

## نقش گیرنده‌های $GABA_A$ در ایجاد دوره "تضعیف پس از تشنج" در مدل کیندلینگ موش صحرایی

سید جواد میرنجنفی زاده<sup>۱\*</sup> (Ph.D)، وحید شیبانی<sup>۲</sup> (Ph.D)، محمدرضا پالیزوان<sup>۳</sup> (Ph.D)، مهدی صادق<sup>۴</sup> (M.Sc)، طاهره زینلی<sup>۴</sup> (M.Sc)

۱ - دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

۲ - دانشگاه علوم پزشکی کرمان، مرکز تحقیقات علوم اعصاب

۳ - دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

۴ - دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

### چکیده

سابقه و هدف: به دنبال هر تشنج، دوره‌ای مهاری به نام دوره "تضعیف پس از تشنج" وجود دارد که بر تشنج بعدی اثر تضعیفی دارد. در این تحقیق نقش گیرنده‌های  $GABA_A$  در ایجاد دوره تضعیفی پس از تشنج در مدل صرعی کیندلینگ آمیگدال در موش صحرایی مطالعه شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا حیوانات با تحریک الکتریکی آمیگدال کیندل شدند. سپس حیوانات کیندل شده به چهار گروه تقسیم شدند. حیوانات گروه‌های مختلف به ترتیب در زمان‌های ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه پس از تحریک اول، تحریک دوم را دریافت کردند و درصد تضعیف کمیت‌های تشنجی پس از تحریک دوم محاسبه گردید. در چهار گروه دیگر از حیوانات، بیکوکولین (۱۰۰ نانومولار)، آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های  $GABA_A$ ، ۱۰ دقیقه قبل از تحریک دوم به داخل بطن مغز تزریق شد و اثر آن بر درصد تضعیف ناشی از تحریک اول بررسی گردید. تعداد حیوانات در همه گروه‌ها ۶ سر بود.

یافته‌ها: هنگامی که تحریک دوم در فاصله زمانی ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول به حیوانات اعمال شد، کاهش معنی‌داری در شدت تشنج به دنبال تحریک دوم مشاهده گردید و کمیت‌های تشنجی به دنبال تحریک دوم دچار تضعیف شدند. تزریق بیکوکولین از شدت این تضعیف کاست و درصد تضعیف کمیت‌های تشنجی به دنبال تحریک دوم را به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه دریافت‌کننده حلال دارو کاهش داد ( $P < 0.05$ ). این کاهش هنگامی که تحریک دوم در زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول اعمال شد معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان داد یکی از مکانیسم‌های ایجاد دوره تضعیفی پس از تشنج فعالیت گیرنده‌های  $GABA_A$  توسط گابای اندوژن می‌باشد. در عین حال، به دنبال مهار گیرنده‌های  $GABA_A$  این دوره تضعیفی به‌طور کامل از بین نمی‌رود. بنابراین، عوامل دیگری نیز در ایجاد آن نقش دارند.

واژه‌های کلیدی: صرع، تضعیف پس از تشنج، گابا، گیرنده  $GABA_A$

است که به دلیل عدم شناخت دقیق مکانیسم‌های مسئول، هنوز روش درمان قطعی برای آن پیدا نشده است [۱، ۲، ۳]. داروهای

### مقدمه

صرع یکی از شایع‌ترین اختلالات سیستم اعصاب مرکزی

و جریان کلری را از خود عبور می‌دهند. گیرنده‌های  $GABA_B$  از طریق اتصال و فعال کردن پروتیین‌های  $G$  و سیستم پیامبرهای داخل سلولی، عمل‌کرد نورون‌ها را تغییر می‌دهند [۱۱]. اختلال در عمل‌کرد انتقال سیناپسی گاباژیک، سبب اختلالات سیستم عصبی مختلف می‌شود. فعالیت کم سیستم گابا با اختلالاتی از قبیل صرع مرتبط می‌باشد [۱۱، ۱۲]. اخیراً نشان داده‌اند که تراکم گیرنده‌های  $GABA_A$  به دنبال تشنج‌های ناشی از کیندلینگ زیاد می‌شود [۱۳]. علاوه بر این، کاشت سلول‌های تولیدکننده گابا می‌تواند باعث کاهش شدت تشنج‌های ناشی از کیندلینگ شود [۱۴].

با توجه به این که،  $GABA$  به عنوان یکی از مهم‌ترین نوروترانسمیترهای مغزی نقش مهمی در تشنج و صرع دارد و مطالعات گذشته تغییرات غلظت  $GABA$  یا تغییرات گیرنده‌های آن را در بافت مغزی انسان‌های مصروع نشان داده است [۱۱]، احتمال دارد رهایش گابا به دنبال هر حمله تشنجی در به‌وجود آمدن دوره تضعیف پس از تشنج نیز نقش داشته باشد. برای بررسی این موضوع، در این تحقیق با استفاده از آنتاگونیست گیرنده‌های  $GABA_A$  نقش این گیرنده‌ها در دوره تضعیفی پس از تشنج در مدل صرعی کیندلینگ آمیگدال مطالعه شد.

## مواد و روش‌ها

جراحی و کیندل کردن حیوانات: در این مطالعه که از نوع تحقیقات پژوهشی بنیادی می‌باشد، از موش‌های صحرایی نر از نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۳۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در دمای اتاق، در شرایط ۱۲ ساعت روشنی و ۱۲ ساعت تاریکی و در قفس‌های جداگانه نگهداری می‌شدند و به آب و غذا آزادانه دسترسی داشتند. در تمام طول تحقیق مسایل اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. برای بی‌هوش کردن حیوان از کتامین ( $100\text{ mg/kg}$ ) و رامپون ( $12\text{ mg/kg}$ ) به صورت تزریق داخلی صفاقی استفاده گردید. پس از بی‌هوش کردن، حیوان درون دستگاه استریوتاکسی قرار می‌گرفت. بر اساس اطلس Paxinos

ضد صرع موجود فقط در ۴۰ درصد موارد تشنج را از بین می‌برند و در بقیه موارد فقط تواتر وقوع تشنج‌ها را کم می‌کنند. مطابق با آمارهای به دست آمده تقریباً به ازای هر ۲۰۰ نفر یک نفر در دنیا به این اختلال گرفتار است [۱]. برای بررسی صرع از مدل‌های آزمایشگاهی 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 در حیوان می‌گردند [۵، ۴]. کیندلینگ به عنوان مدل مناسبی برای صرع موضعی پیچیده که شایع‌ترین نوع صرع در انسان می‌باشد، معرفی شده است [۶]. این نوع صرع غالباً از لوب گیجگاهی و به‌ویژه سیستم لیمبیک منشأ می‌گیرد [۷، ۳]. 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 [۸، ۲].

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 [۹]. Goddard و همکارانش نشان دادند که با کاهش فاصله بین دو تحریک، پدیده کیندلینگ رخ نمی‌دهد و نیز هر تشنج کیندلینگی اثری تضعیفی بر روی تشنج بعدی دارد [۱۰]. علت این پدیده هنوز به درستی مشخص نشده است، اما احتمالاً فعال شدن برخی سیستم‌های نوروترانسمیتری و یا نورومودولاتوری در این پدیده نقش دارد. شناخت مکانیسم‌های دخیل در این پدیده می‌تواند دانش ما را برای یافتن راه‌کارهای بهتر برای درمان صرع بهبود بخشد.

$GABA$  نوروترانسمیتر مهاری اصلی در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد و بیش از ۲۵ درصد نورون‌های مهاری گاباژیک می‌باشند. گابا در تعدیل فعالیت نورونی، نقش کلیدی دارد. این نوروترانسمیتر اثرات خودش را از طریق گیرنده‌های مختلفی انجام می‌دهد. دو نوع گیرنده برای گابا شناخته شده است. گیرنده‌های  $GABA_A$  گیرنده‌هایی ایونوتروپیک می‌باشند

تبادل و به زمین خوردن [۱۶]. هنگامی که حیوان ۵ بار مرحله ۵ تشنج را نشان داد و کمیت‌های تشنجی ثابت گردیدند، آماده انجام آزمایش می‌شد.

پس از هر بار تحریک حیوان، کمیت‌های تشنجی زیر ثبت و اندازه‌گیری می‌شدند: مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (Afterdischarge duration)، مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۴ تشنج (Stage 4 latency)، مدت زمان مرحله ۵ تشنج (Stage 5 duration)، مدت زمان حمله تشنج (Seizure duration) و مرحله حمله (Seizure stage). به علت این‌که در برخی آزمایش‌ها حیوانات به مرحله ۴ تشنج نمی‌رسیدند، مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۴ تشنج در آن‌ها برابر با بی‌نهایت می‌شد و چون نمی‌توان در این شرایط از این کمیت در محاسبات آماری استفاده کرد، از کمیت معکوس مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۴ تشنج استفاده شد. چنان‌چه حیوانی به مرحله ۴ نمی‌رسید، معکوس مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۴ تشنج آن برابر با صفر می‌شد.

مواد مورد استفاده: در این تحقیق بیکوکولین (خریداری شده از شرکت Sigma) به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های  $GABA_A$  استفاده شد. این ماده برای تزریق شدن به داخل بطن مغز در مایع مغزی- نخاعی مصنوعی (ACSF) حل گردید. برای تهیه ACSF مواد تشکیل‌دهنده آن، برحسب غلظت، در حجم خاصی از آب مقطر حل شدند. این مواد عبارتند از  $NaH_2PO_4$  (۱/۲۵ mM)،  $KCl$  (۳ mM)،  $MgSO_4$  (۲ mM)،  $CaCl_2$  (۱ mM)،  $NaCl$  (۱۱۴ mM)،  $NaHCO_3$  (۲۶ mM) (و گلوکز ۱۰ mM). به منظور استریل کردن، دارو از میکروفیلتر (۰/۲  $\mu m$ ) گذرانده شد. میزان تزریق دارو ۱ میکرولیتر در دو دقیقه در داخل بطن مغزی بود. تزریق توسط سرنگ هاملتون و به صورت دستی به آرامی صورت گرفت. حیوانات ۵ دقیقه پس از تزریق داخل بطن

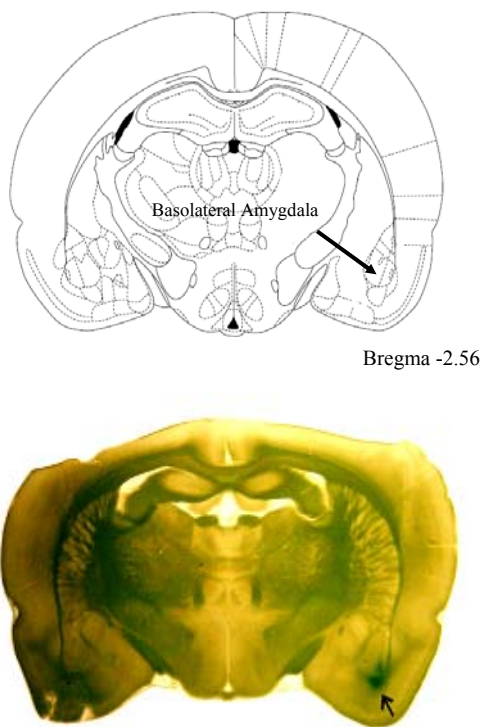
و Watson [۱۵] مختصات محل کارگذاری الکتروده سه قطبی در آمیگدال (۲/۵ میلی‌متر به عقب، ۴/۸ میلی‌متر به سمت راست نسبت به برگما و ۷/۵ میلی‌متر پایین‌تر از سخت شامه) و مختصات محل کارگذاری کانول راهنما در بطن جانبی (۱/۰ میلی‌متر به عقب، ۱/۲ میلی‌متر به سمت راست نسبت به برگما و ۳/۶ میلی‌متر زیر سخت شامه) مشخص گردید. دو الکتروده تک قطبی به عنوان الکترودهای 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 الکترودها و کانول، پین‌های متصل به الکترودها وارد مادگی سوکت مخابراتی شده و سوکت به وسیله 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 ۱ میلی‌ثانیه بود، استفاده می‌شد. این تحریک هر بار به مدت ۲ ثانیه به حیوان اعمال می‌گردید [۸]. برای به دست آوردن شدت آستانه، ابتدا حیوان توسط جریانی با شدت ۱۰ میکروآمپر تحریک می‌گردید. در صورتی که امواج تخلیه متعاقب (حداقل به مدت ۵ ثانیه) ثبت می‌شدند، این شدت جریان به عنوان شدت آستانه شناخته می‌شد. در غیر این صورت، به تدریج شدت جریان در فواصل ۵ دقیقه‌ای و هر بار ۱۰ میکروآمپر، افزایش داده می‌شد تا امواج تخلیه متعاقب ثبت گردند. سپس حیوانات هر ۲۴ ساعت یک بار با شدت آستانه تحریک می‌شدند تا مراحل مختلف تشنج را نشان داده و کیندل شوند. 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

با آزمون t زوج‌ها و یا آزمون Wilcoxon انجام گرفت. برای بررسی تأثیر بیکوکولین 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 کمیت‌ها در فواصل زمانی مختلف بین دو تحریک، مقایسه گردید تا تأثیر دو فاکتور "فاصله زمانی بین دو تحریک" و "دارو" مورد بررسی قرار گیرد. برای مقایسه مراحل مختلف تشنج در فواصل زمانی مختلف بین دو تحریک از آزمون ناپارامتری Kruskal Wallis و Mann Whitney U-test استفاده شد. در هر مورد سطح معنی‌دار آماری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

## نتایج

اثر کاهش فاصله بین دو تحریک بر کمیت‌های تشنجی: ارزیابی بافت‌شناسی نشان داد که الکترودها و کانول در موقعیت مناسب قرار داشتند (شکل ۱).



شکل ۱. برش کروئال مغز در ناحیه هسته‌های آمیگدال. نوک پیکان نشان دهنده محل قرارگیری الکترودهای تحریک در این هسته‌ها می باشد.

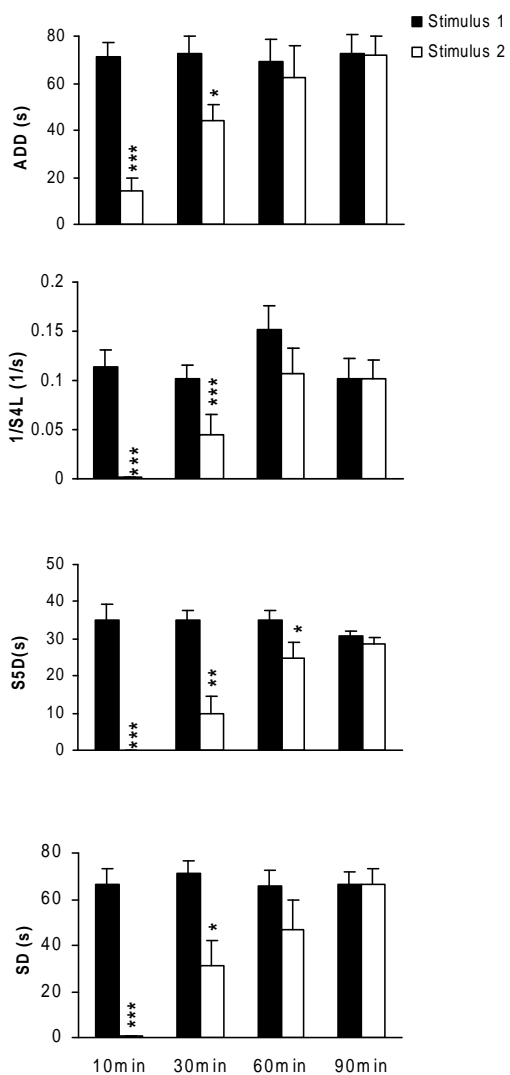
مغزی تحریک شدند و کمیت‌های تشنجی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

گروه‌های آزمایشی: در این آزمایش حیواناتی که به مرحله کیندلینگ کامل رسیدند و حداقل سه بار متوالی مرحله ۵ تشنج را نشان دادند (حیوانات کیندل شده)، به سه گروه تقسیم شدند. در گروه اول (گروه کنترل) حیوانات با شدت آستانه تحریک و تمامی کمیت‌های تشنجی آن‌ها ثبت گردید. این حیوانات سپس به چهار زیر گروه تقسیم شدند. در این زیر گروه‌ها، به ترتیب در فواصل زمانی ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه پس از تحریک اول، حیوانات مجدداً تحریک شده (توسط تحریک دوم) و کمیت‌های تشنجی آن‌ها اندازه‌گیری و با پاسخ حاصل از تحریک اول مقایسه گردید (فواصل زمانی بر اساس آزمایش‌های مقدماتی انتخاب گردیدند). در گروه دوم 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 پس از تحریک اول تحریک شدند، اما در این گروه‌ها، ۱۰ دقیقه قبل از تحریک دوم به حیوانات بیکوکولین با دوز ۱۰۰ نانومولار به صورت داخل بطن مغزی تزریق شد. دوز دارو بر اساس آزمایش‌های مقدماتی تعیین گردید. در گروه سوم مراحل آزمایش همانند گروه دوم بود، با این تفاوت که به حیوانات ACSF به طریق داخل بطن مغزی تزریق گردید. تعداد حیوانات در تمامی گروه‌ها ۶ سر بود.

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

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات: داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین (SEM) بیان شده‌اند. مقایسه داده‌های حاصل از تحریک اول و دوم در گروه کنترل

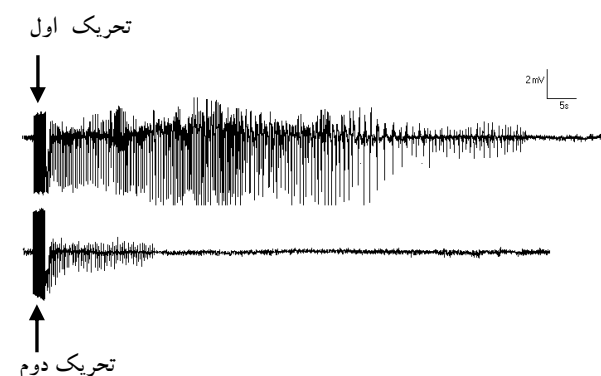
(مرحله حمله =  $5 \pm 0$ ) تفاوت معنی‌داری بین دو تحریک وجود نداشت.



شکل ۳. تأثیر فاصله زمانی بین دو تحریک بر مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (ADD) ثبت شده از آمیگدال، معکوس مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۴ تشنج (1/S4L)، مدت زمان مرحله ۵ تشنج (S5D) و مدت زمان حمله تشنج (SD) در گروه دریافت کننده ACSF. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین نشان داده شده اند. \* نشان دهنده  $P < 0.05$ ، \*\* نشان دهنده  $P < 0.01$  و \*\*\* نشان دهنده  $P < 0.001$  در مقایسه با تحریک اول با استفاده از آزمون t-زوج‌ها می‌باشد.

تأثیر تزریق داخل بطن مغزی بی‌کوکولین بر دوره تضعیف پس از تشنج: در تمامی آزمایش‌ها تزریق داخل بطن مغزی ACSF تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل (گروه اول) در کمیت‌های تشنجی به وجود نیاورد و هیچ تغییری در رفتار

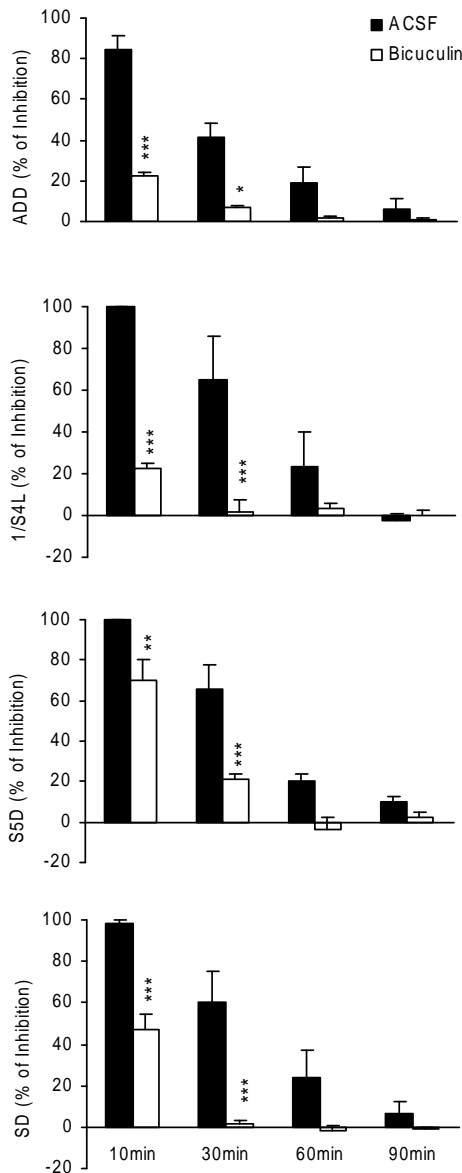
داده‌های حاصل از گروه کنترل نشان داد که اگر تحریک دوم در فواصل زمانی ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول اعمال شود، کاهش معنی‌داری در اندازه کمیت‌های مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (شکل ۲)، معکوس مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۴ تشنج، مدت زمان مرحله ۵ تشنج و مدت زمان حمله تشنج نسبت به اندازه آن‌ها پس از تحریک اول ایجاد می‌شود (شکل ۳). اگر فاصله بین تحریک دوم و تحریک اول ۶۰ دقیقه باشد، فقط مدت زمان مرحله ۵ تشنج به طور معنی‌دار به دنبال اعمال تحریک دوم کاهش می‌یابد. هنگامی که تحریک دوم ۹۰ دقیقه پس از تحریک اول اعمال شود، هیچ کاهشی در کمیت‌های تشنجی مشاهده نمی‌شود، یعنی مهار ناشی از تحریک اول کاملاً از بین می‌رود (شکل ۳).



شکل ۲. نمونه‌ای از ثبت امواج تخلیه متعاقب ناحیه آمیگدال در گروه دریافت کننده ACSF به دنبال دو تحریک متوالی. تحریک دوم ۱۰ دقیقه پس از تحریک اول اعمال شده است. کاهش شدید مدت زمان تخلیه امواج متعاقب پس از تحریک دوم کاملاً مشخص می‌باشد.

مرحله حمله تشنجی در تمام حیوانات پس از تحریک اول  $5 \pm 0$  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 معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). در فواصل زمانی ۶۰ دقیقه (مرحله حمله =  $4/4 \pm 0/4$ ) و ۹۰ دقیقه

در حیوانات دریافت‌کننده بیکوکولین به  $4/17 \pm 0/83$  رسید و باز هم تفاوت با گروه دریافت‌کننده ACSF ( $1/67 \pm 1/06$ ) معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). در فواصل زمانی ۶۰ و ۹۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری بین دو تحریک وجود نداشت.



شکل ۴. اثر تزریق بیکوکولین (۱۰۰ نانومولار) به داخل بطن جانبی (۵ دقیقه قبل از تحریک دوم) بر درصد مهار مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (ADD) ثبت شده از آمیگدال، معکوس مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۴ تشنج (1/S4L)، مدت زمان مرحله ۵ تشنج (S5D) و مدت زمان حمله تشنج (SD). تعداد حیوانات در همه گروهها ۶ سر می باشد. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین نشان داده شده اند. \* نشان دهنده  $P < 0/05$  و \*\*\* نشان دهنده  $P < 0/001$  در مقایسه با گروه ACSF با استفاده از آزمون ANOVA دو طرفه و آزمون Tukey می باشد.

حرکتی و فعالیت صرعی حیوان ایجاد نکرد. مقایسه آماری درصد کاهش کمیت‌ها پس از تحریک دوم در گروه دریافت‌کننده ACSF با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. آزمون تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه نشان داد که تزریق بیکوکولین با دوز ۱۰۰ نانومولار درصد مهار کمیت‌های مدت زمان امواج تخلیه متعاقب ( $F_{(3,4)} = 8/74$ ) و معکوس مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۴ تشنج ( $F_{(3,4)} = 10/10$ ) و مدت زمان مرحله ۵ تشنج ( $F_{(3,4)} = 3/88$ ) و مدت زمان حمله تشنج ( $F_{(3,4)} = 5/73$ ) را پس از اعمال دومین تحریک به طور معنی‌داری کاهش داد. آزمون Tukey نشان داد در گروه دریافت‌کننده بیکوکولین نسبت به گروه دریافت‌کننده ACSF، کاهش درصد مهار تمامی این کمیت‌ها در هنگامی که حیوانات در فواصل زمانی ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول تحریک دوم را دریافت کنند، معنی‌دار بود. کاهش درصد مهار در زمان‌های ۶۰ و ۹۰ دقیقه پس از تحریک اول در گروه‌های دریافت‌کننده بیکوکولین نسبت به گروه ACSF معنی‌دار نبود (شکل ۴). در ضمن، تزریق بیکوکولین تأثیر معنی‌داری بر کمیت‌های تشنجی در هنگامی که تحریک دوم ۹۰ دقیقه پس از تحریک اول اعمال شد، نداشت و (همانند گروه‌های کنترل و ACSF) اندازه این کمیت‌ها پس از تحریک دوم تفاوت معنی‌داری با اندازه آن‌ها پس از تحریک اول نداشت.

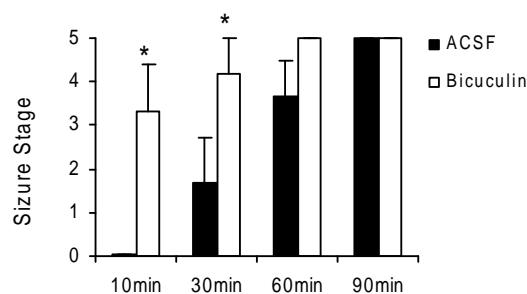
آزمون Kruskal Wallis و آزمون Mann Whitney U نیز نشان داد که تزریق بیکوکولین از کاهش مرحله حمله در زمان‌های ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول به‌طور معنی‌دار جلوگیری کرد ( $P < 0/05$ ، شکل ۵). مرحله حمله تشنجی در تمام حیوانات پس از تحریک اول  $5 \pm 0$  بود. هنگامی که تحریک دوم در فاصله زمانی ۱۰ دقیقه بعد از تحریک اول اعمال شد، مرحله حمله تشنجی در حیوانات دریافت‌کننده بیکوکولین به  $3/33 \pm 1/26$  رسید که با مرحله حمله پس از تزریق ACSF (مرحله صفر) تفاوت معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ). در فاصله زمانی ۳۰ دقیقه، مرحله حمله تشنجی

از ۶۰ دقیقه باشد تحریک دوم همراه با مهار پس از تشنج است [۲۰].

مهار پس از تشنج در نتیجه کاهش تحریک‌پذیری به دنبال یک حمله صرعی است [۲۱]. پیشنهاد شده است که در طی حملات تشنجی میزان متابولیسم و جریان خون افزایش می‌یابد در حالی که در دوره بعد از حمله میزان متابولیسم و جریان خون دچار کاهش می‌شود. در نتیجه، پس از یک تشنج معمولاً حمله تشنجی دیگری رخ نمی‌دهد. مهار پس از تشنج در امواج EEG نیز قابل مشاهده است و در طی این دوره که متابولیسم مغزی پایین می‌آید فرکانس امواج EEG کم‌تر می‌شود [۲۱].

مکانیسم‌های دقیق مهار 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 ایجاد می‌کند، تأثیرات تضعیفی قابل توجهی ایجاد می‌کند که در طی مدت ۹۰ دقیقه به تدریج کاهش می‌یابد [۱۸]. مهار بعد از حمله معمولاً محصول کاهش انرژی است که به وسیله تشنج ایجاد می‌شود یا محصول فعالیت عصبی القاکنده حمله در ساختارهای مهار و یا تجمع نوروترانسمیترهای مهار است.

در طی این دوره نوروترانسمیترهای مهار از جمله گابا و آدنوزین آندوزن در مغز آزاد می‌شود [۲۳، ۲۲]. مطالعه قبلی ما نشان داد که فعالیت گیرنده آدنوزین A<sub>1</sub> در ایجاد دوره مهار پس از تشنج نقش دارند و هنگامی که آنتاگونیست این گیرنده‌ها به حیوان تزریق شود، شدت مهار کاهش می‌یابد [۲۴]. از طرف دیگر، GABA نیز به عنوان یکی از مهم‌ترین نوروترانسمیترهای مغزی نقش مهمی در تشنج و صرع دارد و مطالعات زیادی تغییرات غلظت GABA یا تغییرات گیرنده‌های آن را در بافت مغزی انسان‌های مصروع نشان داده‌اند [۱۱]. گیرنده‌های GABA در بخش‌هایی از هیپوکمپ افراد مصروع کاهش می‌یابد [۳]. کاهش مهار ناشی از فعالیت گیرنده‌های گابا نیز به دنبال تشنج مشاهده شده است [۲۵]. تعداد نورون‌های گابا ارژیک هم در انسان‌های مصروع [۲۶] و



شکل ۵. اثر تزریق بیکوکلین (۱۰۰ نانومولار) به داخل بطن جانبی (۵ دقیقه قبل از تحریک دوم) بر مهار مرحله حمله تشنجی. تعداد حیوانات در همه گروه ها ۶ سر می باشد. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار میانگین نشان داده شده اند. \* نشان دهنده  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه ACSF با استفاده از آزمون Kruskal - Wallis و آزمون Mann Withney U می باشد.

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که فعالیت گیرنده‌های GABA<sub>A</sub> در ایجاد دوره مهار پس از تشنج نقش دارد و جلوگیری از فعالیت این گیرنده‌ها باعث کاهش شدت مهار، به دنبال وقوع یک حمله تشنجی می‌شود. در این تحقیق درصد مهار پس از تشنج در چهار فاصله زمانی ۱۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه پس از اولین تحریک حیوانات اندازه‌گیری شد و مشخص شد که هر چه زمان بیش‌تری از تحریک اول بگذرد و فاصله زمانی بین دو تحریک بیش‌تر شود درصد مهار پس از تشنج کم‌تر می‌شود. به این ترتیب در زمان ۱۰ دقیقه، درصد مهار پس از تشنج بالا است و وقتی فاصله بین دو تحریک ۹۰ دقیقه باشد، مهار پس از تشنج به طور کامل از بین می‌رود. در حیوانات بالغ مهار پس از تشنج پس از تحریک سیستم لیمبیک ۲۰ دقیقه طول می‌کشد [۱۷]. طبق مطالعات گذشته حداکثر مهار در ۱۰ دقیقه ایجاد می‌شود و بعد از ۷۰ تا ۹۰ دقیقه هیچ شواهدی از مهار نداریم [۱۸]. تعدادی از محققان گزارش کرده‌اند که اگر فاصله بین دو تحریک بیش‌تر از ۹۰ دقیقه شود هیچ تأثیری بر طول دوره حملات ندارد، اما اگر فاصله بین دو تحریک کم‌تر از ۴۵ دقیقه شود دوره حمله بعدی کاهش می‌یابد [۱۹]. وقتی فاصله بین دو تحریک کم‌تر

وقوع تشنجات عمومی در حیوان است. طولانی شدن کمیت اول و کوتاه شدن کمیت دوم در فاصله زمانی ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول نشان‌دهنده تأخیر در ایجاد تشنج عمومی و کاهش زمان تشنج عمومی است. بنابراین، ۱۰ و ۳۰ دقیقه بعد از تحریک اول مدت زمان لازم برای عمومی شدن تشنج خیلی زیاد می‌شود و عملاً این مرحله رخ نمی‌دهد. بیکوکولین از میزان درصد کاهش این کمیت نیز کاسته و لذا نقش گابای اندوژن را تأیید می‌کنند. دو کمیت دیگر یعنی مدت زمان حمله تشنج و مرحله حمله تشنجی هم ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول کاهش می‌یابند که این تضعیف با تزریق بیکوکولین کم می‌شود. کاستن از درصد تضعیف کمیت‌های مدت زمان مرحله ۵ تشنج، مدت زمان حمله تشنج و مرحله حمله تشنجی توسط بیکوکولین نیز نقش گابای اندوژن را در دوره تضعیفی پس از تشنج نشان می‌دهد.

بنابراین، نتایج حاصل از این تحقیق فعالیت گابای اندوژن از طریق گیرنده‌های  $GABA_A$  را در ایجاد دوره تضعیفی پس از تشنج نشان می‌دهد؛ اما با توجه به این که مهار این گیرنده‌ها به‌طور کامل این دوره تضعیفی را از بین نمی‌برد، عوامل دیگری نیز در ایجاد این دوره دخیل می‌باشند. شناخت دقیق این مکانیسم‌ها و پی بردن به سازوکارهایی در جهت تقویت این مکانیسم‌ها می‌تواند گامی به سوی یافتن راه‌کارهای بهتر برای درمان صرع باشد.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان انجام گردید.

## منابع

[1] Delgado-Escueta AV, Wilson WA, Olson RW, and Porter RJ, New waves of research in the epilepsies crossing into the third millennium. In: Antonio VD, Wilson WA, Olsen RW, Porter RJ, editors. Jasper's basic mechanisms of the epilepsies. 3rd edition, Philadelphia: Lippincott 2001; p.3-59.

[2] 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.

[3] Ure JA, and Perassolo M, Update on the pathophysiology of the epilepsies. J Neurol Sci 2000; 177: 1-17.

هم به دنبال ایجاد کیندلینگ [۱۳] کم می‌شود. اما برخی دیگر از محققین این کم شدن را مشاهده نکرده‌اند [۷]. در تحقیقی دیگر نشان داده شد که غلظت GABA در حین تشنج افزایش می‌یابد و این افزایش در افراد مبتلا به صرع بیش‌تر از افراد معمولی است [۱۱]. افزایش تعداد نورون‌های گابااژیک در موش‌های صحرایی مستعد به صرع ژنتیکی [۲۹،۲۸] و افزایش غلظت خارج سلولی این ماده به دنبال تشنج نیز نشان داده شده است [۳۰].

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 تحریک‌پذیری آن را کاهش می‌دهد. تزریق بیکوکولین از این کاهش جلوگیری کرد. بنابراین، می‌توان پیشنهاد نمود که فعالیت گیرنده‌های  $GABA_A$  مسؤؤل حداقل بخشی از مکانیسم "مهار پس از تشنج" می‌باشند. رهایش گابا در ایجاد دوره مهار پس از تشنج مؤثر است. مطالعات نشان داده است که در صرع عمل‌کرد گیرنده‌های  $GABA_A$  و ناقلین گابا کاهش پیدا می‌کند. کیندلینگ الکتریکی نیز سبب کاهش عمل‌کرد گیرنده‌های گابا در ناحیه CA1 هیپوکمپ می‌شود [۱۱].

در آزمایش‌های ما کمیت مدت زمان امواج تخلیه متعاقب ثبت شده از آمیگدال ۱۰ و ۳۰ دقیقه پس از تحریک اول، در تحریک دوم به طور معنی‌داری کم می‌شود. این مهار ناشی از کاهش فعالیت نورون‌ها در آمیگدال است که ممکن است به علت افزایش گابای آندوژن در مغز باشد. در این تحقیق، بیکوکولین از کاهش کمیت مدت زمان امواج تخلیه متعاقب در تحریک دوم جلوگیری کرد. این بدان معناست که رهایش گابای آندوژن بعد از تحریک اول فعالیت نورون‌ها را در کانون تشنج مهار می‌کند و حذف این اثر مهاری توسط بیکوکولین از درصد تضعیف حاصله می‌کاهد.

کمیت مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۴ تشنج نشان‌دهنده زمان لازم برای عمومی شدن تشنج و کمیت مدت زمان مرحله ۵ تشنج نشان‌دهنده دوره



- [19] Kelsey JE. and Belluzzi JD, Endorphin mediation of post-ictal effects of kindled seizures in rats. *Brain Res* 1982; 253: 337-340.
- [20] Jarvis MF. and Freeman FG, The effects of nalodone and interstimulation interval on post-ictal Depression in kindled seizures. *Brain Res* 1983; 288: 235-241.
- [21] Tüma L, Krýsl D. and Mares J, Short bursts of weak pulses break postictal inhibition in the neocortex of wistar rats. *Epilepsia* 2003; 44: 636-639
- [22] Ojemann GA, Temporal lobe epilepsy –current wisdom. *Stereotact Funct Neurosurg* 2001; 77: 213-215.
- [23] Omori K, Inagaki C. and Sasa M, Molecular mechanism underlying epileptic seizure: forwards development of novel drugs for untreatable epilepsy. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1999; 114: 161-168.
- [24] Zeinali T, Mirnajafi-Zadeh J, Sheibani V, Abbasnejad M. and Palizvan MR, The role of adenosine A1 receptors in post seizure depression period in rats, *Iranian J Physiol Pharmacol* 2007; 11: 174-81. (persian)
- [25] Tsai ML. and Leung LS, Decrease of hippocampal GABA B receptor-mediated inhibition after hyperthermia-induced seizures in immature rats. *Epilepsia* 2006; 47: 277-287.
- [26] Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR. and Delgado-Escueta AV, Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J Neurosci* 1990; 10: 267-282.
- [27] Evans MS, Cady CJ, Disney KE, Yang L. and LaGuardia JJ, Three brief epileptic seizures reduce inhibitory synaptic currents, GABA(A) currents, and GABA(A)-receptor subunits. *Epilepsia* 2006; 47: 1655-1664.
- [28] Peterson GM, Ribak CE. and Oertel WH, A regional increase in the number of hippocampal GABAergic neurons and terminals in the seizure-sensitive gerbil. *Brain Res* 1985; 340: 384-389.
- [29] Roberts RC, Ribak CE. and Oertel WH, Increased numbers of GABAergic neurons occur in the inferior colliculus of an audiogenic model of genetic epilepsy. *Brain Res* 1985; 361: 324-338.
- [30] Kaura S, Bardfors HF, Young AM, Croucher MJ. and Hughes PD, The effect of amygdaloid kindling on the content and release of amino acids from the amygdaloid complex: in vitro and in vivo studies. *J Neurochem* 1995; 65: 1240-1249.
- [4] Goddard GV, McIntyre DC. and Leech CK, A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 1969; 25: 295-330.
- [5] McNamara JO, Analyses of the molecular basis of kindling development. *Psychiatry Clin Neurosci* 1995; 49: S175-178.
- [6] Bertram E, The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48: 65-74.
- [7] Gray L, Seizure and epilepsy. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (editors), *Principles of neural sciences*, New York: McGraw-Hill 2000; p. 910-35.
- [8] McNamara JO, Byrne MC, Dasheiff RM. and Fitz JG, The kindling model of epilepsy: a review. *Prog Neurobiol* 1980; 15: 139-159.
- [9] During MJ. and Spencer DD, Adenosine a potential mediator of seizure arrest and postictal refractoriness. *Ann Neurol* 1992; 32: 618-624.
- [10] Chin JH, Adenosine receptors in brain: Neuromodulation and role in epilepsy. *Ann Neurol* 1986; 26: 695-698.
- [11] Treiman DM, GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 2001; 42: 8-12.
- [12] Nagatomo K, Ueda Y, Doi T, Takaki M. and Tsuru N, Functional role of GABA transporters for kindling development in GLAST KO mice. *Neurosci Res* 2007; 57: 319-321.
- [13] Liefgaard LC, Ploeger BA, Molthoff CF, de Jong HW, Dijkstra J, van der Weerd L, Lammertsma AA, Danhof M, and Voskuyl RA. Changes in GABA<sub>A</sub> receptor properties in amygdala kindled animals: In vivo studies using [<sup>11</sup>C] flumazenil and positron emission tomography. *Epilepsia* 2009; 50: 88-98.
- [14] Nolte MW, Löscher W, Herden C, Freed WJ. and Gernert M, Benefits and risks of intranigral transplantation of GABA-producing cells subsequent to the establishment of kindling-induced seizures. *Neurobiol Dis* 2008; 31: 342-354.
- [15] Paxinos G, Watson C, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, New York, Academic Press 1986.
- [16] Racine RJ, Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32: 281-294.
- [17] Velisek L. and Mares P, Differential effects of naloxone on postictal depression. *Epilepsy Res* 1992; 12: 37-43.
- [18] Shao J. and Valenstein ES, Long-term inhibition of kindled seizures by brain stimulation. *Exp Neurol* 1982; 76: 376-392.

## The role of GABA<sub>A</sub> receptor activity in post-ictal depression period in a rat kindling model of epilepsy

Javad Mirnajafi-Zadeh (Ph.D)<sup>1,2</sup>, Vahid Sheibani(Ph.D)<sup>2</sup>, Mohammad Reza Palizvan (Ph.D)<sup>3</sup>, Mehdi Sadegh (M.Sc)<sup>2</sup>, Tahere Zeinali (M.Sc)<sup>4</sup>

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

2- Neuroscience Research Centre, Kerman University of Medical Sciences, Kerman , Iran

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

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

(Received: 2 F 2009 Accepted: 14 May 2009)

**Introduction:** Following the seizure there is an inhibitory period named “post-ictal depression period” which has a depressing effect on the following seizure. In this study, the role of GABA<sub>A</sub> receptors on post-ictal depression period was investigated in amygdala kindling model of epilepsy in rat.

**Materials and Methods:** Animals were kindled by electrical stimulation of amygdala. Then, they were divided into four groups. Different groups of kindled animals were received a second stimulation at 10, 30, 60 and 90 min after the first stimulation and the percentage of suppression of seizure parameters after the second stimulation was calculated. In another four groups, bicucullin, a selective GABA<sub>A</sub> receptor antagonist (100 nM), was intra-cerebroventricularly microinjected 10 min before the second stimulation and its effect on the percentage of suppression induced by the first stimulation was investigated. Six animals were used in each group.

**Results:** When the second stimulation was applied at 10 and 30 min after the first stimulation a significant reduction was observed in the seizure severity and seizure parameters were depressed after the second stimulation. Bicucullin microinjection significantly decreased the percentage of depression in seizure parameters following the second stimulation compared to the animals received the solvent alone ( $P < 0.05$ ). This decrease was significant when the second stimulation was applied at 10 and 30 min after the first stimulation.

**Conclusion:** Obtained results showed that activity of GABA<sub>A</sub> receptors by endogenous GABA is one of the mechanisms involved in post-ictal depressing period. However, the blocking of these receptors could not completely prevent this period. Thus, other factors have also role in its induction.

**Keywords:** Epilepsy, Post-ictal depression, GABA<sub>A</sub> receptor

---

\* Corresponding author: Fax: +98 21 82884555 ; Tel: +98 21 82883865

mirnajaf@modares.ac.ir