * نشان دهنده $P < 0.05$ ، ** نشان دهنده $P < 0.01$ و *** نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با گروه ACSF است. تعداد حیوانات در هر گروه ۵-۶ سر است.

گروه ACSF معنی دار بوده است (شکل ۲). همانگونه که قبلاً گفته شد، کاهش کمیت 1/S4L به مفهوم افزایش S4L (و کاهش شدت تشنج) است.

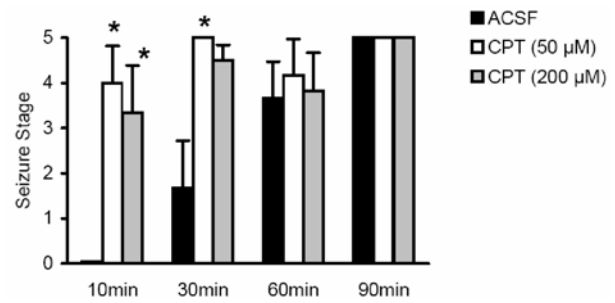
همچنین، آزمون تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه نشان داد که تزریق CPT درصد تضعیف کمیت S5D و SD به دنبال تحریک اول را بطور وابسته به دارو \times زمان ($F_{(56,6)}=4/41$ و $F_{(56,3)}=5/69$ و $P < 0.001$ برای S5D و $P < 0.001$ برای SD) بطور معنی داری کاهش داد. آزمون Tukey نشان داد که کاهش درصد تضعیف ADD در زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول در گروه‌های دریافت کننده CPT نسبت به گروه ACSF معنی دار بوده است. البته در زمان ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول، کاهش در کمیت S5D، فقط با دوز ۲۰۰ میکرومولار CPT بطور معنی دار ایجاد شد (شکل ۲). آزمون Kruskal Wallis نیز نشان داد که تزریق CPT از کاهش کمیت SS در زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول بطور معنی دار جلوگیری کرد ($P < 0.05$ ، شکل ۳).

در زمان‌های ۶۰ و ۹۰ دقیقه پس از تحریک اول تفاوت معنی داری در درصد تضعیف ناشی از تحریک اول بین گروه دریافت کننده ACSF و گروه‌های دریافت کننده CPT وجود نداشت (شکل ۲).

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که فعالیت گیرنده‌های آدنوزینی A_1 در ایجاد دوره تضعیف پس از تشنج نقش دارد و جلوگیری از فعالیت این گیرنده‌ها باعث کاهش شدت تضعیف به دنبال وقوع یک حمله تشنجی می‌شود.

در این تحقیق درصد تضعیف پس از تشنج در چهار فاصله زمانی ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه اندازه‌گیری شد و مشخص شد که هر چه زمان بیشتری از تحریک اول بگذرد و فاصله زمانی بین دو تحریک بیشتر شود در صد تضعیف پس از تشنج کمتر می‌شود. به این ترتیب، در زمان ۱۰ دقیقه پس از تحریک اول، در صد تضعیف پس از تشنج بسیار بالا بود و وقتی فاصله بین دو تحریک به ۹۰ دقیقه باشد تضعیف پس از تشنج به طور کامل از بین می‌رود. بر اساس مطالعات گذشته، در حیوانات بالغ دوره تضعیفی پس از تشنج به دنبال تحریک سیستم لیمبیک حداقل ۲۰ دقیقه طول می‌کشد [۳۶]. ماکزیمم تضعیف در ۱۰ دقیقه



شکل ۳- تاثیر تزریق داخل بطن مغزی CPT با دوزهای ۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار بر کاهش مرحله حمله تشنجی در فواصل مختلف پس از تشنج. CPT کاهش ایجاد شده در مرحله حمله تشنجی در زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول را بطور معنی داری کاهش داد. هیچ گونه تفاوت معنی داری بین دو دوز CPT مشاهده نشد. مقادیر به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین می‌باشند. * نشان دهنده $P < 0.05$ در مقایسه با گروه ACSF است. تعداد حیوانات در هر گروه ۵-۶ سر است.

ایجاد می‌شود و بعد از ۷۰ تا ۹۰ دقیقه هیچ نشانه‌ای از تضعیف باقی نمی‌ماند [۱۶،۳۲]. البته، تعدادی از محققان گزارش کرده‌اند که اگر فاصله بین دو تحریک کمتر از ۴۵ دقیقه شود دوره حمله بعدی کاهش می‌یابد [۱۶] و عده‌ای دیگر نشان داده‌اند که وقتی فاصله بین دو تحریک کمتر از ۶۰ دقیقه باشد تحریک دوم همراه با تضعیف پس از تشنج است [۱۴]. به طور کلی افزایش فاصله بین دو تحریک تاثیرات تضعیفی تحریکات آستانه‌ای زیر آستانه‌ای را بر روی حمله بعدی کاهش می‌دهد [۳۶].

مکانیسم‌های دقیق تضعیف پس از تشنج به خوبی شناخته نشده‌اند و پی بردن به آنها مستلزم دانستن مکانیسم‌های دقیق پایان یافتن حملات می‌باشد. در واقع، تحریک اول که امواج تخلیه متعاقب و حملات حرکتی را بوجود می‌آورد، تأثیرات تضعیفی قابل توجهی ایجاد می‌کند که در طی مدت ۹۰ دقیقه بتدریج کاهش می‌یابد [۳۲]. نتایج به دست آمده از آزمایش‌های قبل نشان می‌دهد که حالت تحریک نا پذیری ناشی از تحریک اول به فیدبک مهاری سیستم حرکتی در طی بروز تشنج بستگی ندارد [۳۶].

مطالعات اخیر نشان داده که در دوره تضعیف پس از تشنج میزان آندوزین افزایش پیدا می‌کند [۲۷]. مطالعات *in vivo* و *in vitro* نشان داده است که آندوزین دارای اثر ضد تشنجی بارزی در مغز بوده و به صورت آندوزن نیز اثر ضد تشنجی تونیک اعمال می‌کند [۹]. تزریق سیستمیک و یا داخل مغزی آگونیستهای آندوزین در مدل‌های آزمایشگاهی صرع از جمله کیندلینگ، اثر ضد تشنجی آن را تایید کرده است [۱،۲۰،۲۱،۲۹،۳۳]. به علاوه، مطالعات قبلی نشان داده است که غلظت آندوزین در نواحی مغزی در هنگام

تشنج افزایش می‌یابد و به دنبال تزریق آنتاگونیستهای آندوزینی کمیت‌های تشنجی تقویت می‌گردد [۸،۹]. بنابراین، می‌توان از آندوزین به عنوان یک ماده ضد تشنجی درون‌زا یاد کرد. داده‌های حاصل از مطالعه حاضر نیز در راستای همین نتایج می‌باشد و هنگامی که آنتاگونیستهای آندوزین به حیوان تزریق گردید، اثر تضعیفی ناشی از تحریک اول کاهش یافت. القای تشنج توسط مواد شیمیایی تراکم گیرنده‌های آندوزینی را در مغز افزایش می‌دهد [۶،۷،۳۵] و به دنبال کیندلینگ ناشی از PTZ نیز افزایش گیرنده‌های آندوزینی A_1 مشاهده شده است [۲۶]. این افزایش ممکن است در اعمال اثرات ضد تشنجی آندوزین در فواصل زمانی بیش از ۱۵ دقیقه بین دو تحریک (مثلاً زمان ۳۰ دقیقه در این تحقیق) نقش داشته باشد.

مطالعات نشان داده است که آندوزین اثرات ضد تشنجی خود را از طریق گیرنده‌های آندوزینی A_1 اعمال می‌کند و نقش تزریق آگونیستهای اختصاصی این گیرنده در مهار تشنج در ناحیه‌هایی از مغز که دارای این گیرنده می‌باشند نظیر هیپوکمپ [۱،۳۸]، قشر پری راینال [۲۱] و آمیگدال [۳۰] به اثبات رسیده است. در این تحقیق، کاهش فاصله بین دو تحریک به کمتر از ۶۰ دقیقه باعث کاهش شدت حمله تشنجی دوم شد. این بدان معناست که به دنبال تشنج اول تغییراتی در سیستم عصبی رخ می‌دهد که تحریک پذیری آن را کاهش می‌دهد. تزریق داخل صفاقی CPT از این کاهش جلوگیری کرد. بنابراین، می‌توان پیشنهاد نمود که فعالیت گیرنده‌های آندوزینی A_1 مسؤول حداقل بخشی از مکانیسم "تضعیف پس از تشنج" می‌باشد.

در این تحقیق، CPT از کاهش کمیت ADD در تحریک دوم جلوگیری کرد. این بدان معناست که ره‌ایش آندوزین آندوزن بعد از تحریک اول فعالیت نورون‌ها را در کانون تشنج مهار می‌کند و حذف این اثر مهاری توسط CPT از درصد تضعیف حاصله می‌کاهد. همان گونه که قبلاً توضیح داده شد، کاهش کمیت 1/S4L پس از تحریک دوم نشان دهنده افزایش S4L و در نتیجه کاهش شدت تشنج است. CPT از میزان درصد کاهش این کمیت نیز کاسته و لذا نقش آندوزین آندوزن را تایید می‌کند. کاستن از درصد تضعیف کمیت‌های S5D، SD و مرحله حمله تشنجی توسط CPT نیز نقش آندوزین آندوزن را در دوره تضعیفی پس از تشنج نشان می‌دهد.

البته، برخی محققین تغییراتی در میزان تراکم گیرنده‌های آندوزینی

- [7] Daval JL, Sarfati A, Effects of bicuculline-induced seizures on benzodiazepine and adenosine receptors in developing at brain. *Life Sci* 41 (1987) 1685-1693.
- [8] Dragunow M, Purinergic mechanisms in epilepsy. *Prog Neurobiol* 31 (1988) 85-108.
- [9] Dunwiddie TV, Adenosine and suppression of seizures. *Adv Neurol* 79 (1999) 1001-1010.
- [10] Ekonomou A, Sperk G, Kostopoulos G, Angelatou F, Reduction of A1 adenosine receptors in rat hippocampus after kainic acid-induced limbic seizures. *Neurosci Lett* 284 (2000) 49-52.
- [11] Gleiter CH, Deckert J, Nutt DJ, Marangos PJ, Electroconvulsive shock (ECS) and the adenosine neuromodulatory system: effect of single and repeated ECS on the adenosine A1 and A2 receptors, adenylate cyclase, and the adenosine uptake site. *J Neurochem* 52 (1989) 641-646.
- [12] Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK, A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 25 (1969) 295-330.
- [13] Gray L, Seizure and epilepsy. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, editors. *Principles of neural sciences*. New York: McGraw-Hill, 2000, p. 910-935.
- [14] Jarvis MF, Freeman FG, The effects of naloxone and interstimulation interval on post-ictal depression in kindled seizures. ??????????
- [15] Kelly M, The kindling model of temporal lobe epilepsy. In: Peterson. SL, Albertson T, editors. *Neuropharmacology Methods in epilepsy research*. Florida: CRC Press, 1998, p. 41-74.
- [16] Kelsey JE, Belluzzi JD, Endorphin mediation of post-ictal effects of kindled seizures in rats. *Brain Res* 253 (1982) 337-340.
- [17] Li T, Steinbeck JA, Lusardi T, Koch P, Lan JQ, Wilz A, Segsneider M, Simon RP, Brustle O, Boison D, Suppression of kindling epileptogenesis by adenosine releasing stem cell-derived brain implants. *Brain* 130 (2007) 1276-1288.
- [18] McNamara JO, Analyses of the molecular basis of kindling development. *Psychiat Clin Neuros* 49 (1995) S175-178.
- [19] McNamara JO, Byrne MC, Dasheiff RM, Fitz JG, The kindling model of epilepsy: a review. *Prog Neurobiol* 15 (1980) 139-159.
- [20] Mimajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Pourgholami MH,

A₁ به دنبال تشنج‌های ناشی از الکتروشوک [۱۱،۳۳] یا تزریق داخل صفاقی اسید کابنیک [۱۰] مشاهده نکرده‌اند و لذا به نقش آدنوزین اندوزن در دوره تضعیف پس از تشنج با شک می‌نگرند.

علاوه بر آدنوزین، عوامل دیگری نیز در ایجاد دوره تضعیف پس از تشنج نقش دارند. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد آندروفین آزاد شده در طی حملات ممکن است که بعضی از تأثیرات زود گذر دوره تضعیف پس از تشنج را میانجیگری کند [۱۴،۱۶]. همچنین، هیپریپلاریزاسیونی که بعد از وقوع PDS رخ می‌دهد در ایجاد دوره نقش دارد که در طی این دوره نوروترانسمیترهای مهاری از جمله گابا در مغز آزاد می‌شوند [۲۴،۲۵].

بنابراین، نتایج حاصل از این تحقیق فعالیت آدنوزین اندوزن از طریق گیرنده‌های A₁ را در ایجاد دوره تضعیفی پس از تشنج نشان می‌دهد؛ اما با توجه به اینکه مهار گیرنده‌های A₁ توسط CPT بطور کامل این دوره تضعیفی را از بین نمی‌برد، عوامل دیگری نیز دخیل می‌باشند. شناخت دقیق این مکانیسم‌ها و پی بردن به ساز و کارهایی در جهت تقویت این مکانیسم‌ها می‌تواند گامی به‌سوی یافتن راهکارهای بهتر برای درمان صرع باشد.

منابع

- [1] Alasvand Zarasvand M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Palizvan MR, Anticonvulsant effect of bilateral injection of N6-cyclohexyladenosine into the CA1 region of the hippocampus in amygdala-kindled rats. *Epilepsy Res* 47 (2001) 141-149.
- [2] Bate L, Gardiner M, Molecular genetics of human epilepsies. *Expert Rev Mol Med* 1999 (1999) 1-22.
- [3] Bertram E, The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia* 48 (Suppl 2) (2007) 65-74.
- [4] Boeck CR, Kroth EH, Bronzatto MJ, Vendite D, Adenosine receptors co-operate with NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. *Neuropharmacology* 49 (2005) 17-24.
- [5] Boison D, Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. *Neuroscientist* 11 (2005) 25-36.
- [6] Daval J, Werck M, Autoradiographic changes in brain adenosine A1 receptors and their coupling to G proteins following seizures in the developing rat. *Brain Res Dev* 59 (1991) 237-247.

- of intraperitoneal and intrahippocampal (CA1) 2-chloroadenosine in amygdaloid kindled rats. *Brain Res* 751 (1997) 259-264.
- [30] Pourgholami MH, Rostampour M, Mirnajafi-Zadeh J, Palizvan MR, Intra-amygdala infusion of 2-chloroadenosine suppresses amygdala-kindled seizures. *Brain Res* 775 (1997) 37-42.
- [31] Racine RJ, Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32 (1972) 281-294.
- [32] Shao J, Valenstein ES, Long-term inhibition of kindled seizures by brain stimulation. *Exp Neurol* 76 (1982) 376-392.
- [33] Simonato M, Varani K, Muzzolini A, Bianchi C, Beani L, Borea PA, Adenosine A1 receptors in the rat brain in the kindling model of epilepsy. *Eur J Pharmacol* 265 (1994) 121-124.
- [34] Ure JA, Perassolo M, Update on the pathophysiology of the epilepsies. *J Neurol Sci* 177 (2000) 1-17.
- [35] Vanore G, Giraldez L, Rodriguez de Lores AG, Girardi E, Seizure activity produces differential changes in adenosine A1 receptors within rat hippocampus. *Neurochem Res* 26 (2001) 225-230.
- [36] Velisek L, Mares P, Differential effects of naloxone on postictal depression. *Epilepsy Res* 12 (1992) 37-43.
- [37] von Lubitz DK, Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept? *Eur J Pharmacol* 371 (1999) 85-102.
- [38] Zeraati M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Namvar S, Rezvani ME, Adenosine A1 and A2A receptors of hippocampal CA1 region have opposite effects on piriform cortex kindled seizures in rats. *Seizure* 15 (2006) 41-48.
- Intraperitoneal and intraamygdala N(6)-cyclohexyladenosine suppress hippocampal kindled seizures in rats. *Brain Res* 858 (2000) 48-54.
- [21] Mirnajafi-Zadeh J, Pourgholami MH, Palizvan MR, Rostampour M, Fallahi M, Anticonvulsant action of 2-chloroadenosine injected focally into the perirhinal cortex in amygdaloid kindled rats. *Epilepsy Res* 37 (1999) 37-43.
- [22] Mucha RF, Pinel PJ, Postseizure inhibition of kindled seizures. *Exp Neurol* 54 (1977) 266-282.
- [23] Newman M, Zohar J, Kalian M, Belmaker RH, The effects of chronic lithium and ECT in A1 and A2 adenosine receptor systems in rat brain. *Brain Res* 291 (1984) 188-192.
- [24] Ojemann GA, Temporal lobe epilepsy—current wisdom. *Stereotact Funct Neurosurg* 77 (2001) 213-215.
- [25] Omori K, Inagaki C, Sasa M, Molecular mechanism underlying epileptic seizure: forwards development of novel drugs for untreatable epilepsy. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 114 (1999) 161-168.
- [26] Pagonopoulou O, Angelatou F, Kostopoulos G, Effect of pentylentetrazol-induced seizures on A1 adenosine receptor regional density in the mouse brain: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* 56 (1993) 711-716.
- [27] Pagonopoulou O, Efthimiadou A, Asimakopoulos B, Nikolettos NK, Modulatory role of adenosine and its receptors in epilepsy: possible therapeutic approaches. *Neurosci Res* 56 (2006) 14-20.
- [28] Paxinos G, Watson C, *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York, 1986.
- [29] Pourgholami MH, Mirnajafi-Zadeh J, Behzadi J, Effect