تأثیر فعالیتهای آدنوزینی A_1 در نورونهای ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ بر تشنجهای ایجاد شده به روش کیندلینگ الکتریکی در قشر انتورینال موش صحرایی

علی حیدریان‌پور M.Sc.☆، سید جواد میرنجفی‌زاده Ph.D.☆، یعقوب فتح‌الهی Ph.D.☆

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

♦ آدرس مکاتبه: صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

چکیده

* **هدف:** بررسی نقش گیرنده‌های آدنوزینی‌های A_1 نورونهای ناحیه CA1 هیپوکمپ بر تشنجهای ناشی از کیندلینگ الکتریکی قشر انتورینال

* **مواد و روشها:** موشهای صحرایی با تحریک الکتریکی روزانهٔ قشر انتورینال کیندل شدند. به حیوانات کیندل شده، N^6- سیکلو هگزیل آدنوزین (CHA)، آگونیست اختصاصی گیرندهٔ A_1 با غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۵۰ میکرو مولار و ۱ و ۳- دی متیل - ۸ - سیکلوپنتیل گزانتین (CPT)، آنتاگونیست اختصاصی گیرندهٔ A_1 با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرو مولار به ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ تزریق شدند (۱۶۹/۲۲min) حیوانها در زمانهای ۵، ۱۵، ۲۰ دقیقه پس از تزریق تحریک شدند. به تمامی حیوانات ۲۴ ساعت قبل از تزریق دارو، مایع مغزی - نخاعی مصنوعی تزریق و از داده‌های حاصل به عنوان کنترل استفاده گردید.

* **یافته‌ها:** تزریق داروی CHA با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار باعث کاهش معنی داری در مدت زمان امواج تخلیهٔ متعاقب (ADD) ثبت شده از قشر انتورینال و ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ و مدت زمان مرحلهٔ ۵ تشنج (S_5D) شد و زمان تأخیری بین تحریک تا شروع مرحلهٔ ۴ تشنج (S_4L) را افزایش داد. CHA با غلظت ۵۰ میکرومولار، مدت زمان تشنج (SD) را نیز بطور معنی‌داری کاهش داد. تزریق CHA با غلظت ۱ میکرومولار تأثیری بر کمیت‌های تشنجی نداشت. CPT با غلظت ۵ میکرومولار به ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ تأثیر معنی داری بر کمیت‌های تشنجی نداشت ولی با غلظت ۱۰ میکرومولار باعث کاهش معنی داری در S_4L و افزایش معنی داری در ADD و S_5D شد ولی تأثیر معنی داری روی SD نداشت. پیش درمانی حیوانات با CTP (۵ میکرومولار) بطور معنی داری اثرات CHA (۵۰ و ۱۰ میکرو مولار) را بر کمیت‌های تشنجی حذف کرد.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصله این احتمال را مطرح می‌کند که فعالیت نورونهای ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ در گسترش امواج تشنجی از قشر انتورینال به سایر نواحی نقش داشته و فعالیت گیرنده‌های آدنوزینی A_1 این نورونها توسط CHA، باعث ایجاد اثرات ضد تشنجی در کیندلینگ ناشی از تحریک قشر انتورینال شود.

کل واژگان: تشنج، قشر انتورینال، هیپوکمپ، کیندلینگ

مقدمه

شناخت مکانیسمهای ایجاد صرع از دیر باز یکی از موضوعات مورد تحقیق بشر بوده است، ولی علی رغم تحقیقات وسیع در این زمینه، هنوز مکانیسم دقیق ایجاد آن مشخص نگردیده است و داروهای ضد صرع موجود، فقط علائم این بیماری را کنترل کرده و مانع درمان قطعی آن نمی‌شود (۱، ۲). برای شناسایی پاتوفیزیولوژی بیماری صرع و کشف داروهایی که بتوانند مانع وقوع حملات صرع شوند، از مدلهای آزمایشگاهی مختلفی استفاده می‌شود. یکی از این مدلها، کیندلینگ است. در این مدل حیوان مورد آزمایش بصورت مکرر و با فواصل زمانی مشخص توسط محرک ضعیفی که در ابتدا قادر به ایجاد تشنج نیست، تحریک می‌شود و به مرور زمان همان تحریک ضعیف باعث بروز رفتارهای تشنجی در حیوان می‌گردد. پس از هر بار تحریک، رفتار تشنجی شدیدتر شده و در نهایت به تشنج تحریکی یا عمومی منجر می‌شود (۲، ۳). تشنجهایی که بدین روش ایجاد می‌شود، مشابه رایجترین نوع تشنج یعنی تشنجهای پیچیده موضعی است (۴).

از آن‌جاکه منشأ ایجاد اکثر تشنجهای موضعی پیچیده در انسان سیستم لیمبیک است، تحقیقات زیادی برای پی بردن به نقش بخشهای مختلف این سیستم در ایجادگسترش حملات تشنجی با استفاده از مدل کیندلینگ، انجام شده است. قشر انتورینال یکی از این بخشها است که دارای ارتباطات وسیع با سایر نواحی سیستم لیمبیک و نواحی حسی حرکتی بوده و به نظر می‌رسد نقش مهمی در تولید و گسترش حملات تشنجی داشته باشد (۵).

هنگام ایجاد تشنج به روش کیندلینگ در قشر انتورینال، امواج تشنجی از این ناحیه به سایر نقاط مغز منتشر می‌شود و این نواحی ممکن است اثرات تحریکی یا مهاری بر گسترش امواج تشنجی داشته باشند (۵). از آنجاکه ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ ارتباط آناتومیکی و فیزیولوژیکی با قشر انتورینال دارد (۶). احتمال می‌رود که در انتشار امواج تشنجی از قشر انتورینال نقش مهمی داشته باشد. بنابراین ممکن است هر عاملی که فعالیت نورونهای ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ را تحت تأثیر قرار دهد، بر عمل انتشار امواج تشنجی از قشر انتورینال به سایر نقاط مغز تأثیر گذارد (۵). یکی از این عوامل آدنوزین است. آدنوزین یک تعدیل کننده نورونی درون زاد است که در شرایط طبیعی اثر مهاری تونیک روی فعالیت مغزی دارد؛ این اثر مهاری باعث تنظیم تحریک پذیری نورونها می‌شود (۷). نتایج حاصل از آزمایشها نشان داده شده است که آدنوزین در مدلهای مختلف ایجاد صرع از جمله کیندلینگ اثرات ضدتشنجی دارد و اثر ضدتشنجی آن از طریق گیرنده‌های آدنوزینی A_1 واسطه گری می‌شود (۷، ۸). این گیرنده‌ها با تراکم زیادی در ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ یافته شده‌اند (۹).

با توجه به وجود ارتباطات آناتومیک و فیزیولوژیک بین ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ و قشر انتورینال و تراکم زیادگیرنده‌های آدنوزینی A_1 در نورونهای CA1 هیپوکمپ (۱۰)، هدف از این تحقیق مشخص نمودن نقش فعالیت گیرنده‌های آدنوزینی A_1 نورونهای ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ بر روی تشنجهای ایجاد شده به روش کیندلینگ قشر انتورینال است.

مواد و روشها

* جراحی حیوانات

در این تحقیق از موشهای صحرای نر نژاد Sprague-Dawley (مؤسسه رازی تهران) در محدودهٔ وزنی ۳۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات با تزریق داخل صفاتی مخلوطی از کتامین ۱۰۰mg\kg و رامپون (به نسبت هشت به یک) بیهوش شده و در استریوتاکس قرار می‌گرفتند. سپس دو الکترود تک قطبی که به عنوان Differential و Earth توسط پیچهای متصل به آنها بر روی جمجمه محکم می‌شدند. در این تحقیق به دلیل اینکه حیوانات از طریق تحریکات الکتریکی قشر انتورینال کیندل می‌شدند، الکترود سه قطبی در قشر انتورینال با مختصات قرار ۶/۷ میلی متر به سمت عقب نسبت به برگما، ۴/۷ میلی متر به سمت راست و ۶/۸ میلی متر پایین‌تر از سخت شامه قرار می‌گرفت (۱۱). دو قطب از این الکترود برای تحریک قشر انتورینال و یک قطب آن برای ثبت به‌کار می‌رفت. کانولهای راهنما به صورت دو طرفه در ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ پشتی با مختصات ۳/۶ میلی متر به سمت عقب نسبت به برگما، ۲/۳ میلی متر به سمت راست و چپ و ۲/۲ میلی متر پایین‌تر از سخت شامه کار گذاشته می‌شدند (۱۱). به کانولی که در سمت راست کار گذاشته می‌شد الکترودی نیز متصل بود تا فعالیت الکتریکی ناحیه CA1 هیپوکمپ پشتی نیز قابل ثبت باشد. بعد از آن پینهای متصل به الکترودها را وارد سوکت مخابراتی کرده و سوکت بوسیله سیمان دندانپزشکی روی سطح جمجمه محکم می‌گردید.

یک هفته بعد از جراحی، ابتدا شدت آستانه تحریک تعیین می‌شد. بدین ترتیب که ابتدا قشر انتورینال حیوان توسط جریانی با شدت ۵۰μA تحریک می‌شد. اگر این شدت جریان برای ایجاد امواج تخلیه متعاقب به مدت حداقل ۵ ثانیه کافی بود به عنوان جریان آستانه در نظر گرفته می‌شد. در غیر این صورت، با فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای، شدت جریان هر بار ۱۰ میکروآمپر افزایش می‌یافت تا اینکه تخلیه‌های متعاقب ثبت گردد. سپس حیوانات هر ۲۴ ساعت یکبار با شدت جریان آستانه تحریک شده تا کیندل شوند و ۵ مرحلهٔ تشنج را نشان دهند. مراحل حمله تشنجی در مدل کیندلینگ عبارتند از: مرحله اول، حرکات دهان و صورت؛ مرحله دوم، انقباض عضلات گردن و حرکت سر به بالا و پایین؛ مرحله سوم، کلونوس در یکی از اندامهای جلویی؛ مرحله چهارم، ایستادن حیوان روی اندامهای عقبی همراه با کلونوس دو اندام جلویی و مرحله پنجم، اختلال در تعادل و زمین خوردن.

آزمایشها بر روی حیواناتی صورت می‌گرفت که ۵ بار مرحله ۵ تشنج را نشان می‌دادند. کمیتهایی ذیل بعد از هر بار تحریک اندازه‌گیری می‌شدند: مدت زمان تخلیه‌های متعاقب قشر انتورینال (Entorhinal cortex afterdischarge duration) که عبارت است از فاصله زمانی بین شروع تحریک اعمال شده به حیوان تا خاتمه ثبت امواج تخلیه متعاقب از قشر انتورینال؛ مدت زمان تخلیه‌های متعاقب ثبت شده از ناحیه CA1 هیپوکمپ (Hippocampal afterdischarge duration) یعنی فاصله زمانی بین

شروع تحریک اعمال شده به حیوان تا خاتمه ثبت امواج تخلیه متعاقب هیپوکمپ CA1؛ مدت زمان تاخیری بین تحریک الکتریکی و شروع مرحله ۴ تشنج (Stage 4 latency; S_4L)که فاصله زمانی بین شروع تحریک تا شروع مشاهده علایم مرحله ۴ تشنج است؛ مدت زمان مرحله ۵ تشنج (Stage 5 duration; S_5L) فاصله زمانی بین شروع مشاهده علایم مرحله ۵ تشنج تا خاتمه علایم این مرحله تشنج است؛ مرحله حمله تشنج (Seizure stage; SS) یعنی اینکه حیوان کدامیک از پنج مرحله تشنج را نشان می‌دهد مدت زمان کل تشنج (Seizure duration; SD) فاصله زمانی بین شروع تحریک اعمال شده به حیوان تا خاتمه علایم تشنجی و برگشت حیوان به حالت طبیعی. کمیتهای اول و دوم الکتروفیزیولوژیک و سایر کمیتها رفتاری هستند و فاصله زمانی در تمام کمیتها به وسیله کامپیوتر اندازه‌گیری شد. آزمایشها در ۲۱ گروه و در هر گروه حداقل ۶ حیوان استفاده گردیدو ضوابط اخلاقی موجز در بخش فارماکولوژی دانشگاه شهید بهشتی هنگام کار با حیوانات در نظر گرفته شد.

* تزریق دارو

تزریق CHA یا CPT به ناحیه CA1 هیپوکمپ

برای تزریق CHA یا CPT به ناحیه CA1 هیپوکمپ، این داروها در مایع مغزی نخاعی مصنوعی (ACSF) حل شدند. CHA با دُزهای ۱، ۱۰ و ۵۰ میکرومولار و CPT با دُزهای ۵ و ۱۰ میکرومولار به حیوانات کیندل، تزریق شد (۱μl/۲min) و حیوانات در زمانهای ۵، ۱۵ و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق تحریک شده و کمیتهای تشنجی آنها اندازه‌گیری شد. در همه آزمایشها، ۲۴ ساعت قبل از تزریق داروها، به حیوانات ACSF تزریق شد و از داده‌های حاصل به عنوان کنترل استفاده می‌گردید.

تزریق CHA همراه با CPT به ناحیه CA1 هیپوکمپ

در این آزمایش تزریق CPT، (۵ میکرومولار) ۵ دقیقه قبل از تزریق CHA (۱۰ و ۵۰ میکرومولار) صورت گرفت، و حیوانات در زمانهای ۵، ۱۵ و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق CHA تحریک می‌شدند و تمامی کمیتهای تشنجی بعد از تحریک، اندازه‌گیری می‌گردید.

* تأیید بافت‌شناسی

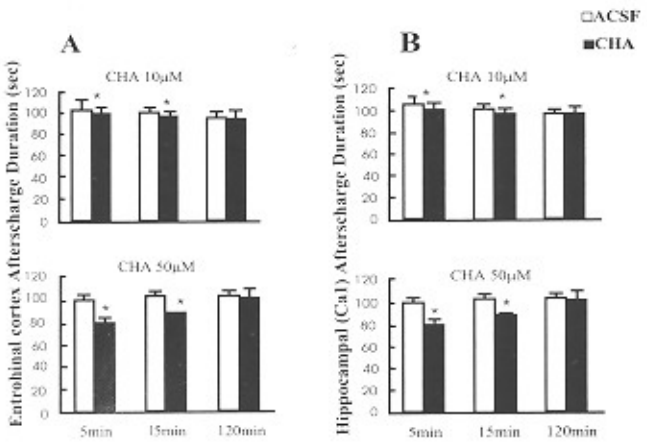
پس از پایان هر آزمایش جهت اطمینان از قرار داشتن الکترود و کانولها در محل مورد نظر به محل کانول ۱μl رنگ آبی متیل تزریق شده و محل الکترود نیز توسط جریان الکتریکی مستقیم با شدت ۱mA و به مدت زمان ۸ ثانیه تخریب گردید. سپس مغز حیوانات خارج و در محلول فرمالین ۱۰درصد قرار داده شد. بعد از یک هفته محل الکترود و کانول برش‌گیری شد تا محل الکترود و کانول مشخص گردد. فقط داده‌های حاصل از حیواناتی که الکترود آنها در موقعیت مناسب قرار داشت، مورد استفاده قرار گرفت.

* روش تجزیه و تحلیل اطلاعات

برای مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف CHA و CTP در زمانهای پس از تزریق دارو بر کمیتهای تشنج از آزمون ANOVA دو طرفه (از نوع Completely randomized) و آزمون Tukey استفاده شد. جهت مقایسه هر یک از کمیتها با کنترل مربوطه از آزمون t- زوجها استفاده گردید. همچنین برای مقایسه کمیتهای به دست آمده از گروهی که CHA دریافت کرده بودند با گروهی که CHA همراه با CPT دریافت کرده بودند، از آزمون t- غیر زوجها استفاده گردید.

یافته‌ها

تمامی حیواناتی که با تحریک قشر انتورینال کیندل شده بودند، قبل و بعد از تزریق ACSF مرحله ۵ تشنج را نشان دادند. CHA و CPT در دُزهای مورد استفاده اثر قابل توجهی بر رفتار و فعالیت حرکتی حیوان نداشتند. بررسیهای بافت‌شناسی نیز وجود الکترود قشر انتورینال و کانول در ناحیه CA1 هیپوکمپ را تایید کرد.

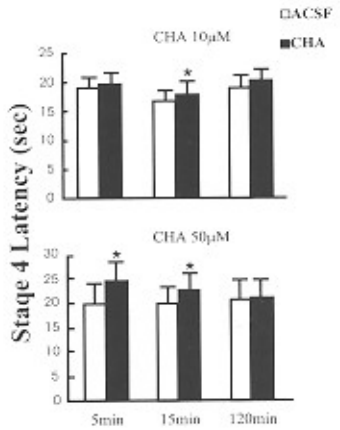


شکل ۱: اثر تزریق CHA (۱۰ و ۵۰ میکرومولار) به ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ بر امواج تخلیهٔ متعاقب ثبت شده، از قشر انتورینال (A) و ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ (B). حیوانات در زمانهای ۵، ۱۵ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق تحریک شدند. مقادیر بصورت میانگین ± خطای معیار میانگین و بر حسب ثانیه نشان داده شده‌اند.
* نشان دهندهٔ $P<0/05$ در مقایسه با حالت کنترل (تزریق ACSF) با استفاده از آزمون t- زوجها است $n=6-8$

* اثر تزریق CHA به ناحیه CA1 هیپوکمپ

به دنبال تزریق غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار CHA، کاهش معنی داری در ADD ثبت شده از قشر انتوربنال و ناحیه CA1 هیپوکمپ در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه پس از تزریق مشاهده شد (شکل ۱ A و B) و آزمون ANOVA دو طرفه نشان داد که این اثر وابسته به دُز ($P<0/01$) و زمان ($P<0/05$) بوده، اما وابسته به دُز×زمان نیست.

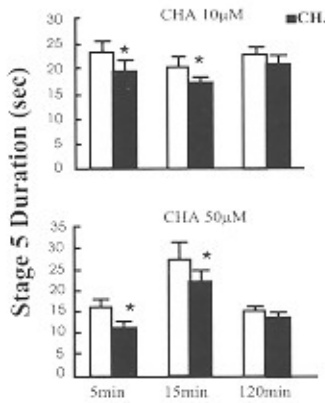
کمیت S4L در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه پس از تزریق ۵۰ میکرومولار و در زمان ۱۵ دقیقه بعد از تزریق ۱۰ میکرو مولار CHA به طور معنی داری افزایش یافت (شکل ۲).



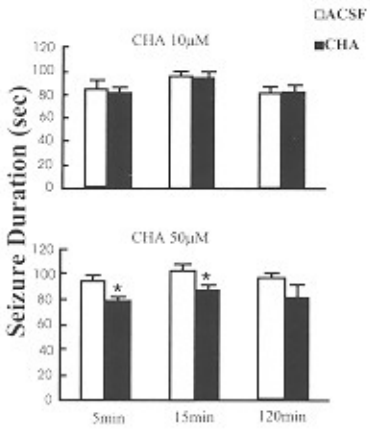
شکل ۲: اثر تزریق دو طرفه CHA (۱۰ و ۵۰ میکرومولار) به ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ بر زمان تاخیری بین تحریک تا شروع مرحلهٔ ۴ تشنج. حیوانات در زمانهای ۵، ۱۵ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق تحریک شدند. مقادیر بصورت میانگین ± خطای معیار میانگین و بر حسب ثانیه نشان داده شده‌اند. * نشان دهندهٔ $P<0/05$ در مقایسه با حالت کنترل (تزریق ACSF) با استفاده از آزمون t- زوجها است.

بر اساس آزمون ANOVA دو طرفه این اثر وابسته به دُز بوده ($P<0/01$) اما وابسته به زمان و یا دُز × زمان نیست.

کمیت S5D با تزریق غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار CHA در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه، بعد از تزریق بطور معنی داری کاهش یافت (شکل ۳).



شکل ۳: اثر تزریق دو طرفه CHA (۱۰ و ۵۰ میکرومولار) به ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ بر مدت زمان مرحلهٔ ۵ تشنج. حیوانات در زمانهای ۵، ۱۵ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق تحریک شدند. مقادیر بصورت میانگین ± خطای معیار میانگین بر حسب ثانیه نشان داده شده‌اند. * نشان دهندهٔ $P<0/05$ در مقایسه با حالت کنترل (تزریق ACSF) با استفاده از آزمون t- زوجها است.



شکل ۴: اثر تزریق دو طرفهٔ CHA (۱۰ و ۵۰ میکرومولار) به ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ بر مدت زمان کل تشنج. حیوانات در زمانهای ۵، ۱۵ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق تحریک شدند. مقادیر بصورت میانگین ± خطای معیار میانگین بر حسب ثانیه نشان داده شده‌اند. * نشان دهندهٔ $P<0/05$ در مقایسه با حالت کنترل (تزریق ACSF) با استفاده از آزمون t- زوجها است.

* اثر تزریق CTP به ناحیه CA1 هیپوکمپ

CPT با غلظت ۱۰ میکرومولار ۱۵ دقیقه پس از تزریق باعث افزایش معنی داری در ADD و S5L و کاهش معنی داری در S4L شد. آزمون ANOVA دو طرفه نشان داد که این تغییرات وابسته به دُز یا دُز × زمان نمی‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱: اثر تزریق CPT به ناحیه CA1 هیپوکمپ بر کمیتهای تشنجی ناشی از کیندلینگ قشر انتوربنال

کمیت اندازه گیری شده	زمان تحریک پس از تزریق	داروی تزریق شده	
		ACSF	CPT(10μM)
E-ADD	۵	۸۰/۸۵±۲/۲۹	۸۲/۳۰±۲/۵۲
	۱۵	۱۰۰/۹۲±۲/۹۶	۱۰۷/۳۳±۲/۳۳*
	۱۲۰	۸۳/۷۵±۲/۰۲	۸۶/۵۲±۳/۱۷
H-ADD	۵	۸۱/۸۴±۲/۵۹	۸۲/۳۰±۲/۶
	۱۵	۱۰۰/۴۲±۲/۵	۱۰۸/۳۱±۵/۶۳*
	۱۲۰	۸۷/۷۴±۲/۷	۸۳/۳۲±۳/۱۷
S4L	۵	۱۸/۴۳±۲/۷۸	۱۶/۹۱±۲/۵۳
	۱۵	۱۶/۵۶±۲/۰۲	۱۲/۲۷±۲/۰۵*
	۱۲۰	۱۸/۴۱±۲/۸۸	۱۷/۴۱±۲/۹۸
S5D	۵	۲۶/۲۹±۲/۷۰	۳۰/۹۸±۲/۸۲*
	۱۵	۲۵/۳۳±۲/۶۰	۲۶/۵۱±۲/۵۳*
	۱۲۰	۲۶/۲۹±۲/۴۳	۲۷/۵۴±۲/۶۲

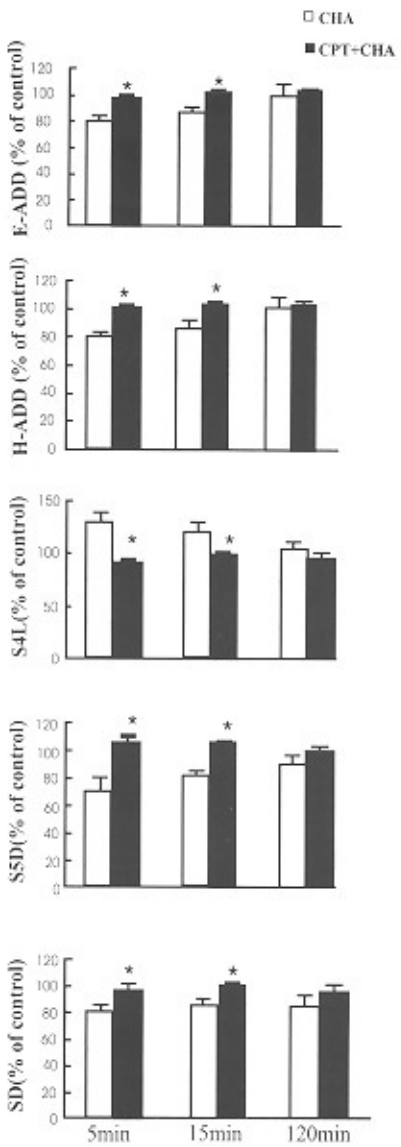
داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین نشان داده شده‌اند. در هر گروه تعداد حیوانات ۶ می‌باشد. * نشان دهنده $P<0/05$ در مقایسه با ACSF (گروه کنترل) با استفاده از آزمون t- زوجهاست

آزمون ANOVA دو طرفه نشان داد که این اثر وابسته به دُز ($P<0/01$) و زمان ($P<0/05$) بوده ولی وابسته به دُز × زمان نیست.

کمیت SD تنها در غلظت ۵۰ میکرومولار CHA، در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه بعد از تزریق بطور معنی داری کاهش یافت (شکل ۴). بر اساس آزمون ANOVA دو طرفه این اثر وابسته به دُز ($P<0/001$) بوده، اما وابسته به زمان و یا دُز × زمان نیست.

* اثر تزریق CHA همراه با CPT به ناحیه CA1 هیپوکمپ

آزمون t- غیر زوجها نشان داد هنگامی که CPT با غلظت ۵ میکرومولار ۵ دقیقه قبل از CHA ۱۰ و ۵۰ میکرومولار به حیوانات تزریق شود، اثرات کاهشی CHA بر ADD و S5D و اثر افزایشی آن بر S4L حذف می‌گردد.



شکل ۵: کاهش اثرات CHA بر مدت زمان تخلیهٔ متعاقب قشر انتورینال و هیپوکمپ، زمان تاخیری بین تحریک تا شروع مرحلهٔ ۴ تشنج (S5D) و مدت زمان مرحلهٔ ۵ تشنج (S5D) و مدت زمان تشنج (SD) به دنبال تزریق CPT ۵ دقیقه قبل از تزریق CHA (۵۰ میکرومولار)، CPT با غلظت ۵ میکرومولار تزریق شد. حیوانات در زمانهای ۱۵ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق CHA تحریک شدند. مقادیر به‌صورت ± خطای معیار میانگین و بر حسب ثانیه نشان داده شده‌اند.
* نشان دهندهٔ $P<0.05$ در گروه CHA با استفاده از آزمون t- غیر زوجها است ۸-۶=n

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که تزریق CHA، آگونیست اختصاصی گیرنده A_1 به ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ در گسترش امواج تشنجی ناشی از کیندلینگ قشر انتورینال نقش دارد.

مطالعاتی که در گذشته انجام شده است، نشان می‌دهند که آدنوزین اثرات ضد تشنجی خود را از طریق گیرنده‌های آدنوزینی A_1 اعمال می‌کند (۷، ۸). در تحقیقات قبلی این آزمایشگاه نیز، به دنبال تزریق آگونیست اختصاصی گیرنده‌های آدنوزینی A_1 به ناحیهٔ هیپوکمپ (۹)، آمیگدال (۱۲) قشر پری‌رانیال (۱۳) و قشر انتورینال (۱۴) اثرات ضد تشنجی در مدل ضد صرعی کیندلینگ آمیگدال مشاهده شده است. وجود تراکم زیادی از گیرنده‌های آدنوزینی A_1 در ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ (۱۵)، اثرات مهاری آگونیست‌های این گیرنده بر رهایش میانجی‌های تحریکی در برشهای زنده ناحیه CA1 هیپوکمپ (۱۰)، عدم تأثیر آن بر روی رهایش میانجی‌های مهاری مثل گابا در هیپوکمپ (۸، ۱۶) و فقدان یا کاهش گیرنده‌های A_1 در هیپوکمپ بیماران مصروع با منشأ لوب گیجگاهی (۱۷)، نشان دهنده نقش تعدیلی قوی آدنوزین در ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ است. بنابراین به نظر می‌رسد هیپوکمپ از جمله نواحی مغزی است که اهمیت زیادی در ایجاد اثرات ضد تشنجی آدنوزین از طریق گیرنده‌های A_1 دارد. در این تحقیق نیز تزریق CHA با غلظتهای ۱۰ و ۵۰ میکرومولار به صورت دو طرفه به ناحیه CA1 هیپوکمپ پشتی، باعث کاهش معنی داری در ADD ثبت شده از ناحیه CA1 هیپوکمپ شد که مؤید اثرات ضد تشنجی آدنوزین از طریق گیرنده‌های A_1 است. اما مطالعه برشهای زنده کمپلکس قشر انتورینال - هیپوکمپ نشان داده است که فعالیت تشنجی که در نورونهای قشر انتورینال ایجاد می‌شود (۱۸) و به شکنج دندانه‌ای منتشر می‌شوند، در این ناحیه تقویت نشده و به نواحی CA3 و CA1 هیپوکمپ نمی‌رسند (۵، ۱۹). مطالعات موجودات زنده نیز پیشنهاد می‌کند که شکنج دندانه‌ای به عنوان یک فیلتر از گسترش امواج تشنجی جلوگیری می‌کند (۲۰) و این عمل فیلتری به علت وجود اینترنورونهای مهاری فراوان در این ناحیه می‌باشد (۲۱). با این حال نشان داده شده است که کیندلینگ با تغییر عمل فیلتری شکنج دندانه‌ای، باعث تسهیل انتشار تشنجی از شکنج دندانه‌ای می‌شود (۲۲).

نقش هیپوکمپ در گسترش امواج تشنجی ناشی از کیندلینگ قشر انتورینال مهم به نظر می‌رسد. در این تحقیق با تزریق CHA با غلظتهای ۱۰ و ۵۰ میکرومولار به صورت دو طرفه به ناحیه CA1 هیپوکمپ پشتی حیواناتی که با تحریک الکتریکی قشر انتورینال کیندل شده بودند، کاهش معنی داری در زمان تخلیه متعاقب (ADD)، مدت زمان مرحله پنج تشنج (S5D) و افزایش معنی داری در زمان تاخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله چهارم تشنج (S4L) مشاهده گردید. تغییرات مذکور همگی دلالت بر اثرات ضد تشنجی داروی بکار رفته دارند. با توجه به اینکه در این تحقیق ناحیهٔ تزریق دارو CA1 هیپوکمپ و ناحیه تحریک قشر انتورینال بوده است لذا تغییری که در فعالیت نورونهای ناحیه CA1 هیپوکمپ بدنبال تزریق دارو رخ داده است، باعث کاهش تشنجی ناشی از کیندلینگ قشر انتورینال شده است.

تغییر معنی دار کمیتهای تشنجی در مدت زمان ۱۵ و ۵ دقیقه پس از تزریق CHA نشان می‌دهد که اولاً CHA به راحتی توسط آنزیمها تجزیه نمی‌شود و ثانیاً سرعت و انتشار آن به سایر نواحی مغزی (به

علت کم محلول بودن در چربی) ناچیز است (۲۳). حتی این احتمال را می‌توان مطرح کرد که اثرات دارو ۵ دقیقه پس از تزریق مربوط به ناحیه CA1 هیپوکمپ بوده ولی ۱۵ دقیقه پس از تزریق نواحی دیگر هیپوکمپ نیز دخیل می‌باشد. ولی در فاصله ۱۲۰ دقیقه احتمالاً دارو فرصت انتشار به سایر نواحی مغزی داشته، و تحت تأثیر فرآیند متابولیسم نیز قرار گرفته است، در نتیجه اثرات معنی داری روی کمیتهای تشنجی در آزمایش ما نشان نداده است. با این حال بررسی دقیق این موضوع نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

مکانیسم سلولی اثرات ضد تشنجی گیرنده‌های آدنوزینی A_1 از طرق باز کردن پتاسیمی و کلری مهار آدنیلات سیکلاز، فعال کردن فسفولیپاز C، مهار کانالهای کلسیمی (۷، ۸، ۲۴)، مهار رهایش نوروترانسمیترهای تحریکی و عدم تأثیر روی رهایش نوروترانسمیترهای مهاری مثل گابا در ناحیهٔ CA1 است (۲۵). بنابراین احتمال داده می‌شود آدنوزین از طریق مهار رهایش نوروترانسمیترهای تحریکی و عدم تأثیر بر رهایش نوروتراسمیترهای مهاری در ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ اثرات تشنجی خود را اعمال می‌کند.

برای تائید اینکه CHA واقعاً از طریق فعال کردن گیرنده‌های A_1 اثرات ضد تشنجی خود را اعمال می‌کند، CPT، آنتاگونیست اختصاصی گیرنده A_1، ۵ دقیقه قبل از CHA در ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ تزریق گردیدو نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان داد که در این حالت اثرات ضد تشنجی که هنگام تزریق آگونیست‌های آدنوزین به تنهایی مشاهده می‌شد، بروز نمی‌کند و حذف اثرات ضد تشنجی هنگام استفاده از CPT قبل از CHA نشان می‌دهد که CPT گیرنده‌های A_1 آدنوزینی را اشغال کرده است.

برای پی بردن به نقش آدنوزین درون زا در ناحیه CA1 هیپوکمپ، CPT به تنهایی و بصورت دو طرفه در این ناحیه تزریق گردید که در غلظت ۵ میکرومولار هیچ تغییر معنی داری در کمیتهای تشنجی ایجاد نکرد. در صورتی که ۱۵ دقیقه بعد از تزریق با غلظت ۱۰μM، باعث تقویت کمیتهای تشنجی شد، ولی در زمانهای ۵ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق تأثیر معنی‌داری روی کمیتهای تشنجی نداشت. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که هنگام تشنج غلظت آدنوزین افزایش می‌یابد و پیشنهاد شده که یکی از دلایل احتمالی خاتمه یافتن تشنج مربوط به تأثیر آدنوزین درون‌زاد است (۷، ۸، ۱۳). بنابراین تسریع روند کیندلینگ قشر انتورینال بدنبال تزریق آنتاگونیستها گیرنده A_1، نشان می‌دهد که آنتاگونیست به کار برده از تأثیر آدنوزین درون زا جلوگیری کرده شده است و نقش آدنوزین درون زاد به عنوان یک تعدیل کننده حملات تشنجی تائید می‌شود.

بطور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که در حیواناتی که با تحریک الکتریکی قشر انتورینال کیندل شده‌اند، تزریق دو طرفه غلظتهای مختلف CHA به ناحیه CA1 هیپوکمپ، مدت زمان امواج تخلیه متعاقب قشر انتورینال را کاهش می‌دهد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که هیپوکمپ احتمالاً به عنوان یکی از ساختارهای عصبی مهم در گسترش امواج تشنجی از قشر انتورینال به سایر نقاط مغزی عمل می‌کند و فعالیت گیرنده‌های آدنوزینی A_1 این ناحیه، با کاهش میزان فعالیت نورونهای آن، باعث کاهش شدت تشنج در کیندلینگ قشر انتورینال می‌شود به علاوه آدنوزین درون زاد موجود در ناحیه CA1 هیپوکمپ نقش ضد تشنجی ایفا می‌کند. هر چند تزریق CHA به ناحیه CA1 هیپوکمپ باعث تغییر معنی داری در کمیتهای تشنجی گردید، اما چون قادر به مهار مرحله تشنجی بطور کامل نیست، بنظر می‌رسد که علاوه بر ناحیهٔ CA1 هیپوکمپ نواحی دیگری نیز در مهار تشنجات قشر انتورینال نقش دارند که این موضوع باید در تحقیقات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

References

1. McNamara, J O: Drugs effective in the therapy of the epilepsy. In: Goodman and Gilmans: The pharmacological basis oftherapeutics, JG. Hardman, LE Limbird, (eds) Mc Graw-Hill, 2000; 521-549
2. McNamara, J O: Cellular and molecular basis of epilepsy. J Neurosci, 1994; 14: 3413-3425
3. Metha R, Dasgupta C, Ulla R: A neural network model for kindling of focal epilepsy: basic mechanism. Biol Cybern, 1993; 68: 335-340
4. Simonato M, Varani K, Muzzolini A, Bianchi C, Beani L, Borea PA: Adenosine Al receptors in the rat brain in the kindling model of epilepsy. Eur J Pharmacol 1994; 262: 121-124
5. Bradford HF: Glutamate,GABA and Epilepsy. Prog Neurobio, 1995; 47: 477-511
6. Dugladze T, Heinemann U, Gloveli T: Enthorhinal cortex projection cells to the hippocampal formation in vitro. Brain Res 2001; 905: 224-231
7. Dunwiddie TV, Masino SA: The role and regulation of adenosine in the central nervous system. Annu Rev Neurosci 2001; 24: 31-55
8. Dunwiddie TV: Adenosine and suppression of seizures. Med Res, 1999; 79: 1001-1010
9. Alasvandzarasvand M, Mirnajafi Zadeh J, Fathollahi Y, Palizvan MR: Anticonvulsant effect of bilateral injection of N^6-cyclohexyladenosine into the CA1 region of hippocampus in amygdala-kindled rats Epilepsy Res, 2001; 41-49
10. Grover LM, Chen R: The modulatin of excitatory synaptictransmission by adenosine in area CA1 of the rat hippocampus is temperature dependent. Neurosci Lett, 1999; 263: 77-80
11. Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, 1986

12. Mirnajafi Zadeh J, Fathollahi Y, Pourgholami MH: Intraperitoneal andintraamygdala N6-cyclohexyladenosine suppress hippocampal kindled seizures in rats. Brain Res 2000; 858: 48-54

13. 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 1999; 37: 37-43

۱۴. محمد زاده محمد، میرنجفی زاده سید جواد، فتح الهی یعقوب، روضاتی سید علی: اثر تعدیل فعالیت گیرنده‌های آدنوزینی A_1 نورونهای قشر انتورینال بر شدت تشنجهای ناشی از کیندلینگ آمیگدال در موشهای صحرایی. تشریه پزشکی یاخته، ۱۳۸۱؛ شماره ۱۴، صفحه ۷۱-۷۸

15. Chen Y, Graham DI, Stone TW: Release of endogenous adenosine and its metabolites by the action of NMDA receptors in the rats hippocampus in vivo Br J Pharmacol 1992; 166: 632-638

16. Cunha RA: Adenosine as a neuromodulator and as a homestatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. Neuro chem, 2001: 38: 107-125

17. Glass M, Faull RM, Bullock JY, Janes K, Mee EW, Walker EB, Synck BJL, Draguno M: Loss of A_1 adenosine receptors in human lobe epilepsy. Brain Res, 1996; 710: 56-68

18. Mody I, Lambert JDC, Heinemann U: Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. J Neurophysiol, 1987; 57: 869-888

19. Jones RSG, Lambert JDC: The role of excitatory amino acid receptors in the propagation of epileptiform discharges from the entorhinal cortex to dentate gyrus in vitro. Exp Brain Res, 1990; 80: 310-322

20. Collins RC, Tearse RG, Lothman EW: Functional anatomy of limbic seizures: focal discharges from medial entorhinal cortex in rat. Brain Res, 1983; 280: 25-40

21. Gloveli T, Schmitz D, Heinemann U: Interaction between superficial layers of the entorhinal cortex and hippocampus in normal and epileptic temporal lobe. Epilepsy Res, 1998; 32: 183-193

22. Behr J, Gloveli T, Gutierrez R, Heinemann U: Spread of low Mg^{2+} induced epileptiform activity from the rat entorhinal cortex to the hippocampus after kindling studied in vitro. Neurosci Lett, 1996; 216: 41-44

23. Jacobason KA, Van Galon PJM, Williams M: Adenosine receptors: pharmacology , structure relationships and therapeutic potential. J Med Chem 1992; 35: 407-422

24. Ralvic V, Burnstak G: Receptor for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev, 1998; 50: 413-422

25. Brundege JM, Dunwiddie TV: Role of adenosine as madulator of synaptic activity in the centeral nervous system. Adv Pharmacol 1997; 39: 353-391