

بررسی اثر دی-آرشیدونیل گلیسرول (2-AG) به عنوان یک کانابینوئید درونزاد بر تشنج‌های تونیک-کلونیک ناشی از پنتیلن تترازول (PTZ)

پریسا زارعی^۱، دکتر مهدی صادق^۲، محمدرضا پالیزوان^۳

نویسنده‌ی مسئول: گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک
m.sadegh@arakmu.ac.ir

دریافت: ۹۵/۲/۹ پذیرش: ۹۵/۶/۲

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به موثر بودن کانابینوئیدهای گیاهی بر مدل‌های صرع و تشنج، در مطالعه‌ی حاضر تاثیر تزریق دی-آرشیدونیل گلیسرول (2-AG) را به عنوان یک کانابینوئید درونزاد مهم بر شاخص‌های تشنج‌های تونیک-کلونیک القا شده توسط پنتیلن تترازول (PTZ) بررسی کردیم.

روش بررسی: مطالعه روی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم) انجام شد. مدل تشنج تونیک-کلونیک با یک تزریق داخل صفاقی PTZ (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ایجاد و رفتارهای تشنجی به مدت ۳۰ دقیقه بررسی شد. تزریق داخل صفاقی 2-AG (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت محلول در دی-متیل سولفوکساید (DMSO) حدود ۱۵ دقیقه قبل از تزریق PTZ انجام شد. در گروه شاهد حجم مشابه DMSO حدود ۱۵ دقیقه قبل از PTZ تزریق شد. تاخیر زمانی رسیدن به هر یک از مراحل تشنج، مدت زمان هر مرحله، تعداد دفعات وقوع هر مرحله و میزان مرگ ناشی از تشنج تونیک-کلونیک برای تحلیل استفاده شد.

یافته‌ها: تزریق PTZ به همراه DMSO در مقایسه با PTZ به تنهایی سبب افزایش معناداری در تاخیر زمانی رسیدن به مرحله‌ی ۱ و ۲ تشنج شد ($P < 0/05$)، اما بر تاخیر مراحل ۳ تا ۵ و دوره زمانی آنها اثر معناداری نداشت. تزریق داخل صفاقی 2-AG به همراه DMSO قبل از تزریق PTZ در مقایسه با تزریق PTZ به همراه DMSO تاثیر معناداری بر تاخیر زمانی و دوره زمانی تشنج‌های نداشت. اما درصد وقوع هر یک از مراحل تشنج همچنین درصد مرگ پس از تشنج تونیک-کلونیک را کاهش داد. میانگین مرحله تشنجی رخ داده نیز کاهش معناداری را نشان داد ($P < 0/05$).

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد تزریق 2-AG می‌تواند در کاهش شاخص‌های تشنجی ناشی از PTZ موثر باشد.

واژگان کلیدی: کانابینوئید، تشنج، DMSO، پنتیلن تترازول

مقدمه

صرع یک سندروم نورولوژیک قدیمی در انسان با شیوع حدود ۱ درصد می‌باشد (۱ و ۲). بیماران صرعی با حملات ناگهانی صرعی مواجه هستند که می‌تواند به شکل تشنج‌های تکرار شونده بروز کند. وقوع حملات صرعی و تشنج در اکثر

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک
- ۲- دکترای تخصصی فیزیولوژی، استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک
- ۳- دکترای تخصصی فیزیولوژی، دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک

موارد سبب اختلال در سطح هوشیاری مغز می‌شود (۳ و ۱). مدل‌های حیوانی صرع و تشنج کمک شایانی در دست‌یابی به روش‌های درمانی موجود برای این بیماری داشته‌اند، با این وجود و براساس گزارش‌های موجود حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد از بیماران به داروهای موجود پاسخ نمی‌دهند و به عبارتی دچار صرع مقاوم به دارو هستند (۵ و ۴). حملات تشنجی این بیماران شدید و طولانی بوده، که تکرار آن سبب اختلالات شناختی می‌شود. همچنین در مواردی از جمله کودکان مرگ ناگهانی بیمار در پی تشنج‌های شدید گزارش شده است (۶ و ۵). در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای یافتن روش‌های درمانی نوین و همچنین درمان بیماران صرع مقاوم به دارو انجام شده است.

گزارش‌های موردی از مطالعات انسانی در سال‌های اخیر نشان می‌دهند که مصرف فیتوکانابینوئیدهای (آلکالوئیدهایی مشتق از گیاه کانابیس) در تشنج‌های شدید تکرار شونده و مقاوم به دارو می‌تواند اثرات درمانی قابل توجهی داشته باشد (۸ و ۷). ولی به دلیل محدودیت‌های قانونی و اخلاقی در خصوص استفاده از مشتقات گیاه کانابیس (به دلیل طبقه‌بندی در خانواده‌ی مخدرها) هنوز مطالعات سازمان یافته‌ای در این خصوص صورت نگرفته است (۸). مطالعه بر روی مدل‌های حیوانی بیماری نیز نشان می‌دهد که استفاده از فیتوکانابینوئیدهای غیرروانگردان نظیر کانابیندیول (CBD) می‌تواند راهکار جدیدی در تشنج‌های مزمن و شدید باشد (۱۰ و ۹). هر چند مکانیسم دقیق اثر این گروه از فیتوکانابینوئیدها هنوز به صورت واضح مشخص نشده است اما به نظر می‌رسد بخشی از اثرها از طریق گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 و CB2 باشد، هر چند مسیرهای دیگری نیز پیشنهاد شده است (۱۱-۹).

سیستم اندوکانابینوئیدی به عنوان یک تعدیل‌گر عصبی جالب و مهم در مغز شناخته شده است. آناندامیدها (AEA) و دی-آرشیدونیل گلیسرول (2-AG) از مشتقات آرشیدونیک اسید و

دو لیگاند اصلی این سیستم هستند که هر کدام طی مسیرهای آنزیمی مشخصی تولید و حذف می‌شوند (۱۳ و ۱۲). هر دوی این ترکیبات بر گیرنده‌های CB1 و CB2 تاثیر می‌گذارند به علاوه این ترکیبات به دلیل عبور از غشای پلاسمایی می‌توانند اثرات مستقیمی هم بر تعدیل عملکرد کانال‌ها و گیرنده‌های غشایی و آنزیم‌های مسیرهای پیام‌رسانی داشته باشد (۱۴ و ۱۲). بنابراین حضور این ترکیبات در محیط نورونی و در محل ارتباطات سیناپسی می‌تواند سبب اثرات تعدیلی بر عملکردهای موجود باشد. نکته‌ی قابل توجه در خصوص این ترکیبات این است که سنتز و تجزیه‌ی آن‌ها متناسب با نیاز به صورت وابسته به زمان و مکان انجام می‌شود (۱۵). بنابراین قابلیت تنظیمی مهمی برای این اندوکانابینوئید ایجاد می‌شود که در تعدیل اختلالات سیستم عصبی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. با توجه به این موضوع در مطالعه‌ی حاضر پیامد افزایش سطح اندوکانابینوئید 2-AG با استفاده از تزریق داخل صفاقی آن، بر بروز تشنج‌های تونیک-کلونیک ناشی از PTZ بررسی شده است.

روش بررسی

حیوانات: در این مطالعه‌ی تجربی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۱۷۰ تا ۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در گروه‌های ۴ یا ۵ تایی در قفس و در شرایط استاندارد (دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی - ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. غذا و آب به جز در هنگام آزمایش به شکل آزاد در اختیار آن‌ها قرار گرفت. حجم نمونه متناسب با مطالعات مشابه ۶ تا ۱۰ موش صحرایی در هر گروه انتخاب شد. قرارگیری موش‌های صحرایی در هر گروه به روش تصادفی ساده صورت گرفت.

روش ایجاد و بررسی تشنج: برای ارزیابی رفتارهای تشنجی، داروی PTZ (پنتیلن ترازول، از شرکت Sigma-Aldrich) یک بار با غلظت (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به شکل داخل

انجام شد. بعد از ۱۵ دقیقه تزریق PTZ با دوز ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی انجام شد و بلافاصله بررسی مراحل تشنج به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت. -گروه 2-AG (DMSO+2-AG+PTZ): یک تزریق 2-AG (۱ میلی گرم بر کیلوگرم) به شکل محلول در DMSO (غلظت ۹۹/۹ درصد و ۰/۸ میلی لیتر) به صورت داخل صفاقی انجام شد انجام شد. سپس ۱۵ دقیقه بعد تزریق PTZ با دوز ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی انجام شد و بلافاصله بررسی مراحل تشنج به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها:

از نرم افزار آماری GraphPad Prism برای تحلیل آماری استفاده شد. داده‌هایی که از نوع پارامتریک بودند با آزمون One-way ANOVA و سپس آزمون تکمیلی Bonferroni مقایسه و تحلیل آماری شدند. داده‌های غیرپارامتریک با آزمون Kruskal-wallis و آزمون تکمیلی Dunns مقایسه و تحلیل آماری شدند. آمار توصیفی برای ارائه‌ی مقادیر درصد استفاده شد. $P < 0.05$ شاخص معناداری قرار گرفت. داده‌ها به صورت $Mean \pm SEM$ ارائه شده‌اند.

یافته‌ها

تزریق 2-AG تاثیر معناداری بر زمان رسیدن به مراحل تشنج و مدت زمان هر مرحله نداشت. تاخیر زمانی رسیدن هر یک از پنج مرحله تشنج (Seizure stage Latency: S1L-S5L) و طول مدت هر یک از پنج مرحله (Seizure stage Duration: S3D-S5D) بین سه گروه آزمایشی (شکل ۱) از طریق آزمون آماری One-way ANOVA و آزمون تکمیلی Bonferroni مقایسه و تحلیل شد. نتایج نشان داد که DMSO بر زمان رسیدن به مراحل ۱ و ۲ تشنج موثر است، به طوری که زمان رسیدن به مرحله ۱ تشنج (S1L) ($44/0 \pm 5/3$) در گروه

صفاقی (۱۶)، در گروه PTZ به تنهایی و یا در گروه‌های دارو و حلال ۱۵ دقیقه پس از دارو یا حلال به حیوان تزریق شد. پس از تزریق PTZ، حیوان در یک جعبه پلکسی گلاس (به ابعاد: ۳۵×۳۵×۳۵ سانتی متر) قرار داده شد و رفتارهای حیوان برای مدت ۳۰ دقیقه تحت نظر قرار گرفت و بروز مراحل رفتاری تشنج یادداشت شد (۱۷ و ۱۶).

تقسیم بندی مراحل تشنج (۱۹ و ۱۸):

مرحله‌ی یک: انقباض عضله‌های دهان و صورت.
مرحله‌ی دو: انقباض و حرکت عضله‌های سر و گردن.
مرحله‌ی سوم: انقباض دست‌ها.
مرحله‌ی چهار: انقباض دست‌ها و ایستادن روی دو پا.
مرحله‌ی پنجم: ایستادن روی دو پا به همراه افتادن به پهلو.
با روش مشاهده و ثبت زمان با استفاده از زمان سنخ دیجیتال، مدت زمان رسیدن به هر مرحله، مدت زمان طول کشیدن مراحل ۳ تا ۵، تعداد دفعات وقوع هر مرحله و میزان مرگ در حیوانات اندازه‌گیری و برای تحلیل ثبت گردید.

داروها و گروه‌های آزمایش

داروی مورد استفاده لیگاند اندوکانابینوئیدی 2-AG (Santa Cruz Biotech, US) بود که با دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت محلول در Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (۹۹/۹ درصد، Sigma-Aldrich) به عنوان حلال و به روش داخل صفاقی به حیوانات گروه شاهد و دارو تزریق شد. دوز مورد استفاده از 2-AG براساس گزارش‌های قبل (۲۰) انتخاب شد. حجم تزریق در تمام گروه‌ها در هر حیوان حدود ۰/۸ میلی لیتر بود.

گروه‌های مورد آزمایش

- گروه کنترل (PTZ): یک تزریق PTZ با دوز ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی انجام شد و بلافاصله بررسی مراحل تشنج به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت.
- گروه حلال (DMSO+PTZ): یک تزریق DMSO (غلظت ۹۹/۹ درصد و ۰/۸ میلی لیتر) به صورت داخل صفاقی

(DMSO+PTZ) نسبت به گروه (PTZ) ($11/9 \pm 1/2$ ثانیه) به‌طور معناداری افزایش را نشان می‌دهد ($P < 0/001$) برای (S1L)، همچنین زمان رسیدن به مرحله‌ی ۲ تشنج (S2L) ($98/7 \pm 18/7$ ثانیه) در گروه (DMSO+PTZ) نسبت به گروه (PTZ) ($32/3 \pm 4/3$ ثانیه) به‌طور معناداری افزایش یافته است ($P < 0/05$ برای S2L). با این وجود DMSO بر زمان رسیدن به مراحل ۳ تا ۵ و طول دوره این مراحل تاثیر معناداری نداشت ($P > 0/05$).

به علاوه بررسی آماری نشان داد که تزریق 2-AG (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) داخل صفاقی ۱۵ دقیقه قبل از تزریق PTZ در گروه (2-AG+DMSO+PTZ) تاثیر معناداری بر زمانی رسیدن به مراحل تشنج و طول مدت هر مرحله در مقایسه با گروه (DMSO+PTZ) نداشته است (شکل ۱). تعداد نمونه‌ها در گروه PTZ برابر ۱۲ در گروه DMSO+PTZ برابر ۱۱ و در گروه 2-AG+DMSO+PTZ برابر ۶ می‌باشد. داده‌ها به صورت Mean \pm SEM ارائه شده‌اند.

- تزریق 2-AG درصد وقوع مراحل ۳، ۴ و ۵ تشنج را کاهش داد.

درصد وقوع هر یک از مراحل ۳، ۴ و ۵ تشنج در سه گروه آزمایش به صورت توصیفی مورد بررسی قرار گرفت. درصد وقوع مرحله‌ی ۳ در سه گروه (PTZ)، (DMSO+PTZ) و (2-AG+DMSO+PTZ) به ترتیب (۹۱/۶ درصد)، (۱۰۰ درصد) و (۶۶/۶ درصد) بود که کاهش ۳۴ درصدی وقوع مرحله‌ی ۳ را در گروه (2-AG+DMSO+PTZ) نسبت به گروه (DMSO+PTZ) نشان می‌دهد (شکل ۲-A). درصد وقوع مرحله‌ی ۴ در سه گروه (PTZ)، (DMSO+PTZ) و (2-AG+DMSO+PTZ) به ترتیب (۸۳/۳ درصد)، (۹۰/۹ درصد) و (۵۰/۰ درصد) بود که کاهش حدود ۴۰ درصد وقوع مرحله‌ی ۴ را در گروه (2-AG+DMSO+PTZ) نسبت به گروه (DMSO+PTZ)

نشان می‌دهد (شکل ۲-B). همچنین درصد وقوع مرحله‌ی ۵ در سه گروه (PTZ)، (DMSO+PTZ) و (2-AG+DMSO+PTZ) به ترتیب (۴۱/۶ درصد)، (۹۰/۹ درصد) و (۳۳/۳ درصد) بود که کاهش حدود ۵۷ درصد وقوع مرحله‌ی ۵ را در گروه (2-AG+DMSO+PTZ) نسبت به گروه (DMSO+PTZ) نشان می‌دهد (شکل ۲-C). همان‌گونه که داده‌های ارائه شده نشان می‌دهد، درصد وقوع هر یک از مراحل ۳، ۴ و ۵ تشنج در گروه آزمایشی (2-AG+DMSO+PTZ) نسبت به گروه (DMSO+PTZ) به‌طور قابل توجه کاهش یافته است (شکل ۲). تعداد نمونه‌ها در گروه PTZ برابر ۱۲ در گروه DMSO+PTZ برابر ۱۱ و در گروه 2-AG+DMSO+PTZ برابر ۶ می‌باشد.

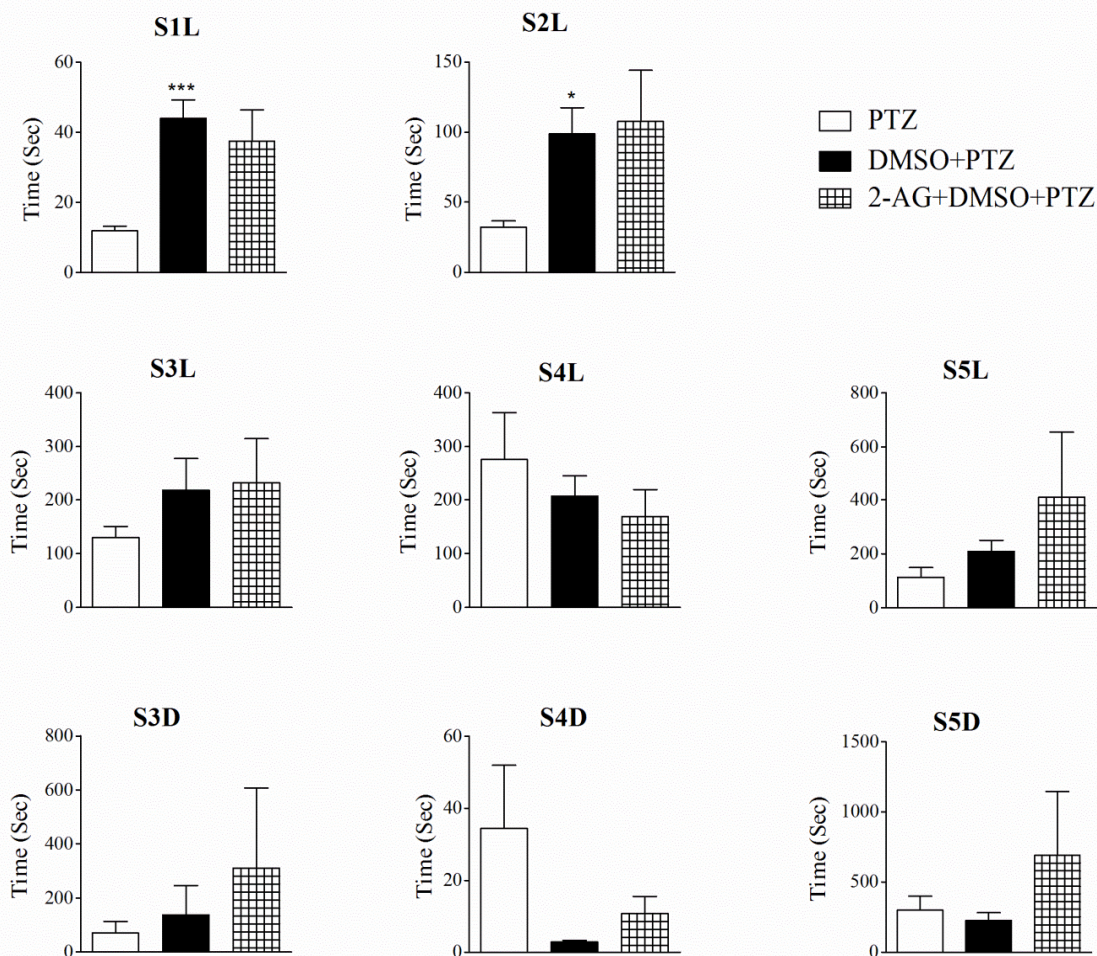
- تزریق 2-AG قبل از تزریق PTZ بروز مراحل تشنج را کاهش داد.

میانگین مرحله‌ی تشنجی بروز کرده در هر یک از سه گروه از طریق آزمون آماری Kruskal-Wallis و آزمون تکمیلی Dunn با هم مورد مقایسه و تحلیل قرار گرفت. میانگین مرحله‌ی تشنجی بروز یافته در سه گروه (PTZ)، (DMSO+PTZ) و (2-AG+DMSO+PTZ) به ترتیب ($4/2 \pm 0/3$)، ($4/8 \pm 0/2$) و ($3/5 \pm 0/5$) بود. تحلیل آماری تفاوت معناداری را در میانگین مرحله‌ی تشنجی بروز یافته در گروه (2-AG+DMSO+PTZ) در مقایسه با گروه (DMSO+PTZ) نشان داد ($P < 0/05$)، در حالی که بین گروه (DMSO+PTZ) و (PTZ) تفاوت معناداری وجود نداشت (شکل ۳). تعداد نمونه‌ها در گروه PTZ برابر ۱۲ در گروه DMSO+PTZ برابر ۱۱ و در گروه 2-AG+DMSO+PTZ برابر ۶ می‌باشد. داده‌ها به صورت Mean \pm SEM ارائه شده‌اند.

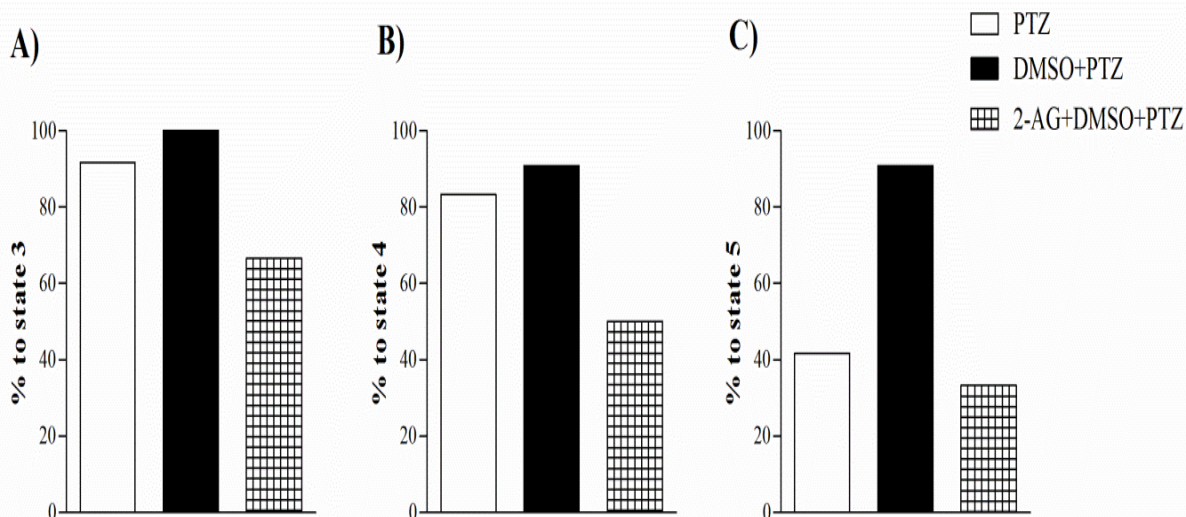
- تزریق 2-AG قبل از تزریق PTZ درصد مرگ ناشی از تشنج تونیک - کلونیک را کاهش داد.

همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد میزان مرگ در گروه (DMSO+PTZ) نسبت به گروه (2-AG+DMSO+PTZ) کاهش یافته است (شکل ۴). تعداد نمونه‌ها در گروه PTZ برابر ۱۲ در گروه DMSO+PTZ برابر ۱۱ و در گروه 2-AG+DMSO+PTZ برابر ۶ می‌باشد.

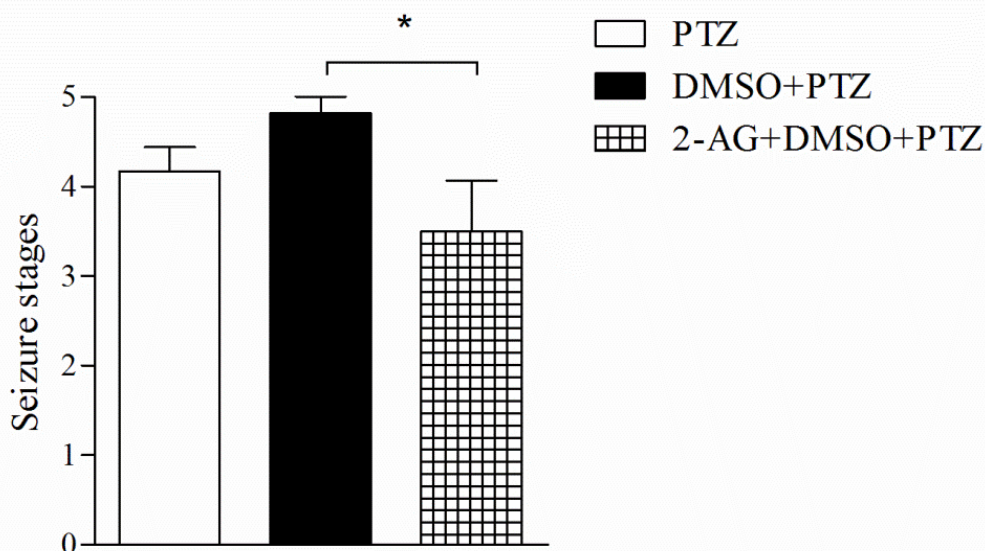
درصد وقوع مرگ پس از تشنج تونیک-کلونیک در هر یک از سه گروه آزمایش به صورت توصیفی محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفت. درصد وقوع مرگ در سه گروه (PTZ)، (DMSO+PTZ) و (2-AG+DMSO+PTZ) به ترتیب (۳۳/۳ درصد)، (۹۰/۹ درصد) و (۱۶/۶ درصد) بود.



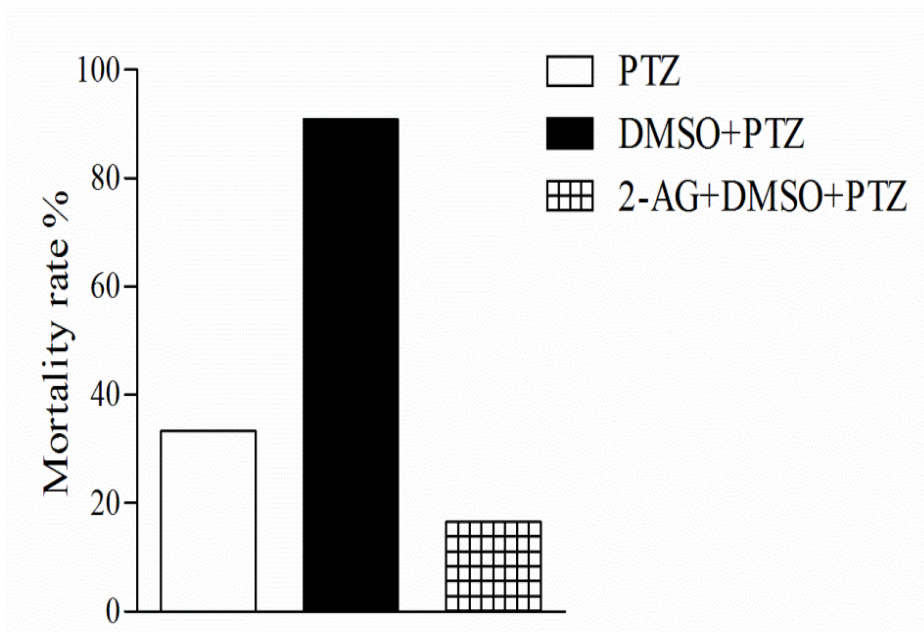
شکل ۱: تزریق 2-AG داخل صفاقی ۱۵ دقیقه قبل از تزریق PTZ تاثیر معناداری بر تاخیر بروز مراحل تشنجی و مدت زمان هر مرحله نداشت. مقایسه مدت زمان رسیدن به مراحل تشنج (Seizure Stage Latency: S1L-S5L) و طول مدت هر مرحله (Seizure Stage Duration: S3D-S5D) بین گروه‌ها از طریق آزمون آماری One-way ANOVA و آزمون تکمیلی Bonferroni نشان می‌دهد که زمان رسیدن به مراحل ۱ و ۲ تشنج در گروه (DMSO+PTZ) نسبت به گروه (PTZ) به طور معناداری افزایش یافته است ($P < 0.001$ برای S1L و $P < 0.05$ برای S2L) در حالیکه در زمان رسیدن به مراحل ۳ تا ۵ و طول دوره این مراحل تغییر معناداری رخ نداده است. تزریق 2-AG در گروه (2-AG+DMSO+PTZ) تاثیر معناداری بر پارامترهای تشنجی در مقایسه با گروه (DMSO+PTZ) نداشته است. داده‌ها به صورت $Mean \pm SEM$ ارائه شده‌اند. n در گروه PTZ برابر ۱۲ در گروه DMSO+PTZ برابر ۱۱ و در گروه 2-AG+DMSO+PTZ برابر ۶ می‌باشد.



شکل ۲: تزریق 2-AG داخل صفاقی ۱۵ دقیقه قبل از تزریق PTZ سبب کاهش درصد وقوع مراحل ۳، ۴ و ۵ تشنج شد. درصد وقوع هر یک از مراحل تشنج در سه گروه آزمایش نشان داده شده است. درصد وقوع مراحل ۳، ۴ و ۵ تشنج در گروه (2-AG+DMSO+PTZ) نسبت به گروه (DMSO+PTZ) کاهش یافته است. n در گروه PTZ برابر ۱۲ در گروه DMSO+PTZ برابر ۱۱ و در گروه 2-AG+DMSO+PTZ برابر ۶ می باشد.



شکل ۳: تزریق 2-AG داخل صفاقی ۱۵ دقیقه قبل از تزریق PTZ سبب کاهش معنادار در بروز مراحل تشنج شد. مقایسه میانگین مرحله تشنجی سه گروه با هم از طریق آزمون آماری Kruskal-Wallis و آزمون تکمیلی Dunn نشان می دهد که میانگین مرحله تشنجی بروز یافته در گروه (2-AG+DMSO+PTZ) به طور معناداری کمتر از گروه (DMSO+PTZ) است ($P < 0.05$). در حالی که بین گروه (DMSO+PTZ) و (PTZ) تفاوت معناداری وجود ندارد. داده ها به صورت $Mean \pm SEM$ ارائه شده اند. n در گروه PTZ برابر ۱۲ در گروه DMSO+PTZ برابر ۱۱ و در گروه 2-AG+DMSO+PTZ برابر ۶ می باشد.



شکل ۴: تزریق 2-AG داخل صفاقی ۱۵ دقیقه قبل از تزریق PTZ سبب کاهش درصد مرگ بعد از حمله تونیک-کلونیک شد. درصد وقوع مرگ در سه گروه آزمایش نشان داده شده است. درصد وقوع مرگ در گروه (2-AG+DMSO+PTZ) نسبت به گروه (DMSO+PTZ) کاهش یافته است. n در گروه PTZ برابر ۱۲ در گروه DMSO+PTZ برابر ۱۱ و در گروه 2-AG+DMSO+PTZ برابر ۶ می‌باشد.

بحث

مطالعه‌ی ما نشان داد تزریق سیستمیک 2-AG قادر است شاخص‌های تشنج تونیک-کلونیک را به صورت قابل توجه و معناداری کاهش دهد. درصد وقوع هر یک از مراحل تشنج تونیک-کلونیک، درصد مرگ ناشی از تشنج و شدت مرحله تشنجی بروز یافته در اثر تزریق 2-AG به طور معناداری کاهش یافت. نتایج ما نشان داد تزریق داخل صفاقی 2-AG قبل از تزریق PTZ تاثیر معناداری بر تاخیر زمان بروز هر یک از مراحل تشنج القا شده با PTZ و همچنین طول دوره‌ی این مراحل ندارد. با توجه به اینکه طی روند گسترش تشنج‌های در مغز مکانیسم‌های مختلفی که در گسترش تشنج به نواحی مغزی دخالت دارند. مشخص شده است که فعالیت‌های تشنجی از کانون‌های خاصی در مغز شروع می‌شود و بسته به عملکرد مدارهای نورونی و توانایی در حفظ تعادل تحریک - مهار، این تشنج‌های می‌توانند از وضعیت کانونی (Focal) به

وضعیت عمومی (Generalize) در آیند که در این وضعیت فعالیت‌های تشنجی در یک یا دو نیمکره گسترش می‌یابد که طی این روند مراحل رفتاری تشنج رخ می‌دهند (۲۲ و ۲۱ و ۵). بررسی پیرامون داروهای ضد تشنج نشان می‌دهد برخی از داروها که از طریق کاهش تحریک پذیری مدارهای نورونی عمل می‌کنند، بر زمان تاخیر و طول دوره مراحل تشنج موثر هستند (۲۳ و ۳) بنابراین ممکن است 2-AG از طریق مسیریایی به جز تغییر تحریک پذیری نورونی اثرات ضد تشنجی خود را اعمال می‌کند که باید در مطالعات بعدی مد نظر قرار گیرد. با این حال تحلیل یافته‌ها نشان داد درصد بروز مراحل ۳، ۴ و ۵ تشنج در گروه دریافت کننده‌ی 2-AG به صورت چشمگیری کاهش می‌یابد. در بین مراحل تشنجی این سه مرحله مراحل گسترش تشنج از کانون‌های تشنج‌زا به سراسر مغز و به عبارتی سراسری شدن تشنج‌های می‌باشد (۱۹ و ۲). بنابراین کاهش درصد وقوع این

مراحل حائز اهمیت می‌باشد. بررسی‌های سال‌های اخیر موثر بودن کانابینوئیدها گیاهی را در مهار وقوع تشنج‌های صرعی در مدل‌های آزمایشگاهی نشان داده است (۷-۹). در یک مطالعه کاربرد سیستمیک یک کانابینوئید گیاهی به نام کانابیدیول در دو مدل تشنج القا شده با پیلوکارپین و مدل تشنج ناشی از پنی سیلین توانست در صد وقوع مراحل ۴ و ۵ تشنج تونیک-کلونیک را در هر دو مدل، به صورت معناداری کاهش دهد (۲۴). علی رغم تفاوت در روش ایجاد تشنج در مطالعه مذکور و مطالعه‌ی ما، کاهش درصد وقوع مراحل حمله‌های تونیک-کلونیک در دو مطالعه هم راستا می‌باشد. هرچند در مطالعه‌ی مذکور تاخیر زمانی رسیدن به مراحل و دوره‌ی زمانی هر مرحله گزارش نشده است، اما کاهش درصد مرگ پس از تشنج در مدل تشنج ناشی از پنی سیلین با کاهش درصد مرگ در مطالعه‌ی ما، تایید کننده قابلیت سیستم اندوکانابینوئیدی مغز برای مهار حملات تشنجی می‌باشد. در مطالعه‌ی دیگری (۱۱) بر روی مدل تشنج ناشی از PTZ، ترکیبات فیتوکانابینوئیدی که در آزمایشگاه تولید شده بود، توانست شدت بروز مراحل تشنجی و میزان مرگ پس از تشنج را به طور معناداری کاهش دهد. به علاوه مشخص شد این اثرات مستقل از گیرنده CB1 رخ می‌دهد. نتایج ما نیز کاهش شدت مراحل تشنج در پی تزریق 2-AG را نشان داد. در همین راستا یک بررسی دیگر در محیط برش‌های زنده هیپوکمپ، مدل فعالیت‌های صرعی در مجموعه‌های نورونی با استفاده از حذف یون منیزیم ایجاد شد و سپس اثر کانابیدیول مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد کانابیدیول فعالیت‌های صرعی نورون‌ها را به صورت مستقل از گیرنده‌ی CB1 کاهش می‌دهد (۲۴).

علی رغم اینکه تاکنون مطالعه‌ای در خصوص استفاده مستقیم از ترکیبات اندوکانابینوئیدی انجام نشده بود، در مطالعه‌ی ما از 2-AG به عنوان ترکیب اندوکانابینوئیدی استفاده شده که در حالت طبیعی طی مسیرهای متابولیک در نورون‌ها ساخته و

تجزیه می‌شود و به‌عنوان یک تعدیل گر مهم در سیستم عصبی نقش فیزیولوژیک ایفا می‌کند (۱۳ و ۱۴). هر چند استفاده از یک ترکیب درونزاد در مقایسه با یک کانابینوئید گیاهی می‌تواند مزیت‌هایی داشته باشد با این وجود به دلیل اثرات روانگردان گیرنده‌های CB1 (۹ و ۱۰)، مستقل بودن اثرات ضد تشنجی 2-AG (در دوزهای موثر) از گیرنده‌های CB1 در مطالعه‌ی ما بررسی نشده است که لازم است مد نظر قرار گیرد. با این حال طی مدت حدود ۴۵ دقیقه‌ای که حیوانات بعد از تزریق 2-AG به صورت رفتاری تحت نظر بودند تغییر محسوسی در رفتارهای جستجوگرانه و میزان تحرک آنها در جعبه پلکسی گلاس رخ نداد.

در دو بررسی اخیر از مهارگرهای فارماکولوژیک مسیر تجزیه ترکیبات اندوکانابینوئیدی، با هدف افزایش سطح اندوکانابینوئیدهای درونزاد مغز در مدل‌های حیوانی صرع استفاده شد (۲۵ و ۲۳). در یکی از مطالعات تشنج‌های مکرر و مزمن مشابه بیماری صرع با تزریق پیلوکارپین ایجاد شد و سپس با استفاده از مهارگر تجزیه‌ی 2-AG سطح این ماده در مغز بالا برده شد. در این مطالعه شاخص‌های تشنج از جمله شدت تشنج‌های و طول دوره‌های تشنج افزایش معناداری داشت (۲۵). یافته‌های این گزارش متناقض با نتایج مطالعه‌ی ما می‌باشد. تفاوت در مدل حیوانی استفاده شده و استراتژی تجویز آنتاگونیست می‌تواند دلیل این تناقض باشد. در مطالعه‌ی مذکور (۲۵) از پیلوکارپین (آگونیست موسکارینی) برای ایجاد مدل صرع و تشنج استفاده شد که از نظر مکانیسم اثر بر CNS با PTZ (آنتاگونیست $GABA_A$) متفاوت می‌باشد. آنها همچنین مهارگر تجزیه 2-AG را برای یک هفته به صورت روزانه تجویز کردند در حالی که در بررسی ما به صورت یک بار قبل از تزریق PTZ تجویز شد. بنابراین تناقض یافته‌ها ممکن است ناشی از اثر متفاوت دارد در تزریق حاد و مزمن آن باشد که در مطالعات بعدی باید مورد توجه قرار گیرد. در مطالعه‌ی دیگر (۲۳)، آنزیم سنتز کننده 2-AG

است در مطالعات بعدی مورد توجه قرار گیرد، عدم مقایسه ی اثرات ضد تشنجی 2-AG با یک داروی ضد تشنج معمول در قالب گروه کنترل مثبت بود. همچنین پیشنهاد می شود این بررسی در مدل های دیگر صرع و تشنج نظیر الکتروشوک، کیندلینگ و مدل های مقاوم به دارو مورد بررسی قرار گیرد. به دلیل محدودیت های مطالعه بررسی دوزهای بالاتر و پایین تر 2-AG مقدور نشد که انجام آن در مطالعات بعدی لازم به نظر می رسد.

نتیجه گیری

به نظر می رسد 2-AG به عنوان یک لیگاند مهم در سیستم اندوکابینوئیدی می تواند احتمال بروز مراحل تشنج را کاهش دهد و همچنین سبب کاهش مرگ ناشی از تشنج حاد القا شده با PTZ شود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر، مستخرج از طرح تحقیقاتی (شماره ۲۳۹۰) مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک و دارای کد اخلاق (IR.ARAKMU.REC.1394.225) از کمیته ی اخلاق دانشگاه می باشد. نویسندگان این مقاله از داوران محترم به خاطر بررسی دقیق مقاله ی اولیه و نظرات ارزشمندی که سبب رفع ایرادات مقاله و راهگشای تحقیقات بعدی شد، قدردانی می کنند.

References

- 1- Banerjee PN, Filippi D, Hauser WA. The descriptive epidemiology of epilepsy—a review. *Epilepsy Research*. 2009; 85: 31-45.
- 2- Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the

در مدل تشنج با PTZ و در موش های ژنی مستعد برای تشنج به صورت فارماکولوژیک مهار شد که سبب بهبود شدت حمله های تشنجی و پارامترهای الکتروفیزیولوژیک شد. این گزارش با یافته های ما همخوانی دارد. همچنین بررسی های مرتبط نشان داده اند که تزریق مستقیم دی-پالمیتوئیل اتانول آمین به عنوان یک کاندید اندوکابینوئیدی اثرات مثبت در مدل های حیوانی صرع و تشنج دارد (۲۷ و ۲۶) که هم راستا با نتایج ما موید قابلیت ضد تشنجی اندوکابینوئیدها می باشند.

یافته ی جالب دیگر در مطالعه ی ما تاثیر حلال DMSO بر شاخص های تشنجی بود. برخی گزارش های اخیر نشان داده اند که DMSO به صورت وابسته به دوز می تواند پارامترهای الکتروفیزیولوژی را در مدل های حیوانی صرع دستخوش تغییر کند. این گزارش ها بیانگر کاهش تحریک پذیری الکتریکی و شاخص ثبت شده هستند و به همین دلیل اثرات ضدصرعی برای آن پیشنهاد شده است (۲۸ و ۲۹).

براساس نتایج ما DMSO بر شاخص های رفتاری تشنج ناشی از PTZ موثر است، هرچند تاخیر رسیدن به مرحله ی ۱ و ۲ را افزایش داد اما درصد وقوع مرحله ۵ تشنج و درصد مرگ ناشی از حمله تونیک-کلونیک را افزایش داد. دلیل این پدیده می تواند به مکانیسم های عصبی دخیل در بروز مراحل مختلف تشنج برگردد. اما روشن شدن مکانیسم های اثر DMSO بر نورون ها و مدارهای عصبی در بررسی های بعدی لازم است مورد توجه قرار گیرد. از جمله کمبودهای بررسی ما که لازم

discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*. 2011; 20: 359-68.

3- Fattore C, Perucca E. Novel medications for epilepsy. *Drugs*. 2011; 71: 2151-78.

4- Schmidt D, Schachter SC. Drug treatment of epilepsy in adults. *BMJ*. 2014; 348: 254.

- 5- Espinosa-Jovel CA, Sobrino-Mejia FE. Drug resistant epilepsy. Clinical and neurobiological concepts. *Rev Neurol*. 2015; 61: 159-66.
- 6- Jobst BC, Cascino GD. Resective epilepsy surgery for drug-resistant focal epilepsy: a review. *JAMA*. 2015; 313: 285-93.
- 7- Cilio MR, Thiele EA, Devinsky O. The case for assessing cannabidiol in epilepsy. *Epilepsia*. 2014; 55: 787-90.
- 8- Maa E, Figi P. The case for medical marijuana in epilepsy. *Epilepsia*. 2014; 55: 783-6.
- 9- dos Santos RG, Hallak JE, Leite JP, Zuardi AW, Crippa JA. Phytocannabinoids and epilepsy. *J Clin Pharm Ther*. 2015; 40: 135-43.
- 10- Hill AJ, Williams CM, Whalley BJ, Stephens GJ. Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacol Ther*. 2012; 133: 79-97.
- 11- Hill TD, Cascio MG, Romano B, et al. Cannabidiol-rich cannabis extracts are anticonvulsant in mouse and rat via a CB1 receptor-independent mechanism. *Br J Pharmacol*. 2013; 170: 679-92.
- 12- Basavarajappa BS. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Letters*. 2007; 14: 237-46.
- 13- Savinainen J, Saario S, Laitinen J. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta physiologica*. 2012; 204: 267-76.
- 14- Sugiura T, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2000; 108: 89-106.
- 15- Lutz B. On-demand activation of the endocannabinoid system in the control of neuronal excitability and epileptiform seizures. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68: 1691-8.
- 16- Ganjkhani M, Moradi K, Ramezani S, Mirzamohammadi F, Fallah A. Effects of dark rearing on clonic seizure threshold and pentylentetrazol induced epileptiform activity in mice. *J Zanzan Univ Med Sci*. 2010; 18: 22-30.
- 17- Saeidi S, Azhdari Zarmehri H, Erami E, Alimohammadi B. The effect of hydroalcoholic extract of *Heracleum Persicum* on pentylentetrazol induced seizure in mice. *J Zanzan Univ Med Sci*. [Applicable]. 2013; 21: 45-55.
- 18- Sarkisian MR. Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders. *Epilepsy Behav*. 2001; 2: 201-16.
- 19- Veliskova J. Behavioral characterization of seizures in rats. Models of seizures and epilepsy Elsevier Academic Press, Burlington. 2006: 601-11.
- 20- Zhang Z, Wang W, Zhong P, et al. Blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces antidepressant-like effects and enhances adult hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. *Hippocampus*. 2015; 25: 16-26.
- 21- Hewapathirane DS, Dunfield D, Yen W, Chen S, Haas K. In vivo imaging of seizure activity in a

- novel developmental seizure model. *Exp Neurol.* 2008; 211: 480-8.
- 22- Sloviter RS, Bumanglag AV. Defining epileptogenesis and identifying antiepileptogenic targets in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. *Neuropharmacol.* 2013; 69: 3-15.
- 23- Naydenov AV, Horne EA, Cheah CS, et al. ABHD6 blockade exerts antiepileptic activity in PTZ-induced seizures and in spontaneous seizures in R6/2 mice. *Neuron.* 2014; 83: 361-71.
- 24- Jones NA, Glyn SE, Akiyama S, et al. Cannabidiol exerts anti-convulsant effects in animal models of temporal lobe and partial seizures. *Seizure.* 2012; 21: 344-52.
- 25- Ma L, Wang L, Yang F, et al. Disease-modifying effects of RHC80267 and JZL184 in a pilocarpine mouse model of temporal lobe epilepsy. *CNS Neurosci Ther.* 2014; 20: 905-15.
- 26- Citraro R, Russo E, Scicchitano F, et al. Antiepileptic action of N-palmitoylethanolamine through CB1 and PPAR-alpha receptor activation in a genetic model of absence epilepsy. *Neuropharmacol.* 2013; 69: 115-26.
- 27- Sheerin AH, Zhang X, Saucier DM, Corcoran ME. Selective antiepileptic effects of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid. *Epilepsia.* 2004; 45: 1184-8.
- 28- Kovacs Z, Czurko A, Kekesi KA, Juhasz G. The effect of intraperitoneally administered dimethyl sulfoxide on absence-like epileptic activity of freely moving WAG/Rij rats. *J Neuro Sci Method.* 2011; 197: 133-6.
- 29- Carletti F, Ferraro G, Rizzo V, Cannizzaro C, Sardo P. Antiepileptic effect of dimethyl sulfoxide in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett.* 2013; 546: 31-5.

The Effect of 2-Arachidonyl Glycerol (2-AG) as an Endocannabinoid on Tonic- Clonic Seizures Induced by Pentylenetetrazol (PTZ)

Zareie P¹, Sadegh M¹, Palizvan MR¹

¹Dept. of Physiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Corresponding Author: Sadegh M, Dept. of Physiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

E-mail: m.sadegh@arakmu.ac.ir

Received: 28 Apr 2016 **Accepted:** 23 Aug 2016

Background and Objective: In spite of various and effective anti seizure drugs available, 30% of epileptic patients are not adequately treated with current medications. Based on the effectiveness of phytocannabinoids on epileptic and seizure models, in this study the effects of 2-achidonoylglycerol (2-AG) injection, as an important endocannabinoid, on tonic-clonic seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) was examined.

Materials and Methods: The study was performed on male wistar rats (180-200 g). Tonic-clonic seizures were induced through a single intra-peritoneal injection of PTZ (80 mg/Kg) and then seizure behavior was monitored for 30 minutes. The intra-peritoneal injection of 2-AG (1 mg/Kg) in dimethyl sulfoxide (DMSO) was performed 15 minutes before the PTZ injection. In the sham group an equivalent volume of DMSO was injected 15 minutes before PTZ. Data on the delay of seizure stage occurrence, duration of the stages, number of occurrences for each stage and mortality rate due to tonic-clonic seizures were collected for analysis.

Results: PTZ injection in association with DMSO significantly increased the delay for seizure stages 1 and 2, in comparison with just a PTZ injection ($P<0.05$), but had no significant effect on the duration and delay of seizure stages 3-5. Intra-peritoneal injection of 2-AG in association with DMSO before the injection of PTZ had no significant effect on the delay and duration of seizures but reduced the occurrence of each seizure stage and also reduced mortality due to tonic-clonic seizures in comparison with PTZ injection associated with DMSO. The mean seizure stage was also significantly decreased ($P<0.05$).

Conclusion: It seems 2-AG injection could be effective in reducing seizure parameters in seizures induced by PTZ.

Keywords: Cannabinoid, Seizure, DMSO, Pentylenetetrazol