

Time dependent hippocampal glutamate and GABA change following Pentylenetetrazol induced convulsions in rat

Goudarzi E¹, Elahdadi Salmani M^{1*}, Lashkarbolouki T1, Goudarzi I¹

1- Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, Iran

Received: 15 Jul 2014, Accepted: 17 Sep 2014

Abstract

Background: Seizure is an abnormal electrical activity probably due to an imbalance between excitation and inhibition in the brain. Pentylenetetrazol (PTZ) is a chemical convulsive agent abundantly used in laboratory animals. PTZ induces a change in glutamate and GABA in the brain which this study investigates the persistence of this change.

Materials and Methods: In this experimental study, 18 male Wistar rats divided into 3 groups. Three i.v doses of PTZ; 20, 25 and 30 mg/ml were used to determine the effective PTZ dose. Convulsive behaviors were monitored as tonic clonic and myoclonic twitches. Hippocampal glutamate and GABA contents were measured using a biochemical method.

Results: Dose of 20 was resulted in long latency to and short lasting TC convulsions with a high volume of injected PTZ solution. On the other hand, dose of 25 and 30 led to short latency and long lasting convulsions with low volume of injecting solution. However there was high rate of mortality (100%) in dose of 30 mg/ml. Hippocampal glutamate content was decreased in zero and 20 min groups while GABA content was decreased only in 20 min group.

Conclusion: It is concluded that dose of 25 is the appropriate i.v dose to induce TC convulsions in rats which decreases glutamate and GABA while increases the ratio of glutamate to GABA. Therefore, alteration of glutamate and GABA may be the basis for subsequent seizure induced changes.

Keywords: GABA, Glutamate, Pentylenetetrazol, Seizure, Time

*Corresponding Author:

Address: Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, IRAN
Email: elahdadi@du.ac.ir

تغییر وابسته به زمان در محتوی گلوتامات و گابای هیپوکامپی به دنبال تشنج ناشی از انفوزیون وریدی پنتیلین تترازول در موش صحرایی نر

الهام گودرزی^۱، محمود اله‌دادی سلمانی^{۱*}، تقی لشکرلوکی^۱، ایران گودرزی^۱

۱- دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: تشنج یک فعالیت الکتریکی نابجا و ناهماهنگ بین تحریک و مهار در مغز است. پنتیلین تترازول رایج‌ترین ماده تشنج‌زا است که به شکل وسیعی برای ایجاد فعالیت صرعی در حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اثر این ماده تغییر تعادل گلوتامات و گابا در مغز است. این تحقیق برای تعیین مدت ماندگاری این تغییر در هیپوکامپ موش صحرایی صورت پذیرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی تعداد ۱۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در سه گروه آزمایشی قرار گرفتند. غلظت ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پنتیلین تترازول به صورت وریدی جهت تعیین غلظت موثر تزریق شد. رفتار تشنجی به صورت تشنج تونیک کلونیک ثبت گردید. سپس میزان گلوتامات و گابا در هیپوکامپ به روش بیوشیمیایی در دو زمان صفر و ۲۰ دقیقه بعد از قربانی کردن حیوان بررسی گردید.

یافته‌ها: زمان نهفته در گروه غلظت ۲۰ میلی‌گرم افزایش و مدت تشنج تونیک-کلونیک کاهش و حجم دریافتی محلول پنتیلین تترازول افزایش یافت. از طرفی، زمان نهفته برای غلظت‌های ۲۵ و ۳۰ میلی‌گرم بالاتر از غلظت ۲۰ میلی‌گرم گردید و مدت تشنج تونیک کلونیک افزایش داشت، در حالی که حجم محلول دریافتی کاهش یافت. میزان مرگ و میر در گروه ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تا حد ۱۰۰ درصد افزایش داشت. میزان گلوتامات هیپوکامپی در هر دو زمان صفر و ۲۰ دقیقه کاهش یافت در حالی که میزان گابا فقط ۲۰ دقیقه بعد کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: در غلظت مناسب ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، نسبت گلوتامات به گابا با گذشت زمان افزایش بیشتری داشته است. بنابراین نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌کند که تغییرات گلوتامات و گابا احتمالاً پایه تغییرات بعدی در بافت تشنجی می‌باشد.

واژگان کلیدی: پنتیلین تترازول، تشنج، زمان، گلوتامات، گابا

*نویسنده مسئول: دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی

Email: elahdadi@du.ac.ir

مقدمه

تشنج حاد کاهش می‌یابد که البته پس از پایان تشنج به حالت عادی بازمی‌گردد (۱۱). در عین حال، هنوز مشخص نشده است که تغییر گلو تامات و گابا تا چه محدوده زمانی باقی می‌ماند. البته در مدل‌های صرعی مزمن میزان گلو تامات افزایش و گابا نیز کاهش بیشتر و مداوم تری می‌یابند (۱۰). در مطالعه اثر تشنج بر میزان گلو تامات و گابا در مناطق مختلف مغز خرگوش مشخص شده است که هر دو نوروترانسمیتر در ناحیه هیپوکامپ کاهش معنی‌داری داشته است (۱۲). PTZ قابلیت تغییر میزان تحریک و یا مهار را دارد، بنابراین با تغییر میزان گلو تامات و یا گابا می‌تواند باعث تغییرات در حتی سطح بافتی گردیده و به استقرار صرع منجر شود. مشخص نشده است که میزان گلو تامات و گابا در اثر PTZ در مدل وریدی چگونه تغییر می‌یابد و میزان پایداری آنها چه مدت خواهد بود. بنابراین، هدف مطالعه حاضر، تعیین میزان پایداری تغییرات احتمالی گلو تامات و گابا در مدل تشنج وریدی PTZ در موش صحرایی نر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوان‌های مورد استفاده در این مطالعه تجربی، هجده سر موش صحرایی نر سفید نژاد ویستار با محدوده وزن ۱۸۰-۲۰۰ گرم بودند. موش‌ها در حیوان‌خانه دانشکده زیست‌شناسی دامغان، تحت چرخه نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و رطوبت ۴۰-۳۰ درصد و با درجه حرارت 22 ± 2 نگره‌داری شدند (حداکثر ۵ موش صحرایی داخل هر قفس). موش‌ها آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. تمامی آزمایش‌ها با رعایت قوانین اخلاقی برخورد با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه دامغان انجام گردید.

PTZ مورد استفاده از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید و محلول آن در سه غلظت ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به صورت روزانه در زمان تزریق مورد استفاده قرار گرفت. از نرمال سالین ۰/۹ درصد نیز به عنوان حلال PTZ استفاده شد.

بیماری صرع یک اختلال عصبی مزمن رایج می‌باشد که در اثر تکرار تشنج به صورت خود به خودی به وجود می‌آید. اساس پاتوفیزیولوژی صرع و تشنج، ناهماهنگی بین سیستم تحریک و مهار در یک شبکه نورونی است که باعث آغاز فعالیت الکتریکی غیر طبیعی در مغز می‌شود (۱).

در مدل‌های صرع برون تنی و درون تنی برای ایجاد ناهماهنگی می‌توان از روش‌های متعددی استفاده کرد (۱). پنتیلن تترازول (Pentylentetrazol-PTZ) یکی از مواد تشنج‌زای سیستمیک است که به شکل وسیعی برای ایجاد فعالیت صرعی در حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲، ۳) و به عنوان رایج‌ترین ایجاد کننده حملات تشنجی به روش‌های داخل صفاقی، زیرجلدی و وریدی به کار می‌رود (۴-۶). هر چند تحقیقات نشان داده است که برخی از داروهای مهم ضد صرع فقط در مدل وریدی اثر ضد تشنجی نشان داده‌اند (۷). مکانیزم اصلی ایجاد حملات تشنجی در انواع مدل PTZ، که PTZ توانایی اتصال به گیرنده‌های گابا را دارد، کاهش اثر سیستم گاباژریک است (۴)، هر چند PTZ در مدل وریدی به دلیل ثبات غلظت و سرعت رسیدن به مغز موثرتر عمل می‌کند. اگرچه جایگاه عمل PTZ به طور کامل مشخص نشده است (۸)، اما ممکن است PTZ به عنوان آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$ ، یک بلوک کننده کانال کلریدی دریچه‌دار وابسته به $GABA_A$ و یا حتی به عنوان یک فعال کننده اسیدهای آمینه تحریکی عمل کند (۸).

گلو تامات و گابا به ترتیب دو نوروترانسمیتر مهم تحریکی و مهاری مغز می‌باشند که در پایانه سیناپسی ساخته و در وزیکول‌ها ذخیره می‌شوند. پس از رسیدن پتانسیل عمل، به داخل شکاف سیناپس آزاد می‌شوند. گلو تامات اضافه توسط آستروسیت‌ها جمع‌آوری شده و سپس به صورت گلو تامین به پایانه برمی‌گردد (۹). نشان داده شده که میزان گلو تامات و گلو تامین بلافاصله پس از تشنج به میزان ۷۰-۱۰۰ درصد افزایش می‌یابد (۱۰). میزان گابا نیز در اثر

روش ایجاد تشنج در حیوان ها

مدل تشنج تزریق PTZ داخل وریدی زمان دار، یک مدل استاندارد است که PTZ به طور پیوسته با یک سرعت ثابت، در موش سوری و موش صحرائی به داخل ورید تزریق می شود تا زمانی که تشنج ظاهر شود (۱۳). غلظت آستانه PTZ برای مراحل مختلف تشنج به سرعت تزریق و غلظت PTZ در محلول بستگی دارد (۱۴). مقدار مورد نظر پنتیلین ترازول حل شده در محلول سالین، به صورت داخل وریدی در ورید جانبی دم، به حیوان تزریق شد و بروز تشنج های تونیک - کلونیک مورد بررسی قرار گرفت. تشنج های تونیک شامل کشیدگی و سفتی بدن است که در طی آن بدن حیوان مانند چوب می شود. در حالی که تشنج های کلونیک به صورت تکانها و تشنج های پی در پی ظاهر می شود و سفتی عضلانی وجود ندارد، بلکه عضلات به صورت متناوب منقبض و راحت می شوند.

حیوان های مورد مطالعه در سه گروه شش تایی

عبارت بودند از:

گروه ۱: تزریق PTZ با غلظت ۲۰

گروه ۲: تزریق PTZ با غلظت ۲۵

گروه ۳: تزریق PTZ با غلظت ۳۰

جهت القا تشنج، حیوانات از قفس ها خارج گشته و قبل از تست، هر موش وزن گردید و هنگام تزریق در مقید کننده پلاستیکی قرار گرفت. سوزن دندان پزشکی (۳۰G) توسط لوله پلی اتیلن (No. ۱۵) به سرنگ ۵ میلی لیتر که حاوی محلول PTZ با غلظت مورد نظر باشد، متصل گردید. سوزن در میانه طول دم در ورید جانبی فرو برده و توسط نوار چسب ضد حساسیت محکم شد. سپس حیوان به داخل یک جعبه رفتاری جهت مشاهده رفتار تشنجی منتقل گردید. سرنگ در پمپ تزریق سرنگی قابل تنظیم (آمریکا مدل NO. 210) قرار داده شده و تزریق با سرعت ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه انجام گردید. این سرعت پس از آزمایش سرعت های مختلف، به عنوان سرعت بهینه انتخاب شد. لازم به ذکر است که در طول دوره تزریق حیوانات می توانستند

آزادانه در محفظه شیشه ای از جنس پلاکسی گلاس با طول و عرض و ارتفاع به ترتیب ۴۰×۴۰×۵۰ سانتی متر حرکت کنند. رفتار تشنجی هر حیوان در تمام دوره پس از تزریق مشاهده و به محض شروع اولین نشانه های تشنج دستگاه متوقف شده و مدت زمان بین شروع تزریق و ظهور پرش های میوکلونیک (زمان نهفته ۱) ثبت گردید، سپس مدت زمانی که طول می کشد تا حیوان از این مرحله وارد تشنج تونیک - کلونیک شود (زمان نهفته ۲) و نیز مدت زمانی که حیوان در این مرحله از تشنج قرار داشت، ثبت شد. هم چنین تعداد حیواناتی که پس از تشنج تونیک - کلونیک زنده ماندند مورد بررسی قرار گرفت (۸).

سنجش گلو تامات و گابا:

پس از انتخاب غلظت بهینه، حیوانات این گروه بلافاصله پس از پایان تشنج و یا ۲۰ دقیقه پس از آن قربانی شده و مغز آنان از جمجمه خارج شد. پس از برش طولی - میانی مغز، دو نیمکره از هم جدا گردید و پس از برگرداندن نیمکره راست، هیپوکامپ توسط یک اسپاتولا از عمق قشر گیجگاهی - پس سری با یک مانور از طرف سپتومی به گیجگاهی خارج گردید. هیپوکامپ بعد از جداسازی روی یخ به فریزر منهای ۸۰ درجه سانتی گراد تا زمان سنجش بیوشیمیایی منتقل گردید. هیپوکامپ به صورت دستی در ۱ میلی لیتر محلول سرد شامل ۲۰ میلی مولار بافر Tris-Cl با pH 7.4 و تریتون 0.2% X-100 هموزن گردیده و به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۱۰۰۰ g سانتریفوژ شد. سپس، ۵ میلی لیتر محلول ۱ مولار HClO₄ به آن اضافه گردید و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۳۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. پلیت حاصل در میکروتیوب جهت سنجش پروتئین ذخیره شد. سنجش پروتئین به روش لوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (Biotek - آمریکا) انجام شده و میزان پروتئین بر اساس منحنی استاندارد مشخص گردید. غلظت گلو تامات و گابا هیپوکامپی به روش بیوشیمیایی اندازه گیری گردید (۱۵، ۱۶). سنجش محتوای گابا به روش فلورومتری (اسپکتروفلورومتر Jasco - ژاپن) بر اساس تشکیل محصول فلوروسانس از واکنش بین گابا و

استفاده از آزمون تکمیلی توکی بین غلظت ۲۰ با غلظت ۲۵ برای زمان نهفته ۱ ($p < 0/0005$) و زمان نهفته ۲ ($p < 0/0005$) و با غلظت ۳۰ برای زمان نهفته ۱ ($p < 0/0005$) و زمان نهفته ۲ ($p < 0/0005$) می‌باشد (نمودار ۱). مقایسه آماری بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری برای مدت زمان تشنج تونیک-کلونیک مشخص نکرد ($F=3/192$, $p < 0/07$, $n=18$). میزان مرگ و میر در گروه غلظت ۳۰ میلی‌گرم، ۱۰۰ درصد در مقابل ۱۰ درصد گروه‌های غلظت‌های ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم بود. غلظت‌های مختلف PTZ باعث شدند تا موش‌ها مراحل تشنجی مختلفی را از خود نشان دهند، لذا در نمودار ۱ اثر غلظت‌های مختلف بر شدت تشنج با هم مقایسه شدند و بین گروه‌های آزمایشی تفاوتی معنی‌دار برای پیشرفت مراحل تشنج مشاهده شد.

اندازه‌گیری میزان گلوتامات و گابا

میزان گلوتامات و گابا بلافاصله پس از تشنج و نیز ۲۰ دقیقه پس از تشنج اندازه‌گیری گردید. مقایسه به روش آنووا یک طرفه نشان داد که میزان گلوتامات بلافاصله پس از تشنج نسبت به بافت کنترل کاهش ($p < 0/05$) داشته است و این کاهش حتی پس از گذشت زمان ۲۰ دقیقه از پایان تشنج نیز دوام ($p < 0/05$) داشته است (نمودار ۲). در مقابل، میزان گابا بلافاصله پس از تشنج تغییری نداشته است، در حالی که پس از سپری شدن ۲۰ دقیقه از پایان تشنج میزان گابا نسبت به کنترل کاهش قابل توجهی ($p < 0/01$) داشته است (نمودار ۲). بنابراین، نسبت گلوتامات/گابا از بلافاصله پس از تشنج تا ۲۰ دقیقه بعد افزایش یافته است.

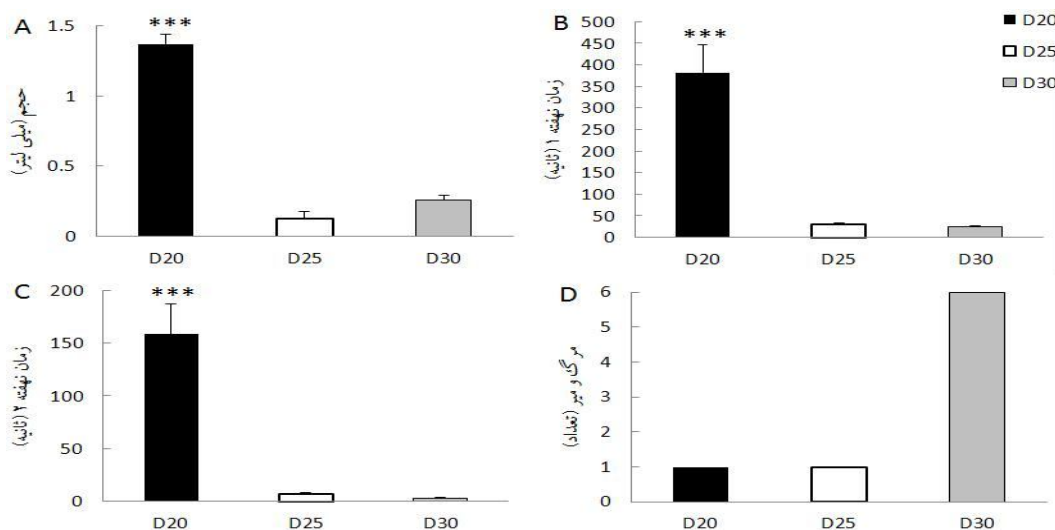
نینهیدرین در pH بازی در حضور گلوتامات انجام گردید (۱۷، ۱۸). سنجش گلوتامات بر اساس فعالیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در بافت تعیین شده است. بافر گلايسين-هیدرازین، ADP و NAD در میزان مشخصی از آب دیونیزه حل گردیدند و سپس آنزیم گلوتامات دهیدروژناز به محلول اضافه گردیده و میزان جذب خوانده شد. نمونه‌ها به صورت دوتایی بوده و نتیجه آنها به صورت یک میانگین برای هر دوتایی ارایه شده است.

مقایسه آماری بین گروه‌های آزمایشی با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و مقایسه بین تک تک گروه‌های آزمایشی با آزمون تکمیلی توکی انجام گرفت. سطح معنی‌داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تعیین غلظت مناسب داروی PTZ جهت تزریق وریدی

مقایسه زمان نهفته ۱، زمان نهفته ۲، حجم تزریقی محلول PTZ و مدت زمان تشنج تونیک-کلونیک در سه گروه غلظت ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم انجام شد. آنالیز آماری به روش آنووا یک طرفه برای حجم تزریق محلول PTZ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها ($n=18$)، توکی اختلاف معنی‌داری بین غلظت ۲۰ و ۲۵ ($p < 0/0005$) و غلظت ۲۰ و ۳۰ ($p < 0/0005$) نشان داد، در حالی که تفاوتی در حجم تزریق برای غلظت ۲۵ و ۳۰ مشاهده نشد ($p < 0/837$). هم‌چنین اختلاف معنی‌داری برای زمان نهفته ۱ ($F=29/220$, $p < 0/0005$, $n=18$) و زمان نهفته ۲ ($F=28/297$, $p < 0/0005$)، مشاهده شد که این اختلاف،



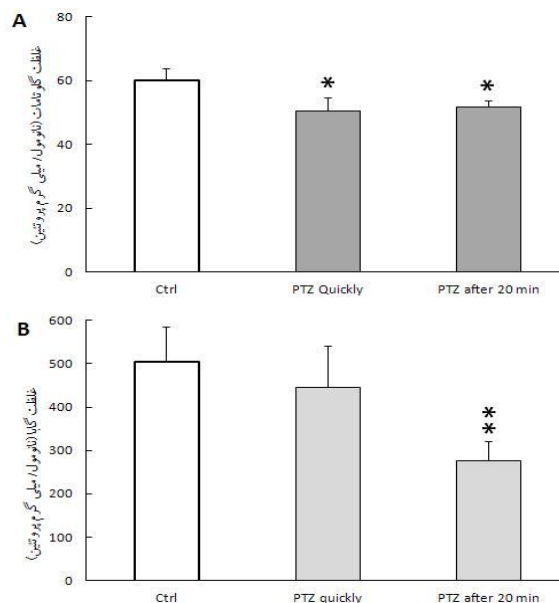
نمودار ۱. اثر غلظت‌های مختلف PTZ بر تشنج تونیک-کلونیک

A؛ نشان دهنده حجم PTZ تزریق شده تا شروع اولین نشانه‌های تشنج در غلظت‌های مورد نظر است که در غلظت‌های ۲۵ و ۳۰ کمترین حجم برای ایجاد تشنجات استفاده شده است. B؛ نشان دهنده مدت زمان شروع اولین نشانه‌های تشنج تا شروع تشنج تونیک-کلونیک (دوره پنهان) در غلظت‌های مورد نظر است و غلظت‌های ۲۵ و ۳۰ کمتر از غلظت ۲۰ بوده است. C؛ زمان شروع تزریق تا شروع اولین نشانه‌های تشنج (زمان نهفته) در غلظت‌های ۲۵ و ۳۰ کمتر از غلظت ۲۰ بوده است. D؛ نشان دهنده تعداد مرگ و میر ناشی از تشنج‌های تونیک-کلونیک در گروه‌های مختلف است که غلظت ۳۰ بیشترین تعداد مرگ را داشته است. $p < 0.001$

بحث

در این مطالعه به بررسی سه غلظت PTZ با هدف تعیین غلظت مناسب تزریق و رسیدی برای ایجاد تشنج تونیک کلونیک و نیز اثر غلظت انتخابی بر تغییرات گلوتامات و گابا هیپوکامپی در دو زمان پس از تشنج پرداختیم. نتایج نشان داد که در غلظت ۲۰ و ۲۵، کمترین حجم تزریق برای القای تشنج استفاده شد. در غلظت ۲۵ و ۳۰ بیشترین شدت و مدت تشنج به وجود آمد و در غلظت ۳۰، بیشترین تعداد مرگ و میر نیز وجود داشت. از طرفی، میزان دو نوروترانسمیتر تحریکی گلوتامات و مهارى گابا نیز بلافاصله و ۲۰ دقیقه پس از تشنج اندازه‌گیری گردید که هر دو کاهش داشتند و این کاهش در مورد گابا بیشتر ولی با تاخیر بود.

به نظر می‌رسد تشنج‌های ناشی از PTZ، توسط بخش‌های وسیعی از سیستم عصبی ایجاد می‌شوند که شامل تشکیلات مشبک، ناحیه دیانسفال و هیپوتالاموس پشتی می‌باشد (۱۳). افزایش سریع و حفظ یک غلظت ثابت درون مغزی دارو در مدل تزریق ویریدی (۱۹)، احتمالاً از جابجایی



نمودار ۲. اثر تشنج پتیلن تترازول بر تغییرات گلوتامات و گابای هیپوکامپی.

A. تغییرات گلوتامات هیپوکامپی بلافاصله پس از اتمام تشنج وجود داشته و ۲۰ دقیقه بعد از اتمام تشنج نیز پایدار مانده است.

B. محتوی گابا هیپوکامپی بلافاصله پس از اتمام تشنج تغییر نکرده است، ولی در ۲۰ دقیقه بعد از اتمام تشنج کاهش داشته است.

$p < 0.05$; $p < 0.01$

کاهش گابا را بستری جهت استقرار صرع مزمن می‌دانند و شروع این کاهش پس تشنجی در مطالعه حاضر در ۲۰ دقیقه بعد تشنج بوده است. کاهش فعالیت آنزیم‌های درگیر در ساخت گابا مانند گلو تامیک اسید دکربوکسیلاز و ترانس آمیناز می‌تواند به عنوان کاندیدهای احتمالی این تغییرات دایمی مطرح گردند (۲۴). بنابراین اگر چه میزان گلو تامات بر خلاف انتظار کاهش مختصر داشته است، اما میزان گابا کاهش چشم‌گیرتری داشته است. این تفاوت در میزان تغییرات دو نوروترانسمیتر، نشان دهنده افزایش نسبت آنها و در نتیجه افزایش تحریک‌پذیری ناشی از تشنج می‌باشد. از طرفی، کاهش هم‌زمان دو نوروترانسمیتر و در واقع غیبت آنها از فضای سیناپسی احتمال دخالت آستروسیت‌ها در جمع‌آوری آنها را مطرح می‌سازد. لذا مطالعات بیشتری بایستی در مورد نقش سلول‌های گلیا در این جمع‌آوری گلو تامات و احتمالاً اختلال در چرخه گلو تامین صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که میزان گلو تامات و گابا پس از تشنج در مدل PTZ وریدی کاهش داشته است. ولی نسبت گلو تامات/ گابا در ۲۰ دقیقه پس از تشنج افزایش داشته است. اندازه‌گیری گلو تامات و گابا در بازه زمانی وسیع‌تر در پروژه‌های آینده می‌تواند کمک بیشتری به کشف مکانیسم‌های درگیر در تشنج زایی بکند.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی انجام شده در دانشگاه دامغان می‌باشد که در وبگاه ایرانداک با کد رهگیری ۲۱۵۱۷۴۳ به ثبت رسیده است. هم‌چنین از دانشگاه دامغان به خاطر حمایت مالی از این طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. David O, Bastin J, Chabardes S, Minotti L, Kahane P. Studying network mechanisms using

مراکز فعال می‌کاهد و یک تشنج یکنواخت ایجاد می‌نماید. نتایج نشان داد که بر اساس حجم تزریق (۱۳)، غلظت‌های ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم کاندیدهای مناسبی جهت تزریق وریدی هستند. ولی از آن جا که این دو غلظت نتوانسته است تشنج تونیک کلونیک را القا نماید، بنابراین غلظت‌های بالاتری نیاز است. زمان نهفته تا شروع تشنج در غلظت‌های ۲۵ و ۳۰ کاهش یافت که به معنی تایید این غلظت‌ها برای کاربرد در مدل تزریق وریدی PTZ است (۷). از طرفی، غلظت ۳۰ مدت زمان تشنج بیشتری نسبت به غلظت ۲۵ ایجاد نکرد و از طرفی به دلیل میزان بالای مرگ و میر حیوانات در غلظت ۳۰، بیانگر مناسب نبودن این غلظت برای مدل وریدی است. بنابراین، تشنج در غلظت ۲۵ به حالت بهینه خود رسیده است که غلظتی پایین‌تر از روش‌های داخل صفاق یا زیرجلدی می‌باشد و تاییدی بر نیاز به غلظت پایین‌تر در روش داخل وریدی PTZ است (۷).

تشنج به دنبال عدم توازن بین فرایندهای تحریکی و مهار مغز اتفاق می‌افتد. گلو تامات مهم‌ترین نوروترانسمیتر تحریکی مغز و گابا نوروترانسمیتر مهار مغز می‌باشد (۲۰). برخی مطالعات نشان داده‌اند که میزان گلو تامات در طی یا بلافاصله پس از تشنج افزایش می‌یابد (۱۱، ۱۲، ۲۱). نتایج مطالعه حاضر البته نشان داد که میزان گلو تامات بلافاصله پس از تشنج کاهش داشته و تا مدت ۲۰ دقیقه پس از اتمام تشنج حفظ شده است. دلیل تفاوت نتیجه با بعضی از مقالات احتمالاً مربوط به مدل تشنجی و روش اندازه‌گیری گلو تامات باشد که در این پروژه استفاده شده است. هر چند ممکن است گلو تامات در چرخه گلو تامات- گلو تامین- گابا مصرف شده باشد و این دلیلی بر کاهش گلو تامات باشد (۱۰). از طرف دیگر، میزان گابا بلافاصله پس از تشنج تغییر نداشته است در حالی که ۲۰ دقیقه متعاقب تشنج کاهش چشم‌گیری نشان داده است. تعدادی از مطالعات کاهش موقت گابا طی تشنج و برگشت به حالت کنترل پس از پایان تشنج را گزارش کرده‌اند (۲۲)، که تایید کننده عدم تغییر گابا در مطالعه حاضر بلافاصله پس از پایان تشنج می‌باشند. اما گروهی از مطالعات نیز

- intracranial stimulation in epileptic patients. *Front Syst Neurosci*. 2010;4:148-9.
2. Ferencz I, Leanza G, Nanobashvili A, Kokaia Z, Kokaia M, Lindvall O. Septal cholinergic neurons suppress seizure development in hippocampal kindling in rats: comparison with noradrenergic neurons. *Neuroscience*. 2001;102(4):819-32.
 3. McNamara JO, Byrne MC, Dasheiff RM, Fitz JG. The kindling model of epilepsy: a review. *Prog Neurobiol*. 1980;15(2):139-59.
 4. Psarropoulou C, Matsokis N, Angelatou F, Kostopoulos G. Pentylentetrazol-induced seizures decrease gamma-aminobutyric acid-mediated recurrent inhibition and enhance adenosine-mediated depression. *Epilepsia*. 1994;35(1):12-9.
 5. Squires RF, Saederup E, Crawley JN, Skolnick P, Paul SM. Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain. *Life Sci*. 1984;35(14):1439-44.
 6. Walsh LA, Li M, Zhao TJ, Chiu TH, Rosenberg HC. Acute pentylentetrazol injection reduces rat GABAA receptor mRNA levels and GABA stimulation of benzodiazepine binding with No effect on benzodiazepine binding site density. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;289(3):1626-33.
 7. Loscher W, Honack D, Fassbender CP, Nolting B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazole seizure models. *Epilepsy Res* 1999;8(3):171-89.
 8. Chen HH, Chan MH. Developmental lead exposure differentially alters the susceptibility to chemoconvulsants in rats. *Toxicology*. 2002;173(3):249-57.
 9. Coulter DA, Eid T. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia*. 2012;60(8):1215-26.
 10. Lothman EW, Bennett JP, Perlin JB. Alterations in neurotransmitter amino acids in hippocampal kindled seizures. *Epilepsy Res*. 1987;1(6):313-20.
 11. Mutani R, Durelli L, Mazzarino M, Valentini C, Monaco F, Fumero S, et al. Longitudinal changes of brain amino acid content occurring before, during and after epileptic activity. *Brain research*. 1977;122(3):513-21.
 12. Nitsch C, Schmude B, Haug P. Alterations in the content of amino acid neurotransmitters before the onset and during the course of methoxypyridoxine-induced seizures in individual rabbit brain regions. *Journal of neurochemistry*. 1983;40(6):1571-80.
 13. Mandhane SN, Aavula K, Rajamannar T. Timed pentylentetrazol infusion test: a comparative analysis with s.c.PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice. *Seizure : the journal of the British Epilepsy Association*. 2007;16(7):636-44.
 14. Boutrel B, Kenny PJ, Specio SE, Martin-Fardon R, Markou A, Koob GF, et al. Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(52):19168-73.
 15. Arsene AL, Arama C, Mitrea N, Cristea AN. experimental assessment of cerebral monoaminergic status in a murine model of behavior. *Fatmacia*. 2009;57:492-99.
 16. Gos T, Hauser R, Krzyzanowski M. Regional distribution of glutamate in the central nervous system of rat terminated by carbon dioxide euthanasia. *Laboratory animals*. 2002;36(2):127-33.
 17. Arsene AL, Mitrea N, Lupuliasa D. Correlations Between the Monoaminergic Status and the Psychoneuroendocrine Typology in a Murine Model – Possible Biomolecular Predictions for an Individualized Pharmacotherapy. In: Barnhill J, editor. *Bipolar Disorder - A Portrait of a Complex Mood Disorder*: InTech. 2012. p. 145-64.
 18. Lowe IP, Robins E, Eyerman GS. The fluorometric measurement of glutamic decarboxylase and its distribution in brain. *Journal of neurochemistry*. 1958;3(1):8-18.
 19. Ramzan IM, Levy G. Kinetics of drug action in disease states. XIV. Effect of infusion rate on pentylentetrazol concentrations in serum, brain and cerebrospinal fluid of rats at onset of convulsions. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985;234(3):624-8.

20. Szyndler J, Piechal A, Blecharz-Klin K, Skorzewska A, Maciejak P, Walkowiak J, et al. Effect of kindled seizures on rat behavior in water Morris maze test and amino acid concentrations in brain structures. *Pharmacological reports : PR.* 2006 ;58(1):75-82.
21. Carlson H, Ronne-Engstrom E, Ungerstedt U, Hillered L. Seizure related elevations of extracellular amino acids in human focal epilepsy. *Neuroscience letters.* 1992;140(1):30-2.
22. Van Gelder NM, Courtois A. Close correlation between changing content of specific amino acids in epileptogenic cortex of cats, and severity of epilepsy. *Brain research.* 1972 25;43(2):477-84.
23. Bakay RA, Harris AB. Neurotransmitter, receptor and biochemical changes in monkey cortical epileptic foci. *Brain research.* 1981;206(2):387-404.
24. Loscher W, Schwark WS. Evidence for impaired GABAergic activity in the substantia nigra of amygdaloid kindled rats. *Brain research.* 1985;339(1):146-50.