

Effect of Low-Frequency Stimulation on Adenosine A₁ and A_{2A} Receptors Gene Expression in Dentate Gyrus of Perforant Path Kindled Rats

A. Jahanshahi, M.Sc.¹, J. Mirnajafi-Zadeh, Ph.D.^{1*}, M. Javan, Ph.D.¹,
M. Mohammad-Zadeh, Ph.D.¹, R. Rohani, M.Sc.²

1. Physiology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University
2. Anatomy Department, Faculty of Medicine, Shaheed Beheshti University of Medical Science

✉ *Corresponding Address: P.O.Box: 14115-331, Physiology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: mirnajaf@modares.ac.ir

Abstract

Received: 19/Dec/2007, Accepted: 15/Mar/2008

Objective: It has been suggested that low frequency stimulation (LFS) exerts its inhibitory effect on epileptogenesis through adenosine receptors activation. In the present study, effect of different LFS frequencies on A₁ and A_{2A} receptors gene expression was investigated in perforant path kindled seizures.

Materials and Methods: Animals were kindled by perforant path stimulation. Afterdischarges were recorded from the dentate gyrus. LFS (0.5, 1 and 5 Hz) was applied at the end of each kindling stimulation. On the 7th day, A₁ and A_{2A} receptors gene expression were evaluated in the dentate gyrus.

Results: Application of different LFS frequencies retarded the kindling acquisition. Also, it decreased the afterdischarge durations and behavioural seizure stages 4 and 5 significantly. LFS application prevented the kindling induced decrease in the A₁ receptor gene expression. On the other hand, LFS attenuated the level of A_{2A} receptor gene expression in the dentate gyrus. LFS had the most effect at the frequency of 5 Hz.

Conclusion: It may be suggested that antiepileptogenic effects of LFS is mediated somehow through changes in the gene expression of adenosine A₁ (which has inhibitory effects) and A_{2A} (which has excitatory effects) receptors. These effects might be somehow frequency dependent.

Keywords: Low Frequency Stimulation, Adenosine Receptors, Kindling, Dentate Gyrus

Yakhteh Medical Journal, Vol 10, No 2, Summer 2008, Pages: 87-92

اثر تحریک الکتریکی با فرکانس پایین بر میزان بیان گیرنده های آدنوزینی A_{2A} و A_1 ژيروس دنداندار در کیندلینگ مسیر پرفورنت در موش صحرایی

علی جهانشاهی ^۱، M.Sc.، سیدجواد میرنجفی زاده ^{۱*}، Ph.D.، محمدجوان ^۲، Ph.D.، محمد محمدزاده ^۲، Ph.D.، رضیه روحانی ^۲، M.Sc.

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

۲. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

✉ آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

پست الکترونیک: Email: mirnajaf@modares.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۹/۲۸، پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۲۵

* **هدف:** بررسی اثر تحریک الکتریکی با فرکانس پایین بر میزان بیان گیرنده های آدنوزینی A_1 و A_{2A} ژيروس دنداندار در کیندلینگ مسیر پرفورنت در موش صحرایی
 * **مواد و روش ها:** با تحریک الکتریکی مسیر پرفورنت تشنج های کیندلینگ در حیوانات ایجاد و امواج تخلیه متعاقب از ژيروس دنداندار ثبت شد. پس از پایان هر تحریک کیندلینگ، LFS (Low-Frequency Stimulation) با فرکانس های ۰/۵، ۱ و ۵ هرتز اعمال شد. روز هفتم، میزان بیان ژن گیرنده های آدنوزینی A_1 و A_{2A} با استفاده از تکنیک RT-PCR نیمه کمی در ژيروس دنداندار بررسی شد.
 * **یافته ها:** اعمال فرکانس های مختلف LFS اثرات مهاري بر روند کیندلینگ داشت و به طور معنی داری مجموع مدت زمان تخلیه های متعاقب و همچنین متوسط بروز مراحل تشنجی ۴ و ۵ را به صورت معنی داری کاهش دادند. به علاوه، اعمال فرکانس های مختلف LFS به طور معنی داری مانع از کاهش ایجاد شده در بیان گیرنده های A_1 در طی کیندلینگ شد و در مقابل، میزان بیان گیرنده های A_{2A} کاهش یافت. LFS بیشترین تاثیر را در فرکانس ۵ هرتز داشت.
 * **نتیجه گیری:** می توان پیشنهاد کرد جلوگیری از کاهش بیان ژن گیرنده های A_1 (که اثر مهاري دارند) و کاهش بیان ژن گیرنده های A_{2A} (که اثر تحریکی دارند) ممکن است در اعمال اثرات ضد تشنجی LFS نقش داشته باشند. این اثرات تا حدی وابسته به فرکانس LFS است.

کلیدواژگان: تحریک الکتریکی با فرکانس پایین، گیرنده های آدنوزینی، کیندلینگ، شکنج دنداندار

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دهم، شماره ۲، تابستان ۸۷، صفحات: ۸۷-۹۲

مقدمه

از جمله آدنوزین، سبب ایجاد LTD یا تضعیف پس از تقویت می شود (۶). آدنوزین دارای اثرات ضد تشنجی در مدل صرعی کیندلینگ است که این اثر عمدتاً از طریق گیرنده های آدنوزینی A_1 اعمال می شود (۷). از طرف دیگر، مطالعات زیادی حاکی از افزایش گیرنده های A_1 در کوتاه مدت (تا ۲۴ ساعت) پس از کیندلینگ است (۸، ۹). گزارش هایی نیز مبنی بر عدم تغییر این گیرنده ها در کوتاه مدت پس از کیندلینگ وجود دارد (۱۰، ۱۱). در مورد گیرنده های A_{2A} نیز هم کاهش (۱۲)، و هم عدم تغییر در کوتاه مدت پس از کیندلینگ گزارش شده است (۱۱). گیرنده های A_1 در اثربخشی LFS بر تقویت طولانی مدت (Long-Term Potentiation: LTP) و ایجاد تضعیف پس از تقویت نیز دخیل هستند (۱۳). در مقابل، گزارش های ضد و نقیضی در مورد نقش گیرنده های A_{2A} در اثر بخشی LFS بر LTP وجود دارد (۱۴، ۱۵) و با توجه به تشابه پدیده های کیندلینگ و LTP، نمی توان نقش این گیرنده ها را به درستی در اثربخشی LFS بر کیندلینگ پیش بینی کرد. با توجه به اینکه مطالعه قبلی ما نشان داد که فعالیت گیرنده های آدنوزینی در اعمال اثرات ضد تشنجی LFS نقش دارند، در این تحقیق برای بررسی بهتر مکانیسم های احتمالی LFS و نقش گیرنده های آدنوزین به عنوان واسطه اثرات مهاري LFS بر روند صرع زایی، تاثیر اعمال فرکانس های مختلف LFS بر بیان ژن گیرنده های آدنوزینی A_1 و A_{2A} در شکنج دنداندار طی کیندلینگ مسیر پرفورنت، مورد مطالعه قرار گرفت.

صرع یک اختلال عصبی شایع است و با توجه به اینکه هنوز حدود ۳۰ درصد بیماران صرعی به داروهای ضدصرع موجود مقاوم هستند تحقیقات زیادی برای یافتن روش درمانی موثری برای این گروه از بیماران در حال انجام است. در این تحقیقات از مدل های آزمایشگاهی مختلفی از جمله کیندلینگ، که مدلی مناسب برای مطالعه صرع لوب گیجگاهی است، استفاده می شود (۱). طی سال های اخیر تحریک الکتریکی نواحی خاصی از مغز به عنوان روش درمانی جدید برای این گروه از بیماران مورد استفاده قرار گرفته است (۲). تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین، می تواند سبب اثرات مهاري و حفاظتی در مقابل روند گسترش فعالیت صرعی شود و نشان داده شده است که LFS (Low-Frequency Stimulation) باعث تاخیر و حتی مهار گسترش روند صرع زایی ناشی از کیندلینگ آمیگدال می شود (۳). هر چند مکانیسم هایی که LFS از طریق آنها اثرات ضد تشنجی خود را اعمال می کند هنوز روشن نشده است، اما شواهدی وجود دارد که بیان می کند LFS از طریق تضعیف طولانی مدت (Long-Term Depression: LTD) یا تضعیف پس از تقویت (Depotentiation) باعث ایجاد نوعی پلاستیستی سیناپسی می شود (۳). گزارش هایی مبنی بر اینکه ایجاد LTD و تضعیف پس از تقویت توسط LFS وابسته به فرکانس است، وجود دارد (۴) و مکانیسم اثر LFS در ایجاد LTD و Depotentiation بسته به فرکانس آن متفاوت است (۵). به علاوه، شواهد موجود، بیانگر این است که LFS از طریق افزایش رهایش نوروترانسمیترهای مهاري و نورومودولاتورها،

مواد و روش ها

جراحی و کیندل کردن حیوانات

در این مطالعه از موش صحرایی نر نژاد Wistar با وزن ۲۷۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. کار با حیوانات بر اساس "دستورالعمل اخلاق در مطالعات حیوانی" دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. برای بیهوشی، سدیم پنتوباریتال (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به روش داخل صفاقی به حیوانات تزریق می‌شد. حیوان بیهوش درون دستگاه استریوتاکس قرار داده شد و بر اساس اطلس Paxinos و Watson (۱۶)، در موقعیت مسیر پرفورنت ۶/۹ میلی‌متر عقب‌تر و ۴/۱ میلی‌متر به سمت راست نسبت به برگما و ۳/۲-۳/۴ پایین‌تر از سطح سخت شامه و ژيروس دنداندار، ۲/۸ میلی‌متر عقب‌تر و ۱/۸ به سمت راست نسبت به برگما و ۲/۴-۲/۷ میلی‌متر پایین‌تر از سطح سخت شامه، که به ترتیب محل قرارگیری الکتروود دو قطبی تحریک و الکتروود تک‌قطبی ثبات بودند، مجموعه سوراخ می‌شد. دو الکتروود تک‌قطبی نیز به عنوان Earth و Differential توسط پیچ بر روی مجموعه قرار می‌گرفت. پس از بستن پیچ‌های لنگرگاه، حیوان برای ثبت به قفسه فارادی انتقال می‌یافت. پس از کارگذاری الکتروودهای تحریک و ثبات، با استفاده از استیمولاتور، تحریک الکتریکی با شدت ۲۵۰ تا ۵۰۰ میکروآمپر و با الگوی زوج پالس به مسیر پرفورنت اعمال می‌شد. در صورت قرار داشتن الکتروودهای ثبت و تحریک در محل مناسب، پتانسیل تحریکی پس سیناپسی جمعیتی (Population Excitatory Post-Synaptic Potentiation: pEPSP) به همراه پدیده تسهیل زوج پالس توسط نرم‌افزار ثبت می‌شد. در غیر این صورت محل این الکتروودها آنقدر تغییر داده می‌شد تا pEPSP مطابق با مشخصات ثبت الکتروفیزیولوژیک شکنج دنداندار ثبت شود. سپس با سیمان دندانپزشکی الکتروودها در محل خود ثابت می‌شدند. حداقل ده روز پس از جراحی، از شدت آستانه (شدتی که با آن امواج تخلیه متعاقب به مدت حداقل ۱۰ ثانیه ثبت می‌شدند) برای تحریک حیوانات استفاده می‌شد تا مراحل پنجمانه تشنج را نشان دهند.

برای تحریک حیوان از روش کیندلینگ سریع (Rapid kindling) استفاده شد. در این روش حیوانات هر روز ۱۲ بار در فواصل ۵ دقیقه‌ای با امواج مربعی تک‌فازی با فرکانس ۵۰ هرتز، مدت پالس ۱ میلی‌ثانیه و به مدت ۵ ثانیه و با شدت آستانه، تحریک می‌شدند (گروه کیندل). در گروه‌هایی از حیوانات که علاوه بر تحریکات کیندلینگ، LFS دریافت می‌کردند (گروه‌های KLFS) بلافاصله بعد از اتمام تحریکات کیندلینگ LFS به مدت ۲۰۰ ثانیه و با فرکانس‌های ۰/۵، ۱ و ۵ هرتز در تمام فواصل بین تحریکات کیندلینگ به حیوان اعمال و اثر آن بر کمیت‌های تشنجی بررسی شد. مشخصات LFS به صورت امواج مربعی تک‌فازی با فرکانس‌های ۰/۵، ۱ و ۵ هرتز، مدت پالس ۱ میلی‌ثانیه و به مدت ۲۰۰ ثانیه با شدت آستانه بود. گروه‌های دیگری از حیوانات فقط LFS با فرکانس‌های ۰/۵، ۱ و ۵ هرتز در یافت می‌کردند (گروه‌های LFS). در گروه کنترل، حیوانات جراحی شده هیچ‌گونه تحریک الکتریکی دریافت نمی‌کردند.

کمیت‌های تشنجی اندازه‌گیری شده عبارت بودند از: ۱. مدت زمان تخلیه‌های متعاقب جمعیتی (Cumulative ADD) که به صورت مجموع زمان‌های تخلیه‌های متعاقب از شروع تحریکات تا کیندل شدن حیوان محاسبه شد ۲. مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه (Daily ADD) که به صورت مجموع مدت زمان تخلیه‌های متعاقب پس از ۱۲ تحریک در یک روز محاسبه می‌شد. ۳. بروز بالاترین مرحله از مراحل پنج‌گانه رفتار تشنجی در هر روز.

بررسی تغییرات بیان گیرنده‌های آدنوزینی

حیوان پس از دریافت تحریکات به مدت ۷ روز و ۲۴ ساعت پس از آخرین تحریک، کشته و ناحیه شکنج دنداندار استخراج شد. علت انتخاب ۷ روز این بود که متوسط تعداد روزهای لازم برای کیندل شدن در حیوانات گروه کیندل $6/8 \pm 0/6$ روز بود. کل RNA موجود در بافت مورد استفاده با کمک محلول استخراج RNx+ (شرکت سینا ژن) و بر اساس پروتکل کلروفورم-الکل استخراج شد. سپس از روی تمام mRNAهای موجود در نمونه استخراج شده، با کمک آنزیم نسخه‌برداری معکوس و پرایمر Oligo-dt، cDNA ساخته می‌شد. برای مهار آنزیم مداخله‌گر RNase، به واکنش RNasin (مهارگر RNase) اضافه می‌شد.

از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای تکثیر قطعه ای از cDNA مربوط به ژن‌های A_1AR ، $A_{2A}AR$ و β -اکتین استفاده شد. فرایند PCR با کمک آنزیم پلیمرز Taq و پرایمرهای اختصاصی پیشرو و معکوس برای هر ژن انجام می‌گرفت. برای هر نمونه واکنش‌های PCR با کمک Master mix تهیه و در هر واکنش پرایمرهای مربوط به یکی از ژن‌های β -Actin، A_1AR و یا $A_{2A}AR$ استفاده شد (جدول ۱). نهایتاً ۱۰ میکرولیتر از محصول هر واکنش پس از مخلوط شدن با بافر مخصوص (Loading buffer) به چاهک‌های ژل آگارز ادرصد اضافه می‌شد. در دو طرف نمونه‌ها، Ladder DNA با فواصل تفکیک ۱۰۰ bp اضافه می‌شد. پس از پایان الکتروفورز، ژل در دستگاه Gel documentation قرار می‌گرفت و از آن تصویربرداری می‌شد. تصویر به دست آمده ذخیره و دانسته باندهای مورد نظر روی آن توسط نرم‌افزار UV TECH اندازه‌گیری می‌شد. برای هر نمونه تراکم باند مربوط به A_1AR و $A_{2A}AR$ نسبت به تراکم باند مربوط به β -Actin محاسبه می‌شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری

تفاوت آماری در میزان امواج تخلیه متعاقب طی روند صرع زایی بین گروه‌های آزمایشی توسط آزمون تجزیه و تحلیل واریانس از نوع Repeated Measures و آزمون LSD محاسبه شد. برای مقایسه وقوع مراحل پنجمانه تشنجی بین گروه‌های آزمایشی نیز از آزمون غیرپارامتریک Mann-Whitney استفاده شد. مقایسه میزان بیان گیرنده‌های آدنوزینی نیز توسط آزمون ANOVA یک طرفه انجام شد. برای بررسی داده‌ها بین گروه‌های مختلف آزمون t غیر زوج‌ها مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها به صورت (میانگین \pm خطای معیار میانگین) ارائه شده‌اند. $p < 0/05$ به عنوان حداقل سطح معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای اندازه‌گیری بیان ژن گیرنده‌های آدنوزینی

ژن مورد نظر	پرایمر	توالی
A_1AR	F	3'-GCTGGAACAACCTGAGTGT-5'
A_1AR	R	3'-GTGGGACAGGGAGAACGT-5'
$A_{2A}AR$	F	3'-CCTGTCTGTTTCGAGGACGT-5'
$A_{2A}AR$	R	3'-ACATCCCGAGGAGAGCCTT-5'
β -Actin	F	3'-CCCAGAGCAAGAGAGGCATC-5'
β -Actin	R	3'-CTCAGGAGGAGCAATGATCT-5'

یافته‌ها

تاثیر فرکانس‌های مختلف LFS بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت

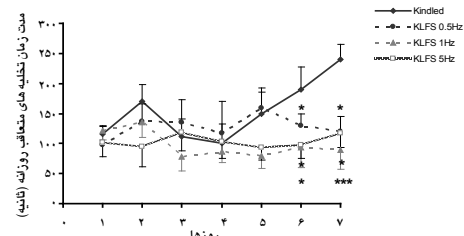
میانگین شدت تحریکات آستانه برای شروع تخلیه‌های متعاقب در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری با هم نداشت و این بدان معناست که استعداد ابتلا به حملات تشنجی در تمامی گروه‌ها یکسان بود.

آزمون تجزیه و تحلیل واریانس از نوع Repeated Measures و آزمون LSD نشان داد تحریک الکتریکی مسیر پرفورنت توسط LFS در فواصل بین تحریکات کیندلینگ در گروه‌های KLFS، کاهش معنی‌داری را در مجموع تخلیه‌های متعاقب روزانه (dADD) روزهای ششم و هفتم نسبت به گروه کیندل ایجاد کرد (شکل ۱). اما تفاوت معنی‌داری در میزان این امواج بین هیچ یک از گروه‌های KLFS مشاهده نشد. مجموع کل تخلیه‌های متعاقب از روز اول تا هفتم نیز در گروه‌های KLFS نسبت به گروه کیندل کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.001$) (جدول ۲).

جدول ۲: مقادیر مجموع کل تخلیه‌های متعاقب (cADD) در گروه‌های آزمایشی مختلف

گروه آزمایشی	cADD (s)
Kindled	259 ± 1079
KLFS 0.5Hz	*** 435 ± 896
KLFS 1Hz	*** 186 ± 682
KLFS 5Hz	*** 283 ± 728

مقادیر به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین نشان داده شده‌اند. *** نشان دهنده $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کیندل است.

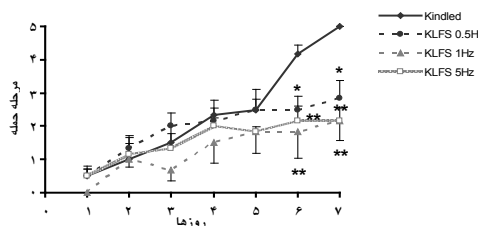


شکل ۱: اثر اعمال LFS بر مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه. اعمال LFS به همراه تحریکات کیندلینگ (KLFS) باعث کاهش مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه طی روند کیندلینگ مسیر پرفورنت می‌شود. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین نشان داده شده‌اند. * نشان دهنده $p < 0.05$ و *** نشان دهنده $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کیندل است ($n=6$).

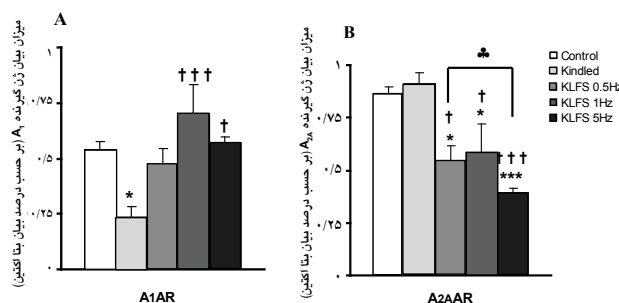
استفاده از آزمون Mann-Whitney نشان داد متوسط بروز مراحل تشنج در روزهای ششم و هفتم به طور معنی‌داری در گروه‌های KLFS نسبت به گروه کیندل کاهش یافت (شکل ۲). در اینجا نیز گروه‌های مختلف KLFS در مقایسه با یکدیگر تفاوت معنی‌داری را در بروز مراحل رفتاری تشنج در طی هفت روز نشان ندادند.

تاثیر فرکانس‌های مختلف LFS بر میزان بیان ژن گیرنده‌های آدنوزینی A_{2A} و A_1

در بررسی ژل RNA وجود دو باند S18 و S28 ریپوزومی واضح و موید عدم تجزیه RNA بود. همچنین نسبت به دست آمده برای طول موج‌های $A_{260/280}$ بین ۱/۸ و ۲ و نشان دهنده درجه خلوص قابل قبول RNA بود. واکنش PCR در محدوده میزان Template ۱ تا ۴ میکرو لیتر و با تعداد سیکل برابر به صورت خطی عمل کرد و از مقدار ۲ میکرو لیتر برای آزمایش‌ها استفاده شد. هر چند اندازه قطعات تکثیر شده در واکنش PCR متناسب با اندازه مورد نظر (بر اساس موقعیت پرایمرهای طراحی شده) برای گیرنده‌های آدنوزینی A_{2A} و A_1 بود، با این حال به منظور اطمینان از صحت قطعه تکثیر شده در واکنش PCR، از روش Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) استفاده شد. آنزیم BamHI محصول تکثیر شده برای cDNA مربوط به گیرنده‌های آدنوزینی A_{2A} و A_1 که به ترتیب ۶۱۸ و ۶۴۰ جفت باز داشتند را به قطعات مورد انتظار، شکست و واکنش PCR را تأیید کرد (A_1) به دو قطعه، به طول‌های ۱۷۹ و ۴۱۸ جفت باز و A_{2A} به دو قطعه، به طول‌های ۱۴۱ و ۳۷۹ جفت باز شکسته شد).



شکل ۲: تاثیر LFS بر بروز مراحل رفتاری تشنج طی روند کیندلینگ مسیر پرفورنت. کاهش معنی‌داری در متوسط بروز مراحل ۴ و ۵ تشنج در روزهای ششم و هفتم در گروه‌هایی که همراه تحریکات کیندلینگ LFS دریافت می‌کردند (KLFS) نسبت به گروهی که تنها تحریکات کیندلینگ را دریافت می‌کردند (Kindled) ایجاد شد. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین نشان داده شده‌اند. * نشان دهنده $p < 0.05$ و ** نشان دهنده $p < 0.01$ در مقایسه با گروه کیندل است ($n=6$).



شکل ۳: تاثیر اعمال LFS با فرکانس‌های مختلف بر تغییرات میزان بیان ژن گیرنده‌های آدنوزینی A_{2A} و A_1 ناشی از کیندلینگ در شنج دنداندار. در گروه‌هایی که به همراه تحریکات کیندلینگ، LFS با فرکانس‌های ۰/۵ (KLFS 0.5Hz)، ۱ (KLFS 1Hz) و ۵ (KLFS 5Hz) هرگز دریافت می‌کردند از کاهش میزان mRNA گیرنده آدنوزینی A_1 در نتیجه تحریکات کیندلینگ جلوگیری شد (A) و کاهش معنی‌داری در میزان mRNA گیرنده آدنوزینی A_{2A} نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (B). مقادیر، بر اساس میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شده‌اند. † نشان دهنده $p < 0.05$ و ††† نشان دهنده $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کیندل است. * نشان دهنده $p < 0.05$ و ** نشان دهنده $p < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل است. † نشان دهنده $p < 0.05$ و ††† نشان دهنده $p < 0.001$ در مقایسه گروه‌های KLFS 5Hz و KLFS 0.5Hz است ($n=6$).

اندازه گیری میزان mRNA گیرنده های آدنوزینی A_1 و A_{2A} در شکنج دنداندار با استفاده از تکنیک RT-PCR نیمه کمی (Semi-quantitative) نشان داد بیان داده های حاصل از حیوانات گروه کنترل و حیواناتی که جراحی هم روی آنها انجام نشده بود، تفاوت معنی داری وجود ندارد. بنابراین، داده های تمامی گروه های آزمایشی با گروه کنترل مقایسه شد. میزان mRNA گیرنده آدنوزینی A_1 در شکنج دنداندار حیوانات گروه کیندل نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت (شکل ۳A). اعمال LFS با فرکانس های ۰/۵، ۱ و ۵ هرتز، به دنبال تحریکات کیندلینگ (گروه های KLFS) به طور معنی داری از کاهش میزان بیان mRNA گیرنده A_1 های آدنوزینی جلوگیری کرد. به نحوی که سطح بیان mRNA گیرنده های آدنوزینی A_1 در این گروه ها تغییر معنی داری با گروه کنترل نشان نداد (شکل ۳A). به علاوه، بین گروه های KLFS 1Hz و KLFS 5Hz و گروه کیندل نیز تفاوت معنی داری وجود داشت (شکل ۳A). اما تفاوت معنی داری بین گروه های مختلف KLFS در بیان ژن گیرنده های آدنوزینی A_1 وجود نداشت. بر خلاف گیرنده های A_1 ، اعمال تحریکات کیندلینگ در گروه کیندل تغییر معنی داری در میزان mRNA گیرنده آدنوزینی A_{2A} نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد. در مقابل، اعمال تحریکات LFS به طور معنی داری باعث کاهش میزان mRNA گیرنده های آدنوزینی A_{2A} ، در مقایسه با گروه کنترل شد (شکل ۳B) که در اینجا بین گروه های مختلف KLFS تفاوت معنی دار بود. به علاوه، اعمال تحریکات LFS به تنهایی و بدون اعمال تحریکات کیندلینگ سبب تغییر معناداری در میزان mRNA گیرنده های آدنوزینی A_1 و A_{2A} نسبت به گروه کنترل نشد.

نتایج حاصله نشان داد اعمال فرکانس های مختلف LFS در مسیر پرفورنت بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ موجب مهار چشمگیر روند ایجاد تشنج شد. در گروه های KLFS مدت زمان تخلیه های متعاقب روزانه و مدت زمان تخلیه های متعاقب تجمعی نسبت به گروهی که فقط تحریکات کیندلینگ دریافت می کردند کاهش معنی داری نشان داد. در عین حال اعمال LFS کاهش معنی داری در متوسط بروز مراحل ۴ و ۵ تشنج ایجاد می کند. مراحل پنج گانه تشنجات کیندلینگ را می توان به دو دوره تقسیم کرد: دوره کانونی شدن تشنجات که شامل مراحل ۱ تا ۳ می شود و دوره عمومی شدن تشنجات که شامل مرحله ۴ و ۵ است (۱۷). با توجه به داده های مطالعه حاضر شاید بتوان گفت که نقش اصلی LFS مهار مرحله گذر از تشنجات کانونی به تشنجات عمومی است.

در این مطالعه، اعمال هر سه فرکانس ۰/۵، ۱ و ۵ هرتز LFS، اثرات مهاری و ضد تشنجی یکسانی بر روی کمیت های الکتروفیزیولوژیک و رفتاری تشنج داشت. با توجه به اثرات مهاری LFS بر LTP (۱۰) و احتمال وقوع LTP در حین کیندلینگ (۱۸)، ممکن است LFS با کاهش پاسخدهی سیناپسی در مدارهای صرعی از طریق مکانیسم هایی مثل تضعیف پس از تقویت، سبب مهار روند گسترش فعالیت های تشنجی شود. از طرف دیگر، ممکن است مکانیسم اثر مهاری LFS بر تشنج، مشابه حالتی باشد که LTD ایجاد می کند (۳، ۲۰). با در نظر گرفتن این حقیقت که القای تضعیف پس از تقویت در حیوانات بالغ آسانتر از القای LTD است، پیشنهاد می شود اعمال LFS بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ مشابه با تضعیف پس از تقویت باشد (۱۰). علاوه بر این، القای LTD در شکنج دنداندار چندان موفقیت آمیز نبوده است (۲۱) و نوع تحریکات LFS در آزمایش های این مطالعه هم مشابه تحریکاتی

بوده است که قادر نبود LTD در شکنج دنداندار ایجاد کند (۲۲). بنابراین، احتمالاً اعمال LFS در آزمایش های این مطالعه از طریق تضعیف پس از تقویت اثرات ضد تشنجی ایجاد کرده است. داده های حاصل از RT-PCR نیمه کمی، نقش گیرنده های آدنوزینی A_1 را در اثرات ضد تشنجی LFS تأیید می کند. این مطالعه نشان داد اعمال LFS با فرکانس های ۰/۵، ۱ و ۵ هرتز به دنبال تحریکات کیندلینگ، جلوی کاهش بیان گیرنده A_1 را می گیرد. با توجه به اینکه گیرنده های A_1 واسطه اصلی اثرات ضد تشنجی آدنوزین محسوب می شوند (۷) این داده ها ممکن است نشان دهنده اهمیت وجود این گیرنده ها در ایجاد اثرات ضد تشنجی LFS باشد. در مورد تغییرات بیان گیرنده های A_1 در تشنجات ناشی از کیندلینگ، اکثر مطالعات انجام شده حاکی از افزایش این گیرنده ها در کوتاه مدت (تا ۲۴ ساعت) است (۱۸، ۲۰، ۲۱، ۲۳)، هر چند گزارش هایی نیز مبنی بر عدم تغییر این گیرنده ها وجود دارد (۱۰، ۱۱). این مطالعه نشان داد به دنبال کیندلینگ مسیر پرفورنت، میزان mRNA گیرنده های آدنوزینی A_1 در شکنج دنداندار به صورت معنی داری کاهش پیدا می کند. این مشاهده با گزارش های قبلی در مورد تغییر گیرنده های آدنوزینی A_1 به دنبال تشنجات ایجاد شده توسط کیندلینگ مطابقت ندارد. اما باید به این نکته توجه داشت که در مطالعاتی که افزایش گیرنده های آدنوزینی A_1 را به دنبال کیندلینگ گزارش کرده اند، پروتئین گیرنده ها مورد سنجش قرار گرفته و نه میزان mRNA گیرنده های آدنوزینی A_1 .

بخش دیگری از نتایج این مطالعه نشان داد که به دنبال اعمال تحریکات کیندلینگ در مسیر پرفورنت تغییر معنی داری در میزان mRNA گیرنده A_{2A} مشاهده نمی شود. این مشاهده با گزارش های قبلی در مورد عدم تغییر بیان ژن گیرنده A_{2A} به دنبال تشنجات ایجاد شده توسط مدل الکتروشوک (Electroconvulsive Shock) مطابقت دارد (۱۱). به علاوه، نتایج این تحقیق نشان داد که اعمال LFS به دنبال تحریکات کیندلینگ به صورت وابسته به فرکانس، سبب کاهش بیان گیرنده A_{2A} می شود.

در مورد نقش گیرنده های A_{2A} در جریان تشنجات صرعی، اتفاق نظر کاملی وجود ندارد. با این حال فوجی و همکارانش نشان دادند اثر LFS بر تضعیف پس از تقویت با مهار گیرنده های A_{2A} تسهیل می شود (۶، ۲۳). در زمینه تغییرات بیان گیرنده های A_{2A} در تشنجات ناشی از کیندلینگ در کوتاه مدت، مطالعات انجام شده هم کاهش (۲۱) و هم افزایش (۲۴) این گیرنده ها را نشان داده است. همچنین نشان داده شده به دلیل تداخل عمل گیرنده های A_{2A} با گیرنده های A_1 فعال شدن گیرنده های A_{2A} علاوه بر اینکه تمایل (affinity) گیرنده های A_1 را کاهش می دهد، پاسخ این گیرنده ها را نیز ضعیف تر می کند (۲۵). بنابراین کاهش بیان این گیرنده ها توسط LFS احتمالاً موجب افزایش پاسخدهی گیرنده های A_1 و در نتیجه بروز هر چه بیشتر اثرات ضد تشنجی LFS می شود.

نتایج این مطالعه همچنین نشان داد اعمال LFS با فرکانس ۵ هرتز اثر مهاری بیشتری بر گیرنده های A_{2A} دارد. به نظر می رسد افزایش فرکانس LFS اثر بخشی بیشتری در کاهش بیان ژن گیرنده های آدنوزینی A_{2A} داشته باشد. در تأیید این نظریه، گزارش شده LFS با فرکانس ۱۰ هرتز نسبت به فرکانس های ۱ و ۵ هرتز کارایی بیشتری در فعال کردن گیرنده های NMDA دارد (۲۶). در اینجا مشاهده شد که تغییرات ایجاد شده در بیان ژن گیرنده های A_{2A} تا حدی وابسته به فرکانس LFS است. این داده ها با گزارش های قبلی در مورد تاثیر تغییرات فرکانس LFS در فعالیت و یا عدم فعالیت گیرنده های NMDA جهت ایجاد تضعیف پس از تقویت مطابقت دارد (۲۶).

بحث

۹۱

نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل می‌توان پیشنهاد کرد جلوگیری از کاهش بیان ژن گیرنده‌های A_1 (که اثر مهاری دارند) و کاهش بیان ژن گیرنده‌های A_{2A} (که اثر تحریکی دارند) ممکن است در اعمال اثرات ضد تشنجی LFS نقش داشته باشند و این اثرات تا حدی وابسته به فرکانس LFS است.

References

- McNamara JO. Analyses of the molecular basis of kindling development. *Psychiatry Clin Neurosci*, 1995; 49: S175-178
- Goodman JH, Berger RE, Tchong TK. Preemptive low-frequency stimulation decreases the incidence of amygdala-kindled seizures. *Epilepsia*, 2005; 46: 1-7
- 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*, 1995; 6: 2171-2176
- Kemp N, McQueen J, Faulkes S, Bashir ZI. Different forms of LTD in the CA1 region of the hippocampus: role of age and stimulus protocol. *Eur J Neurosci*, 2000; 12: 360-366
- Kemp N, Bashir ZI. Long-term depression: a cascade of induction and expression mechanisms. *Prog Neurobiol*, 2001; 65: 339-365
- Fujii S, Kuroda Y, Ito KL, Yoshioka M, Kaneko K, Yamazaki Y, et al. 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 Lett*, 2000; 279: 121-124
- Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 2001; 24: 31-55
- Angelatou F, Pagonopoulou O, Kostopoulos G. Alterations of A1 adenosine receptors in different mouse brain areas after pentylenetetrazol-induced seizures, but not in the epileptic mutant mouse 'tottering'. *Brain Res*, 1990; 534: 251-256
- Angelatou F, Pagonopoulou O, Maraziotis T, Olivier A, Villemeure JG, Avoli M, et al. Upregulation of A1 adenosine receptors in human temporal lobe epilepsy: a quantitative autoradiographic study. *Neurosci Lett*, 1993; 163: 11-14
- Ekonomou A, Sperk G, Kostopoulos G, Angelatou F. Reduction of A1 adenosine receptors in rat hippocampus after kainic acid-induced limbic seizures. *Neurosci Lett*, 2000; 284: 49-52
- Newman M, Zohar J, Kalian M, Belmaker RH. The effects of chronic lithium and ECT on A1 and A2 adenosine receptor systems in rat brain. *Brain Res*, 1984; 291: 188-192
- Aden U, O'Connor WT, Berman RF. Changes in purine levels and adenosine receptors in kindled seizures in the rat. *Neuroreport*, 2004; 15: 159-185
- Fujii S, Saito K, Miyakawa H, Ito K, Kato H. Reversal of long-term potentiation (depotentiation) induced by tetanus stimulation of the input to CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Brain Res*, 1991; 555: 112-122
- Folbergrova J. Cyclic GMP and cyclic AMP in the cerebral cortex of mice during seizures induced by

توجه به این نکته ضروری است که تحریک الکتریکی با فرکانس بالا نیز در درمان بیماری صرع مورد استفاده قرار گرفته و اثرات درمانی آن هم مشاهده شده است. اما LFS به دلیل آسیب بافتی ناچیز، مصرف انرژی کمتر و در برخی موارد اثرات طولانی‌تر نسبت به تحریک الکتریکی با فرکانس بالا می‌تواند جایگزین بهتری در درمان صرع باشد (۲۷).

- 3-mercaptopropionic acid: effects of anticonvulsant agents. *Neurosci Lett*, 1980; 16: 291-296
- Huang CC, Liang YC, Hsu KS. A role for extracellular adenosine in time-dependent reversal of long-term potentiation by low-frequency stimulation at hippocampal CA1 synapses. *J Neurosci*, 1999; 19: 9728-938
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press; 1986
- Sato M, Racine RJ, McIntyre DC. Kindling: basic mechanisms and clinical validity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1990; 76: 459-472
- Wasterlain CG, Mazarati AM, Naylor D, Niquet J, Liu H, Suchomelova L, et al. Short-term plasticity of hippocampal neuropeptides and neuronal circuitry in experimental status epilepticus. *Epilepsia*, 2002; 43 Suppl 5: 20-29
- Wasterlain CG, Mazarati AM, Shirasaka Y, Thompson KW, Penix L, Liu H, et al. Seizure-induced hippocampal damage and chronic epilepsy: a hebbian theory of epileptogenesis. *Adv Neurol*, 1999; 79: 829-843
- Velisek L, Veliskova J, Stanton PK. Low-frequency stimulation of the kindling focus delays basolateral amygdala kindling in immature rats. *Neurosci Lett*, 2002; 32: 61-63
- Heynen AJ, Abraham WC, Bear MF. Bidirectional modification of CA1 synapses in the adult hippocampus in vivo. *Nature*, 1996; 381: 163-166
- Bramham CR, Srebro B. Induction of long-term depression and potentiation by low- and high-frequency stimulation in the dentate area of the anesthetized rat: magnitude, time course and EEG. *Brain Res*, 1987; 405: 100-107
- Fujii S, Wakizaka A, Sekino Y, Kuroda Y, Ito K, Miyakawa H, et al. Adenosine A2 receptor antagonist facilitates the reversal of long-term potentiation (depotentiation) of evoked postsynaptic potentials but inhibits that of population spikes in hippocampal CA1 neurons. *Neurosci Lett*, 1992; 148: 148-150
- Vanore G, Giraldez L, Rodriguez de Lores Arnaiz G, Girardi E. Seizure activity produces differential changes in adenosine A1 receptors within rat hippocampus. *Neurochem Res*, 2001; 26: 225-230
- Lin CH, Lee CC, Gean PW. Involvement of a calcineurin cascade in amygdala depotentiation and quenching of fear memory. *Mol Pharmacol*, 2003; 63: 44-52
- Berretta N, Cherubini E. A novel form of long-term depression in the CA1 area of the adult rat hippocampus independent of glutamate receptors activation. *Eur J Neurosci*, 1998; 10: 2957-2963
- Durand DM, Bikson M. Suppression and control of epileptiform activity by electrical stimulation: a review. *Proc IEEE*, 2001; 89: 1065-1082