

نقش آنزیم اکتو ATPase بر روند کیندلینگ سریع مسیر پرفورنت در موش صحرائی نر

مریم زراعتی^۱، سیدجواد میرنجفی زاده^۲، محمد جوان^۳، سیمین نامور^۴

^۱ استادیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی قم

^۲ استاد گروه فیزیولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

^۳ دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

^۴ استادیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه تربیت معلم تبریز

نشانی نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی، دکتر سیدجواد میرنجفی زاده

E-mail: mirnajaf@modares.ac.ir

وصول: ۸۹/۴/۳۰، اصلاح: ۸۹/۵/۲۷، پذیرش: ۸۹/۶/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: علیرغم تحقیقات گسترده در زمینه صرع، هنوز مکانیسم اصلی ایجاد این اختلال ناشناخته است. با توجه به این که فعالیت آنزیم اکتو ATPase نقش مهمی در تبدیل ATP به AMP داشته و این ماده متعاقباً می‌تواند به آدنوزین تبدیل شود و نیز با در نظر گرفتن نقش آدنوزین به عنوان مهم‌ترین عامل ضد تشنج درون‌زا در مغز، در این تحقیق تأثیر مهار فعالیت اکتو ATPase بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، تعداد ۶ سر موش صحرائی نر در هر گروه بر اساس روش کیندلینگ سریع با تحریکات الکتریکی مسیر پرفورنت (۱۲ بار در روز با فرکانس ۵۰ هرتز و مدت هر پالس ۱ میلی ثانیه) کیندل شدند. در طی روند کیندلینگ، کمیت‌های رفتاری و الکتروفیزیولوژیک تشنج و نیز پتانسیل‌های میدانی ثبت می‌شد. برای بررسی نقش آنزیم اکتو ATPase در گروهی از حیوانات، هر روز پس از پایان تحریکات کیندلینگ FPL 67156 به عنوان مهارگر این آنزیم به صورت داخل بطن مغزی به حیوانات تزریق گردید. حیوانات در گروه کیندل ۶ سر و در سایر گروه‌ها ۴ سر بودند مقایسه آماری کمیت‌های مدت زمان امواج تخلیه متعاقب، شیب fEPSP و دامنه PS در طی روند صرع‌زایی در بین گروه‌های مختلف آزمایشی توسط آزمون تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه از نوع Repeated Measures و آزمون متعاقب Bonferoni صورت گرفت. اختلاف شاخص زوج پالس در هر فاصله زوج پالسی بین گروه‌ها توسط آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون متعاقب Bonferoni صورت گرفت. وقوع مراحل پنج‌گانه تشنجی بین گروه‌های آزمایشی نیز با استفاده از آزمون کروسکال والیس و آزمون متعاقب من‌ویتنی‌یو مقایسه گردید. در محاسبات آماری از نرم افزار Prism نسخه شماره ۵ استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد که مهار آنزیم اکتو ATPase (با تزریق FPL 67156) باعث تغییری در احتمال بروز مراحل مختلف رفتاری تشنج و مدت زمان امواج تخلیه متعاقب در طی روند کیندلینگ نسبت به گروه کیندل نمی‌شود ($P > 0.05$) اما شکل‌پذیری سیناپسی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، به گونه‌ای که دامنه PS را نسبت به گروه کیندل افزایش داده ($P < 0.05$) و میزان کاهش تسهیل زوج پالس را نسبت به گروه کیندل افزایش می‌دهد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم اکتو ATPase در روند شکل‌پذیری در طی روند صرعی شدن در مدل کیندلینگ نقشی مهمی دارد به گونه‌ای که با مهار آن، این روند تسهیل می‌شود. (مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۷/ شماره ۳ / صص ۱۶۸-۱۵۸).

واژه‌های کلیدی: تشنج؛ آنزیم اکتو ATPase؛ شکنج دنداندار؛ کیندلینگ.

مقدمه

صرع بعد از سکتته‌های مغزی شایع‌ترین اختلال عصبی است. شناخت مکانیسم‌های ایجاد صرع از دیرباز یکی از موضوعات مورد تحقیق بشر بوده و علیرغم تحقیقات گسترده در این زمینه، هنوز مکانیسم اصلی ایجاد این اختلال ناشناخته است (۱). با توجه به این‌که بیماران صرعی در ۴۰ درصد موارد به دارو درمانی مقاوم می‌باشند، تحقیقات زیادی برای دستیابی به شیوه‌های جدید درمان صرع در حال بررسی است. شایع‌ترین صرع بالغین، صرع لوب گیجگاهی می‌باشد. در بیشتر بیماران مبتلا به صرع لوب گیجگاهی، ساختارهای لوب گیجگاهی میانی از جمله شکنج دندانه‌دار ناحیه تولیدکننده تشنجات می‌باشد (۲).

شکنج دندانه‌دار از سه لایه سطحی یا ملکولی؛ سلولی یا گرانولی و پلی‌مورفیک که اکسون‌های سلول‌های این لایه به لایه‌های سطحی فرستاده می‌شود، تشکیل شده است. شاخه‌های جانبی سلول‌های گرانولی سلول‌های خزه‌ای را تحریک می‌کنند. اکسون‌های سلول‌های خزه‌ای نیز دندریته‌های سلول‌های گرانولی را در لایه سطحی تحریک می‌کنند. ورودی اصلی شکنج دندانه‌دار مسیر پرفورنت (Perforant path) می‌باشد. فیبرهای این مسیر روی سلول‌های گرانولی در شکنج دندانه‌دار ختم می‌شوند. اینترنورون‌های مهار شکنج دندانه‌دار را نیز به‌طور مستقیم فعال می‌کنند (۳). ورودی قشر انتورینال به شکنج دندانه‌دار و سپس به CA3 و از آنجا به CA1 می‌رود و مجدداً از CA1 به قشر انتورینال باز می‌گردد. این حلقه ارتباطی یکی از مسیرهایی است که می‌تواند باعث ایجاد تشنج و یا تقویت آن گردد (۴). برای بررسی نقش نواحی مختلف مغز از جمله شکنج دندانه‌دار در فرایند تشنج از مدل‌های آزمایشگاهی مختلفی از جمله کیندلینگ استفاده می‌شود.

کیندلینگ مدلی برای ایجاد تشنج می‌باشد و به پدیده‌ای اشاره می‌کند که در طی آن تحریکات مکرر زیر

آستانه‌ای می‌تواند واقعه پیش رونده‌ای را ایجاد کند که در نهایت به صرع عمومی تبدیل می‌شود. کیندلینگ معمولاً به دو روش آهسته و سریع (Rapid) انجام می‌گیرد. در روش آهسته، کانون تشنج روزانه یک بار تحریک داده می‌شود اما در روش سریع تعداد تحریک‌ها در یک روز بیشتر از یک بار است (۵). با ادامه تحریکات الکتریکی در فواصل منظم، به تدریج زمان و دامنه امواج تخلیه متعاقب افزایش می‌یابد و علایم رفتاری تشنج ظاهر می‌گردد (۶).

آدنوزین یک نورومدولاتور قوی است و اثر مهار بر فعالیت نورونی دارد. در مغز سالم به نظر می‌رسد روند ایجاد تشنج به وسیله اثرات تونیک ضد تشنجی آدنوزین مهار می‌شود. میزان آدنوزین پس از تشنج ۶ تا ۳۱ برابر بیشتر می‌شود (۷-۹). مطالعات نشان می‌دهد که در حین تحریکات کیندلینگ نیز مقدار زیادی آدنوزین و مشتقات آن، از جمله ATP، از انتهای پیش سیناپس به فضای سیناپس رها می‌شود (۱۰). آزمایش‌های قبلی نشان داده است که تزریق آگونیست اختصاصی گیرنده A1 به هیپوکمپ باعث مهار حملات صرعی ناشی از کیندلینگ آمیگدال (۱۱) و تزریق همین ماده به آمیگدال باعث مهار تشنج‌های ناشی از کیندلینگ هیپوکمپ می‌شود (۱۲).

با توجه به اثرات ضد تشنجی آدنوزین، مکانیسم‌هایی که باعث افزایش غلظت خارج سلولی آن می‌شوند، می‌توانند در روند صرع زایی در مدل کیندلینگ مؤثر باشند. نتایج تحقیق‌های موجود نشان داده است که کاهش آدنوزین خارج سلولی به‌طور معنادار حملات صرعی را افزایش می‌دهد (۱۳، ۱۴).

در حین تحریکات نورونی، مقدار زیادی ATP و مشتقات آدنوزین از انتهای پیش سیناپسی به فضای سیناپسی رها می‌شود (۱۵). ATP رها شده تحت تأثیر آنزیم اکتو ATPase به AMP و سپس به آدنوزین تبدیل می‌شود. بر این اساس، احتمال داده می‌شود که تغییر فعالیت آنزیم فوق باعث تغییر میزان تولید آدنوزین شده و در نتیجه روند کیندلینگ و ایجاد شکل‌پذیری سیناپسی در

الکترودهای تحریک و ثبات آنقدر تغییر داده می‌شد تا یک fEPSP با حداکثر دامنه (بین ۱۰-۳ میلی ولت) ثبت شود. همچنین با اعمال تحریکات زوج پالس با فاصله بین پالسی ۷۰ میلی ثانیه و مشاهده پدیده تسهیل زوج پالس که مشخصه بارز ناحیه شکنج دنداندار می‌باشد، محل الکتروود از نظر الکتروفیزیولوژیک نیز مورد تأیید قرار گرفت. سپس با سیمان دندانپزشکی الکترودها و پیچ‌ها بر روی جمجمه حیوان ثابت گردیدند. برای بهبود زخم‌ها و دست‌آموز شدن، ۱۰ روز به حیوان استراحت داده شد. الگوهای تحریکی مورد استفاده عبارت بود از:

الف) تحریک برای ایجاد کیندلینگ: برای تحریک حیوان از روش کیندلینگ سریع استفاده شد. در این روش حیوانات با موج مربعی تک فازی با مشخصات فرکانس ۵۰ هرتز، شدت آستانه تولید امواج تخلیه متعاقب، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و به مدت ۳ ثانیه تحریک می‌شدند. این تحریکات به فاصله هر ۵ دقیقه یک بار و ۱۲ بار در روز انجام شده و تا زمان نشان دادن مرحله ۵ تشنج تحریک‌ها اعمال می‌شد (۱۸).

ب) تحریک برای ثبت پتانسیل‌های برانگیخته میدانی: برای ثبت پتانسیل‌های میدانی مسیر پرفورنت تحریک شده و از سلول‌های گرانولی شکنج دنداندار ثبت به عمل آمد. مسیر پرفورنت توسط الکتروودی که در آن کار گذاشته شده است، تحریک شد. الگوی تحریک به صورت پالس‌های مربعی با فرکانس ۱/۰ هرتز، مدت زمان هر پالس ۱۰۰ میکرو ثانیه و شدت جریان پالس آزمون بود (شدتی که در آن ۵۰ درصد پاسخ ماکزیمم به دست آید). پس از ثبت پتانسیل‌های میدانی، شیب fEPSP و دامنه اسپایک‌های تجمعی اندازه‌گیری شد.

ج) تحریک برای اندازه‌گیری شاخص زوج پالس: برای بررسی مدارهای مهاری در ناحیه شکنج دنداندار هیپوکمپ، از تکنیک تحریک زوج پالس استفاده شد. در این آزمایش‌ها زوج پالس‌ها با فواصل بین پالسی معین (۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی ثانیه)

حین آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این تحقیق، با استفاده از مهارگر اختصاصی آنزیم اکتو ATPase نقش این آنزیم در روند ایجاد تشنج به روش کیندلینگ سریع مسیر پرفورنت مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از ۶ سر موش صحرایی نر در هر گروه از نژاد ویستار (Wistar) در محدوده وزنی ۲۸۰-۲۵۰ گرم (خریداری شده از انستیتو پاستور کرج) استفاده شد. پس از آماده کردن وسایل جراحی استریل شده، حیوان توسط سدیم پنتوباریتال (۵۰ mg/kg)، داخل صفاقی (بی‌هوش گردید (۱۶)). موهای سر حیوان تراشیده شده و حیوان در دستگاه استریوتاگس قرار گرفت. بعد از ثابت کردن سر حیوان و شستشوی پوست سر با بتادین، برشی در خط وسط با تیغ جراحی داده ایجاد شد و سطح استخوان جمجمه با الکل تمیز گردید تا نقطه برگما مشخص شود. موقعیت مسیر پرفورنت در نیمکره راست برای قرار دادن الکترودهای تحریکی نسبت برگما (بر حسب میلیمتر: $AP = -6/9$ و $L = 4/1$ و $V = 2/4$ تا $2/7$) به سطح استخوان جمجمه و همچنین شکنج دنداندار برای قرار دادن الکتروود ثابت نسبت به برگما (بر حسب میلیمتر: $AP = -2/8$ ، $L = 1/8$ و $V = 3/2$ تا $3/5$) نسبت به سخت شامه) کانول در بطن جانبی راست (بر حسب میلیمتر: $AP = -0/9$ ، $L = 1/5$ و $V = 3/2$) نسبت به سخت شامه) جهت تزریق دارو تعیین گردید (۱۷).

پس از بستن پیچ‌های لنگرگاه، الکترودهای تک قطبی، الکترودهای تحریک و ثبات به ترتیب در محل‌های تعیین شده قرار گرفتند. با استفاده از استیمولاتور، تحریک الکتریکی با شدت ۵۰ میکروآمپر تا ۱ میلی آمپر از طریق الکتروود تحریک به مسیر پرفورنت اعمال شد. در صورت قرار داشتن الکترودها در محل مناسب، به دنبال اعمال تحریک با یک تک پالس، EPSP تجمعی (Population EPSP) ثبت گردید. در غیر این صورت، موقعیت

با فرکانس ۰/۱ هرتز به مسیر پرفورنت اعمال گردید. دامنه اسپایک جمعی حاصل از هر یک از زوج پالس محاسبه و بر اساس آن شاخص زوج پالس بر اساس نسبت دامنه اسپایک جمعی دوم به اسپایک جمعی اول محاسبه شد.

پس از اعمال تحریکات کیندلینگ، امواج الکتریکی مغزی توسط الکتروود ثبت به آمپلی فایر منتقل و پس از تقویت و فیلتر شدن به نرم افزار ویژه ای در کامپیوتر منتقل شدند. توسط برنامه کامپیوتری، کمیت های تشنجی اندازه گیری شدند. این کمیت ها عبارت بودند از:

۱- مدت زمان امواج تخلیه متعاقب روزانه (daily afterdischarge duration; dADD) که عبارت است از مجموع مدت زمان تخلیه های متعاقب پس از ۱۲ تحریک کیندلینگ روزانه؛

۲- بالاترین مرحله تشنج که در هر روز در حیوان بروز می کرد.

در هر گروه، شیب پتانسیل های میدانی پس سیناپسی تحریکی (fEPSP) و دامنه اسپایک های جمعی (Population Spike; PS) و شاخص زوج پالس (Paired Pulse Index; PPI) نیز محاسبه شد.

هر روز پس از پایان تحریکات کیندلینگ، تزریق دارو توسط پمپ میکرواینجکشن و سرنگ هامیلتون و با سرعت $1 \mu\text{l}/2 \text{min}$ از طریق کانول به بطن طرفی مغز حیوانات صورت گرفت. قبل از تزریق دارو یا حلال آن از میکروفیلتر ($0.2 \mu\text{m}$) عبور داده شد تا استریل شود.

داروی مورد استفاده FPL 67156 (مهارگر اکتو ATPase) بود که از شرکت سیگما خریداری شد. این دارو در مایع مغزی- نخاعی مصنوعی (ACSF) حل شد. در گروه های مختلف در روز اول آزمایش، شدت جریان مورد نیاز برای به دست آوردن ۵۰ درصد پاسخ حداکثر (شدت آزمون) محاسبه گردید. برای این منظور از شدت های پایین جریان الکتریکی تا شدت های بالا (۵۰ میکرو آمپر تا یک میلی آمپر) برای تحریک مسیر پرفورنت استفاده شد و به دنبال هر تحریک شیب fEPSP محاسبه گردید. سپس به مدت

بیست دقیقه پتانسیل های میدانی و تحریکات زوج پالس در ناحیه شکنج دنداندار ثبت شد. پس از آن تحریکات کیندلینگ به حیوان اعمال گردید. گروه های مورد استفاده در این آزمایش عبارت بود از:

۱) **گروه کنترل:** در این گروه از حیوانات به مدت ۶ روز (میانگین مدت زمان لازم برای رسیدن به مرحله ۵ در حیوانات گروه کیندل) پتانسیل های میدانی از شکنج دنداندار مسیر پرفورنت با تک پالس و زوج پالس ثبت شد تا اثر تحریک های مکرر تک پالسی و زوج پالس بر پتانسیل های پس سیناپسی بررسی گردد.

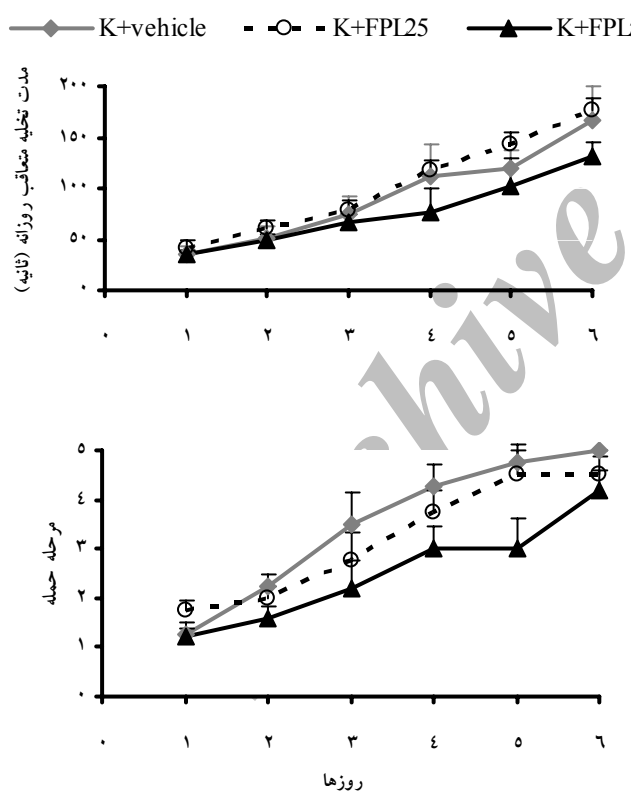
۲) **گروه کیندل:** در این گروه روزانه ۱۲ تحریک (فرکانس ۵۰ هرتز، به مدت ۳ ثانیه و به فواصل ۵ دقیقه) برای کیندل کردن استفاده شد. این تحریکات تا رسیدن حیوان به مرحله ۵ ادامه یافتند. البته قبل از آغاز تحریک های کیندلینگ همانند گروه اول ثبت پتانسیل های میدانی و زوج پالس صورت گرفت.

۳) **گروه کیندل ACSF+:** در این گروه آزمایشی هر روز قبل از شروع ثبت ها حلال دارو به داخل بطن طرفی تزریق شد و سپس مراحل بعدی مشابه گروه کیندل صورت گرفت.

۴) **گروه کیندل FPL 67156+:** این گروه همانند گروه کیندل بود اما هر روز قبل از شروع ثبت، FPL 67156 با دوزهای $25 \mu\text{M}$ و $50 \mu\text{M}$ به صورت داخل بطنی به حیوانات تزریق شد.

مقایسه آماری کمیت های مدت زمان امواج تخلیه متعاقب، شیب fEPSP و دامنه PS در طی روند صرع زایی در بین گروه های مختلف آزمایشی توسط آزمون تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه از نوع Repeated Measures و آزمون متعاقب Bonferoni صورت گرفت. اختلاف شاخص زوج پالس در هر فاصله زوج پالسی بین گروه ها توسط آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون متعاقب Bonferoni صورت گرفت. وقوع مراحل پنج گانه تشنجی بین گروه های آزمایشی نیز با استفاده از آزمون کروسکال

به همراه تحریکات کیندلینگ دامنه اسپایک‌های پتانسیل-های میدانی را نسبت به گروه کیندل ($P < 0/05$) افزایش داد ($124/124 \pm 6/55$) ولی اثر معناداری بر شیب اسپایک-های تجمعی نداشت. تزریق این دارو با دوز 25 میکرومولار اثر معناداری بر شیب پتانسیل‌های میدانی و دامنه اسپایک‌های تجمعی نسبت به گروه کیندل نداشت (نمودارهای ۲). همچنین، تزریق FPL 67156 با دوز 25 میکرومولار تغییر معناداری در تضعیف زوج پالس اولیه، ثانویه و تسهیل زوج پالس نسبت به گروه کیندل ایجاد نکرد ولی دوز 50 میکرومولار باعث تضعیف تسهیل زوج پالس در فواصل زمانی بین پالسی 50 تا 100 میلی ثانیه در روز سوم شد ($P < 0/05$) (نمودارهای ۳).



نمودارهای ۱: اثر کیندلینگ و تزریق FPL بر مدت زمان تخلیه-های متعاقب روزانه و مراحل رفتاری تشنج طی روند کیندلینگ مسیر پرفورنت در حیوانات گروه کیندل. تزریق FPL با دوز 50 میکرومولار باعث تغییر معناداری در مدت زمان تخلیه‌های متعاقب و مراحل تشنجی نسبت به گروه کیندل نگردید. (درگروه کیندل $n=6$ ، در سایر گروه‌ها $n=4$).

والیس و آزمون متعاقب من‌ویتنی-یو مقایسه گردید. در محاسبات آماری از نرم افزار Prism نسخه شماره 5 استفاده شد.

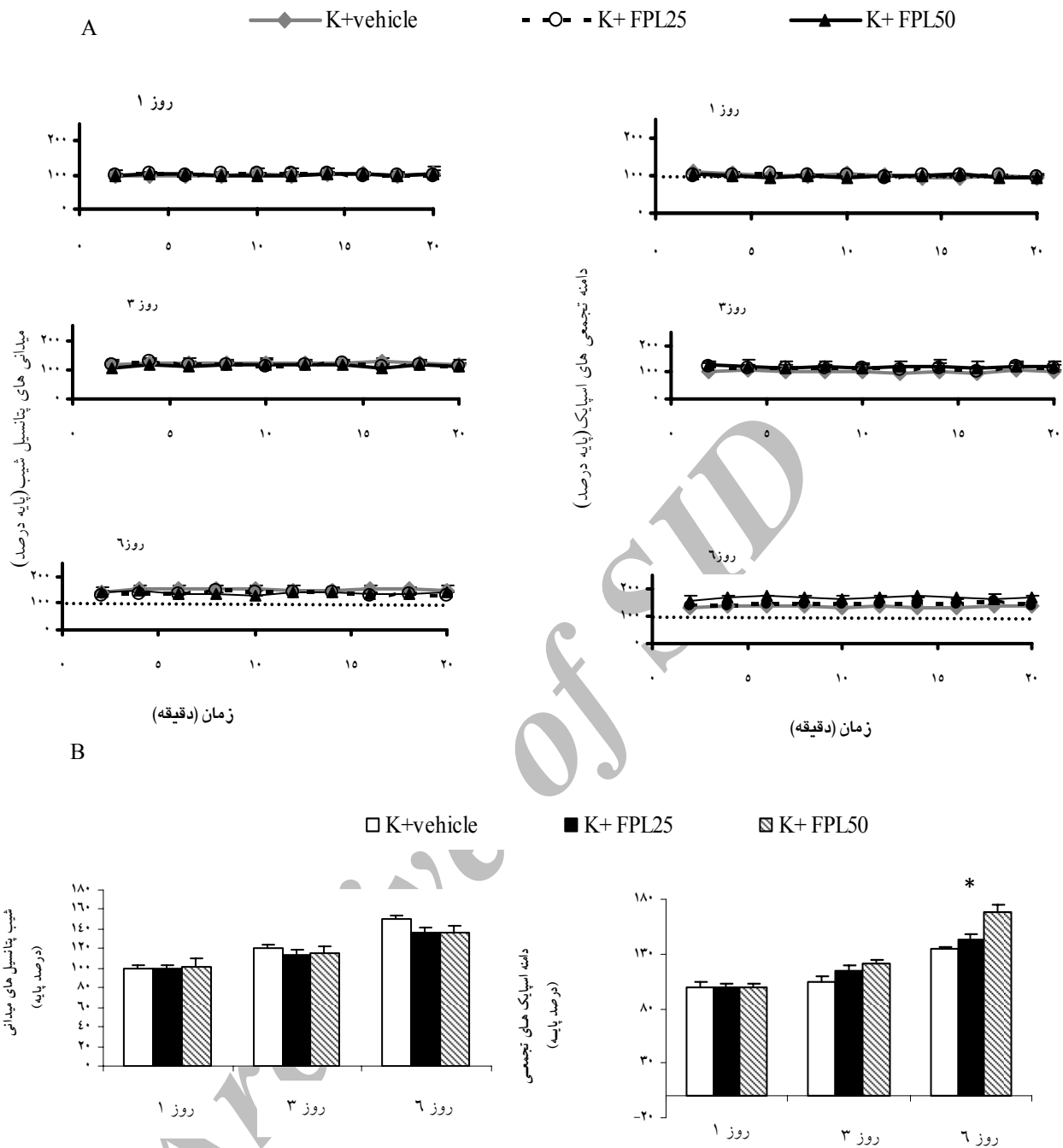
یافته‌ها

میانگین شدت تحریکات آستانه برای شروع تخلیه‌های متعاقب در گروه‌های مختلف تفاوت معناداری نداشت ($185/2 \pm 25/43$)؛ مجموع کل مدت زمان تخلیه-های متعاقب در گروه کیندل $559/5 \pm 19/79$ ثانیه در روز بود. میانگین تعداد روزهای لازم برای رسیدن حیوانات گروه کیندل به مرحله 5 تشنج، $5/7 \pm 0/5$ روز بود. بنابراین، در گروه‌های دیگر حیوانات فقط 6 روز تحریک داده شدند.

در طی روند کیندلینگ مدت زمان تخلیه‌های متعاقب (روز ششم نسبت به روز اول $461/80 \pm 25/53$ درصد) افزایش نشان داد ($P < 0/001$)، مراحل تشنجی، شیب پتانسیل‌های میدانی (روز ششم نسبت به روز اول $149/747 \pm 3/31$ درصد) و دامنه اسپایک‌های تجمعی افزایش یافت (روز ششم نسبت به روز اول $134/65 \pm 2/42$ درصد) ($P < 0/001$) (نمودارهای ۱ و ۲).

در حیوانات گروه کیندل با گذشت زمان (روز 6 نسبت به روز 1) تضعیف زوج پالس اولیه در فواصل زمانی بین پالسی 10 تا 50 میلی ثانیه و نیز تضعیف زوج پالس ثانویه در فواصل زمانی 300 تا 500 میلی ثانیه تقویت شد. به علاوه، در فواصل زمانی بین پالسی 70 میلی ثانیه تسهیل زوج پالس تضعیف گردید (نمودارهای ۳).

در بررسی تأثیر FPL 67156 (مهارگراکتو ATPase) بر کمیت‌های تشنجی در گروه کیندل مشاهده شد که تزریق FPL 67156 با دوزهای 25 و 50 میکرومولار باعث تغییر معناداری در مدت زمان تخلیه‌های متعاقب و مراحل تشنجی نسبت به گروه کیندل در مدت زمان تخلیه‌های متعاقب و مراحل تشنجی نگردید (نمودارهای ۱). تزریق FPL 67156 با دوز 50 میکرومولار

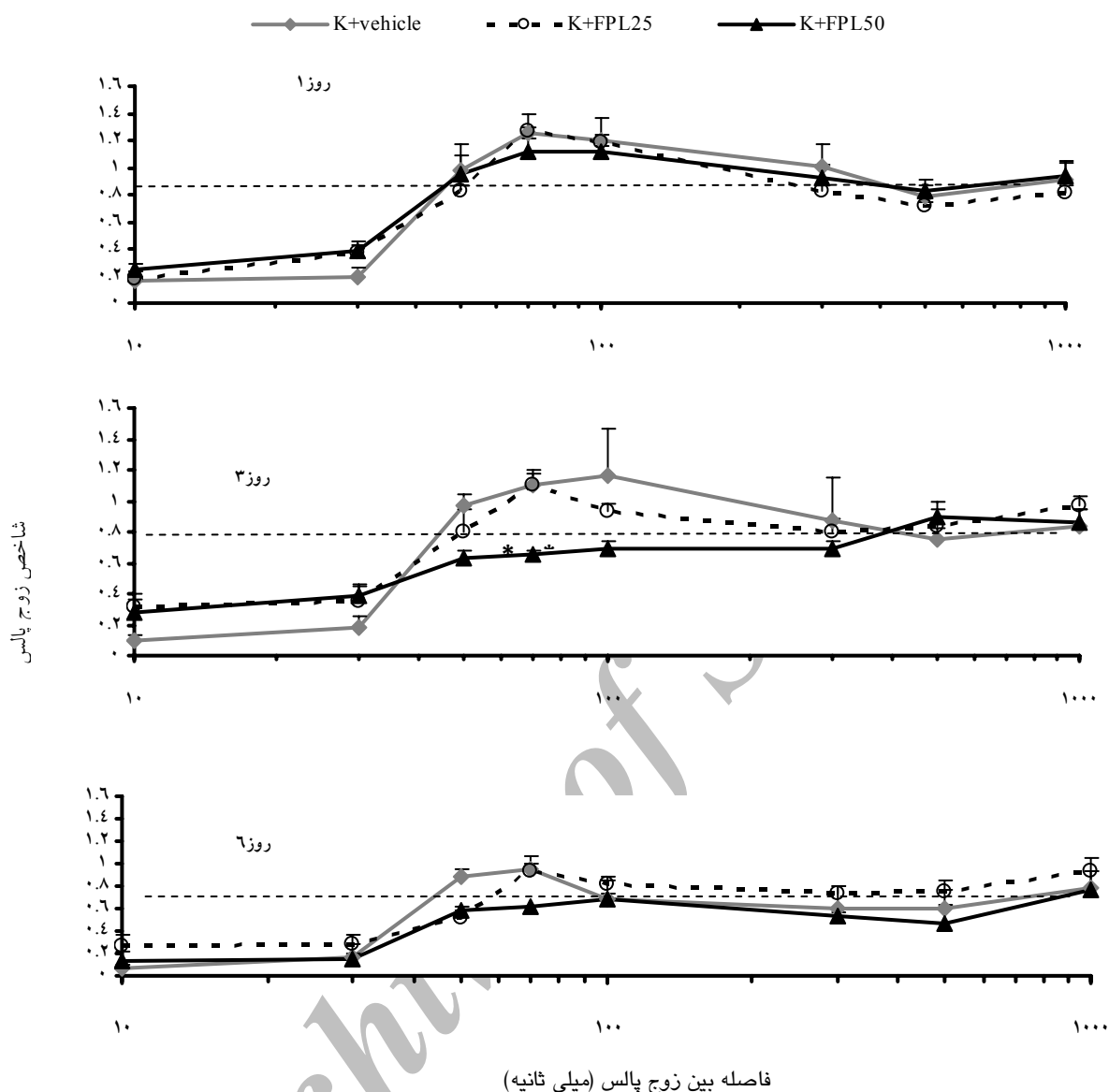


نمودارهای ۲: اثر تزریق FPL بر شیب پتانسیل های میدانی (fEPSP) و دامنه اسپایک های تجمعی (PS) در طی روند کیندلینگ روزهای ۱، ۳ و ۶ (A) در طی روند کیندلینگ تزریق FPL با دوز ۵۰ میکرومولار در گروه K+50FPL دامنه اسپایک های تجمعی (PS) را نسبت به گروه کیندل افزایش داد. تزریق این دارو با دوز ۲۵ میکرومولار در گروه K+50 FPL اثری بر شیب پتانسیل های میدانی و دامنه اسپایک های تجمعی نسبت به گروه کیندل نداشت (B). میانگین داده های نمایش داده شده در قسمت A در روزهای ۱، ۳ و ۶ به صورت نمودارهای ستونی آورده شده است. داده ها به صورت میانگین ± خطای معیار نشان داده شده اند. *نشان دهنده $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کیندل است (در گروه کیندل $n=6$ ، در سایر گروه ها $n=4$)

احتمال بروز مراحل مختلف رفتاری تشنج و مدت زمان امواج تخلیه متعاقب در طی روند کیندلینگ نسبت به گروه کیندل نمی شود. اما شکل پذیری سیناپسی را تحت

بحث

نتایج این تحقیق نشان می دهد که مهار آنزیم اکتو ATPase (با تزریق FPL 67156) باعث تغییری در



نمودارهای ۳: اثر کیندلینگ و تزریق FPL بر شاخص زوج پالس در روند کیندلینگ (روزهای ۱، ۳ و ۶) کیندلینگ تضعیف زوج پالس اولیه (۱۰-۵۰ میلی ثانیه (و ثانویه ۱۵۰-۱۰۰۰) میلی ثانیه (را در ناحیه شکنج دنداندار افزایش می دهد. تزریق FPL با دوز ۲۵ میکرومولار در گروهی از حیوانات که تحریکات کیندلینگ دریافت می کردند، تغییر معناداری در کمیت های تشنجی ایجاد نکرد ولی تزریق FPL با دوز ۵۰ میکرومولار باعث تضعیف تسهیل زوج پالس در فواصل زمانی بین پالسی ۵۰ تا ۱۰۰ میلی ثانیه در روز ۳ شد * نشان دهنده $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کیندل است) در گروه کیندل $n=6$ ، در سایر گروه ها $n=4$).

از سیناپس های تحریکی و برآیند دپلاریزاسیون های موضعی ایجاد شده در نورون ها را آشکار می کند و نمادی از کارایی سیناپس های تحریکی مسیرهای آوران می باشد در حالی که PS مربوط به وقایع پتانسیل عمل در مجموعه نورون هاست و دامنه SP هم تحت تأثیر دو عامل می باشد: تعداد نورون هایی که به آستانه تحریک رسیده و تخلیه می شوند و میزان همزمانی تخلیه نورون ها. در حقیقت،

تأثیر قرار می دهد به گونه ای که دامنه PS (نه شیب EPSP) را نسبت به گروه کیندل افزایش داده و میزان کاهش تسهیل زوج پالس را نسبت به گروه کیندل افزایش می دهد.

نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که با اعمال تحریکات کیندلینگ شیب EPSP و دامنه PS افزایش می یابد. ثبت EPSP مجموعه نورون ها، عملاً تغییرات ناشی

دامنه PS به مکانیسم‌های پیش سیناپسی (ورودی‌های تحریکی در ناحیه دندریتی) و هم به مکانیسم‌های پس سیناپسی (تحریک‌پذیری سلول پس سیناپسی) وابسته است (۱۹).

نتایج این تحقیق همانند تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که در طی روند کیندلینگ PPD تقویت شده و PPF تضعیف می‌شود. تعدیل زوج پالس که ساده‌ترین نوع شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت می‌باشد، معمولاً در فواصل زمانی بین ده‌ها میلی ثانیه و تا چندین ثانیه اتفاق می‌افتد و می‌تواند به شکل PPD و PPF ظاهر شود (۲۰). مشخص شده است که اینترنورون‌های گابارژیک به‌عنوان پایه و اساس فیزیولوژیک مکانیسم‌های مهارتی پس و پیش خورد در هیپوکمپ عمل می‌کنند (۲۱). به دلیل این‌که در پدیده PPD، تضعیف پاسخ به دومین تحریک از یک زوج پالس که با فاصله خاصی به دنبال هم می‌آیند، اندازه‌گیری می‌شود، این پدیده سطح عمل سیستم مهارتی را در مدار هیپوکمپ منعکس می‌نماید (۲۲).

چون IPSP مربوط به گیرنده GABAA به سرعت به حداکثر مقدار خود می‌رسد، از این‌رو فواصل ۱۰ تا ۳۰ میلی‌ثانیه برای بررسی وقایع مهارتی گیرنده GABAA مورد استفاده قرار می‌گیرد. از طرف دیگر IPSP مربوط به گیرنده GABAB است که با یون پتاسیم میانجیگری می‌شود به آهستگی به حداکثر خود می‌رسد و بنابراین، PPI مشاهده شده در فواصل طولانی‌تر به وقایع مهارتی گیرنده GABAB نسبت داده می‌شود. اما در فواصل بین این دو حد، پدیده PPF دیده می‌شود. مکانیسم پیش سیناپسی PPF در سیناپس‌های هیپوکمپ نشان داده شده است (۲۳، ۲۴). در حقیقت بزرگتر بودن پاسخ دوم در اثر تسهیل رهایش نوروترانسمیتر است. یون کلسیم آزاد باقی مانده در پایانه‌ها در اثر تحریک اول با یون کلسیم آزاد شده و در اثر تحریک دوم، احتمال رهایش نوروترانسمیتر را افزایش می‌دهند.

پیشنهاد شده است هر عاملی که احتمال رهایش نوروترانسمیتر را افزایش دهد باید PPF را تحت تأثیر قرار دهد. با افزایش احتمال رهایش نوروترانسمیتر میزان PPF کاهش می‌یابد به طوری که کاهش PPF به دنبال القای LTP و کیندلینگ در مطالعات زیادی گزارش شده است (۲۳).

FPL با مهار شکسته شدن ATP در مسیر تولید آدنوزین احتمالاً میزان تولید آدنوزین را کاهش می‌دهد. طبیعتاً این امر اثر مهارتی آدنوزین را کم می‌کند. FPL از طرفی میزان آدنوزین را کم کرده از سوی دیگر باعث افزایش ATP شده و احتمالاً فرضیه تحریک گیرنده A2 را با افزایش ATP قوت می‌بخشد.

با توجه به نکات ذکر شده، احتمالاً کاهش مهار، تغییر معناداری در مدت زمان تخلیه متعاقب و شیب EPSP پتانسیل‌های میدانی را موجب می‌شود. همچنین ممکن است جلوگیری از تولید آدنوزین و افزایش ATP صورت گرفته بر سیناپس‌های تحریکی اثر داشته باشد ولی چون تفاوت معناداری در دامنه PS ایجاد نکرد احتمالاً سینکرونیزه شدن نورون‌ها تحت تأثیر قرار گرفته است. بر اساس اطلاعات حاصل از این آزمایش، می‌توان پیشنهاد کرد که مسیر تولید آدنوزین توسط آنزیم اکتو ATPase، در ایجاد آدنوزین اندوژن و جلوگیری از روند صرع‌زایی می‌تواند نقش داشته باشد.

در بررسی شاخص زوج پالس نیز مشاهده شد که در شکنج دندانه‌ای، کاربرد FPL 67156 تغییر معناداری در میزان PPD و PPF ایجاد نکرد. این نشان می‌دهد که افزایش ATP تولید شده از طریق مهار اکتو ATPase نمی‌تواند از افزایش پاسخ‌های مهارتی و تسهیلی در حین کیندلینگ جلوگیری کند و ایجاد این پاسخ‌ها تحت تأثیر این مسیر نیست.

فرکانس تحریک اعمال شده به نورون‌های پس سیناپسی مشخص می‌کند که کدام یک از گیرنده‌های آدنوزینی فعال می‌شوند. این ایده بر سه واقعیت استوار

است:

- (۱) بسته به فعالیت ورودی، آدنوزین و یا مشتقات ATP از انتهای پیش سیناپسی به شکاف سیناپسی رها می‌شوند.
- (۲) تمایل گیرنده‌های A1 بیشتر از A2 است.
- (۳) تراکم و توزیع گیرنده‌های A1 بیش از A2 است.
- (۴) فعالیت گیرنده‌های A2 در نورون‌های CA1 هیپوکمپ به دلیل Cross talk بین A1 و A2، باعث کاهش فعالیت گیرنده A1 می‌شود.

بنابراین، بسته به درجه رهایش، برداشت و دیفوزیون، غلظت آدنوزین و مشتقات آن در تحریک سیناپسی بالا بیشتر از وقتی است که تحریک سیناپسی با فرکانس پایین صورت می‌گیرد. به دلیل تمایل بالای گیرنده A1 نسبت به A2 هر دوی A1 و A2 در تحریک سیناپسی بالا می‌توانند فعال شوند ولی فقط A1 است که در تحریکات با فرکانس پایین فعال می‌شود. در کیندلینگ میزان آدنوزین افزایش می‌یابد، آدنوزین افزایش یافته می‌تواند بر هر دو گیرنده A1 و A2 اثر کند که احتمالاً اثر غالب فعالیت گیرنده A1 است و باعث افزایش گیرنده می‌شود. وقتی تولید آدنوزین را در بخشی از مسیر مهار می‌کنیم، طبیعتاً جلوی افزایش آن را می‌گیریم. وقتی میزان آدنوزین کاهش می‌یابد، اثر مهار آدنوزین کاهش یافته و بر گیرنده A1 اثر می‌گذارد و اثر مهار بر شیب EPSP و دامنه PS مشاهده می‌شود.

آدنوزین اندوژن که در حین HFS و LFS رها می‌شود و از طریق گیرنده‌های A1 و A2 عمل می‌کند، می‌تواند به ترتیب تضعیف سیناپسی طولانی مدت (LTD) و تقویت سیناپسی طولانی مدت (LTP) را ایجاد نماید (۸).

در مغز و محیط ATP به وسیله آنزیم متصل به غشای اکتونو کلتوتیداز به آدنوزین تبدیل می‌شود. این آنزیم عمل نوروترانسمیتر ATP را خاتمه می‌بخشد. علاوه بر این، در حین تحریک ناحیه CA1 هیپوکمپ مقدار زیادی ATP و مشتقات آدنوزین از انتهای پیش سیناپسی به فضای سیناپسی رها می‌شود که این رهایش

وابسته به فرکانس است. همچنین نشان داده شده که ATP و مشتقات آدنوزین به عنوان کوترانسمیتر نیز از سیناپس-های CA1 رها می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهند که به دنبال فعالیت عصبی نه تنها افزایش رهایش ATP وجود دارد بلکه میزان نوکلئوتیدازهای محلول نیز افزایش می‌یابد. این امر نشان‌دهنده آن است که غیر فعال شدن ATP با افزایش فعالیت عصبی زیاد می‌شود. بنابراین، بر خلاف دیگر نوروترانسمیترها، غیر فعال شدن ATP توسط رهایش آنزیم متابولیک خاصی صورت می‌گیرد. این رهایش وابسته به Ca^{2+} است. بنابراین، ATP و نوکلئوتیدازهای محلول در وزیکول‌هایی ذخیره می‌شوند. پس فعالیت اکتونو کلتوتیداز در شرایط افزایش فعالیت نورونی مثل تشنج افزایش می‌یابد.

با مهار اکتونو کلتوتیداز، ATP تجمع پیدا می‌کند. شواهدی نیز وجود دارد که ATP فعالیت تشنجی را کم می‌کند. ATP تبدیل به ADP، AMP و آدنوزین می‌شود که هر یک از این‌ها می‌توانند گیرنده خاصی را فعال کنند. ADP گیرنده P2 و AMP گیرنده P1 را فعال می‌کند (۲۵). مطالعات نشان می‌دهد که AMP تولید شده توسط ATP باعث کاهش فعالیت تشنجی می‌شود. همچنین فعالیت ۵- نوکلئوتیداز می‌تواند از فعالیت مهار آدنوزین بر تخلیه‌های تشنجی جلوگیری کند (۷). با توجه به این که مهار آنزیم اکتو ATPase می‌تواند باعث تجمع ATP و به دنبال آن، ADP و AMP می‌گردد و با توجه به این که غلظت ATP در شرایط طبیعی ۵۰ برابر AMP است و تغییرات کم در غلظت ATP در شرایط طبیعی می‌تواند تغییرات زیادی در غلظت AMP ایجاد کند (۲۶)، AMP افزایش یافته اثر مهار القای کرده و باعث پوشانده شدن اثر تحریکی ایجاد شده توسط مهار تولید آدنوزین با AOPCP می‌گردد. مهار آنزیم اکتو ATPase باعث انباشته شدن ATP می‌شود. شواهدی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد ATP می‌تواند رهایش گلوتامات را مهار کند و رهایش گابا را تحریک کند و به این وسیله عمل تحرک‌پذیری گلوتامات

به شکل پیش سیناپسی شود (۲۸). آدنوزین اندوزنی که رها می‌شود از طریق گیرنده‌های A1 و A2 عمل می‌کند و می‌تواند به ترتیب تضعیف سیناپسی طولانی و تقویت سیناپسی طولانی ایجاد کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از صندوق حمایت از پژوهشگران کشور و معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس برای حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدر دانی به عمل می‌آورند.

را مهار کند. همچنین مطالعاتی وجود دارند که نشان می‌دهند ATP به‌طور مستقیم باعث مهار آگروسیتوز وابسته به کلسیم شده و بر رهایش گلوتامات تأثیر می‌گذارد.

مشخص شده است که آدنوزین اندوزن از طریق اثر بر گیرنده‌های A1 پیش سیناپسی باعث دپرسیون انتقال سیناپسی در ناحیه CA1 هیپوکمپ می‌شود. علاوه بر آن، گیرنده‌های A1 باعث کاهش دپولاریزاسیون پس سیناپسی از طریق فعال کردن کانال‌های K می‌شوند (۲۷). پس مهار تولید آدنوزین چنان که مشاهدات ما نشان می‌دهد جلوی دپرسیون انتقال سیناپسی را می‌گیرد. همچنین آدنوزین می‌تواند باعث کاهش رهایش نوروترانسمیترهای تحریکی

References

- Milton J G. Epilepsy as a dynamic disease: A tutorial of the past with an eye to the future. *Epilepsy Behav.* 2010; 18: 33-44.
- Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ, Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol.* 2004; 73: 1-60.
- Amaral D, Lavenex P, *Hippocampal Neuroanatomy, The hippocampus book*, Oxford: Oxford University Press; 2006.
- Racine R, Rose PA, Burnham WM. Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. *Can J Neurol Sci* 1977; 4: 273-8.
- McNamara JO, Byrne MC, Dasheiff RM, Fitz JG.. The kindling model of epilepsy: A review. *Prog Neurobiol* 1980; 15: 139-9.
- 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: 2171-6.
- Boison D. Adenosine and Epilepsy: From Therapeutic Rationale to New Therapeutic Strategies. *The neuroscientist.* 2005; 11: 25-36.
- Berman RF, Fredholm BB, Aden U, O'Connor WT. Evidence for increased dorsal hippocampal adenosine release and metabolism during pharmacologically induced seizures in rats. *Brain Res.* 2000; 872: 44-53.
- Naegele R J, Royston S, Ribeiro E. Recent advancements in stem cell and gene therapies for neurological disorders and intractable epilepsy. *Neuropharmacol.* 2010; 58: 855-864.
- 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: 121-4.
- Alasvand Zarasvand M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Palizvan MR. Anticonvulsant effect of bilateral injection of N6-cyclohexyladenosine into the CA1 region of the hippocampus in amygdala-kindled rats. *Epilepsy Res Suppl* 2001; 47: 141-9.
- Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Pourgholami MH. Intraperitoneal and intraamygdala N(6)-cyclohexyladenosine suppress hippocampal kindled seizures in rats. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000; 858: 48-54.
- Zhang G, Franklin PH, Murray TF. Manipulation of endogenous adenosine in the rat prepiriform cortex modulates seizure susceptibility. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 264: 1415-24.

14. Dycke A, Raedt R, Verstraete A, Theofilas P, Wadman W, Vonck K, et al. Astrocytes derived from fetal neural progenitor cells as a novel source for therapeutic adenosine delivery. *Seizure* 2010; 1611: 1-8.
15. Fiona M, Martin BT, Stone J. Adenosine monophosphate as a mediator of ATP effect at P1 purinoceptor. *Br J Pharmacol.* 1998; 124: 818-24.
16. 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.
17. Watson GPC. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* New York: Academic Press. 1986,
18. Austin-Lafrance R J, Morgane P J, Bronzino J D. Prenatal protein malnutrition and hippocampal function: rapid kindling. *Brain Res Bull.* 1991; 27: 815-8.
19. Fujii S, Kuroda Y, Ito K, Kaneko K, Kato H. Effects of adenosine receptors on the synaptic and EPSP-spike components of long-term potentiation and depotentiation in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol* 1999; 521: 451-66.
20. Kravchenko MO, Moskalyuk AO, Fedulova SA, Veselovsky NS. Calcim dependent changes of paired-pulse modulation at single GABAergic synapses. *Neurosci Lett.* 2006; 395: 133-7.
21. Bliss T, Collingridge G, Morris RI. Synaptic plasticity in the hippocampus., in: Andersen P, et al., (Editors). *The Hippocampus Book*, , Oxford: New York; 2007. p. 343-444.
22. Davies CH, Davies SN, Collingridge GL. Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic response in rat hippocampus. *J Physiol.* 1990; 242: 513-31.
23. Santschi L A, Stanton PKA. paired-pulse facilitation analysis of long-term synaptic depression at excitatory synapses in rat hippocampal CA1 and CA3 regions. *Brain Res.* 2003; 962: 78-91.
24. Sokolov MV, Rossokhin AV, Behnisch T, Reymann KG, Voronin LL. Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation of minimal excitatory postsynaptic potentials in rat hippocampal slices:a path-clamp study. *Neurosci* 1998; 65: 1-13.
25. Kemp N, Bashir ZI. A role for adenosine in the regulation of long-term depression in the adult rat hippocampus in vitro. *Neurosci Lett.* 1997; 225: 189-92.
26. Sawynok J, Liu X J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol.* 2003; 69: 313-40.
27. Haas HL. Functions of neuronal adenosine receptors. *Pharmacol Toxicol.* 2000; 362: 375-81.
28. Ribeiro JA. Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. *Pharmacol Toxicol.* 1995;77: 299-305.