

تاثیر وراپامیل و نالوکسان بر حملات تشنجی ناشی از مدل کیندلینگ شیمیایی در موش‌های صحرائی

دکتر محمد رضا پالیزوان^۱، احسان اله غزنوی راد^۲، اعظم امینی کمیجانی^۳

نویسنده‌ی مسئول: اراک، دانشکده‌ی پزشکی، گروه فیزیولوژی palizvan@yahoo.com

دریافت ۸۳/۹/۱۶، پذیرش ۸۳/۱۲/۲۴

خلاصه

مقدمه: با توجه به شیوع و عوارض حملات تشنجی و اهمیت مهار آن، تحقیق حاضر به منظور تعیین نقش گیرنده‌های اپیویدی و کانال‌های کلسیمی حساس به ولتاژ بر روی کیندلینگ ایجاد شده با پتیلین تترازول در سال ۱۳۸۳ در اراک انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: این تحقیق تجربی بر روی ۲۴ موش صحرائی نژاد ویستار انجام گرفت. به منظور ایجاد کیندلینگ شیمیایی، پتیلین تترازول با غلظت‌هایی که در ابتدا تشنج را نیستند (۳۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) هر ۴۸ ساعت یک بار به موش‌ها تزریق شد. پس از تزریق دارو، رفتارهای حیوان به مدت ۲۰ دقیقه تحت نظر گرفته شد و پاسخ‌های تشنجی بر اساس معیار پنج رتبه‌ای طبقه‌بندی شد. پس از برقراری کیندلینگ، موش‌ها به چهار گروه تقسیم شدند و به هر یک از گروه‌ها ۲۰ دقیقه قبل از تزریق پتیلین تترازول به ترتیب نالوکسان، وراپامیل (هریک به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، نالوکسان و وراپامیل به صورت هم‌زمان و حلال نالوکسان و وراپامیل (گروه شاهد) تزریق گردید و اثر این مواد بر روی مرحله‌ی تشنج، مدت زمان مرحله‌ی ۵ تشنج و معکوس مدت زمانی که طول می‌کشد حیوان وارد مرحله‌ی ۵ شود، مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات با استفاده از آزمون آماری ویلکاکسون تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: وراپامیل مدت زمان مرحله‌ی ۵ و معکوس مدت زمان ورود به مرحله‌ی ۵ را به طور معنی‌داری ($P=0/05$) کاهش داد. نالوکسان تاثیری بر روی هیچ‌کدام از پارامترهای تشنج نداشت، در حالی که تزریق هم‌زمان وراپامیل و نالوکسان اثرات ضد تشنجی شدیدی را بر روی کیندلینگ ناشی از تزریق داخل صفاقی پتیلین تترازول ایفا نمود و بر روی همه‌ی پارامترهای تشنجی اثر کاهنده‌ی معنی‌داری داشت ($P=0/05$).

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: تجویز هم‌زمان وراپامیل و نالوکسان به عنوان مهارکننده‌ی مؤثر در تشنجات ایجاد شده توسط کیندلینگ شیمیایی با پتیلین تترازول عمل می‌کند. انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه به عنوان یک روش درمانی ضد صرع توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: پتیلین تترازول، کیندلینگ، وراپامیل، نالوکسان

مقدمه

می‌شود. در این مدل با تحریک مکرر یک ناحیه‌ی مغزی به وسیله‌ی محرکی الکتریکی و یا شیمیایی - که در ابتدا قادر به ایجاد تشنج نیست - در حیوان تشنج ایجاد می‌کنند (۶-۴). کیندلینگ به عنوان مدلی از تشنج‌های موضعی پیچیده در انسان شناخته شده است و از آن جا که این تشنج‌ها شایع‌ترین انواع تشنج در انسان می‌باشند از مدل کیندلینگ در تحقیقات زیادی استفاده شده است (۷،۸). در حدود ۳۰ درصد از

صرع یکی از اختلالات عصبی مزمن در انسان است که حدود ۱ تا ۲ درصد از جمعیت بشری با آن درگیر هستند (۱). این بیماری با قطع موقتی و قابل برگشت اعمال طبیعی مغز و تخلیه‌های حمله‌ای هم‌زمان در جمعیت‌های بزرگ نوروئی مشخص می‌گردد (۲،۳). برای مطالعه‌ی صرع از مدل‌های آزمایشگاهی مختلفی از جمله مدل کیندلینگ استفاده

^۱ دکتری فیزیولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اراک

^۲ کارشناس ارشد میکروبی‌شناسی، مربی دانشگاه علوم پزشکی اراک

^۳ کارشناس ارشد فیزیولوژی، مربی دانشگاه علوم پزشکی اراک

بیماران صرعی نسبت به درمان دارویی رایج پاسخ نمی دهند. امروزه بر اساس اطلاعات روز افزونی که حاصل مطالعه بر روی اساس سلولی و ملکولی ایجاد صرع می باشد، تلاش پیوسته‌ای برای یافتن داروهای جدید ضد صرع در حال انجام است. مشخص شده است که کلسیم نقش اساسی را در بروز تشنج ایفا می کند. بنابراین آنتاگونیست های کلسیمی می‌توانند اثرات کلسیم را بر روی سلول های مغزی تعدیل کرده و بنابراین دارای اثرات ضد صرعی باشند (۹).

در مورد نقش سیستم اپیویدی در طی فعالیت صرعی و افزایش رهایش پپتیدهای اپیویدی در مایع مغزی نخاعی در حیوانات، پس از تشنج گزارشاتی وجود دارد (۱۰، ۱۱)، اما در مورد نقش این مواد در ایجاد تشنج و یا مهار آن اختلاف نظر وجود دارد. در حالی که برخی تحقیقات نشان داده‌اند که نالوکسان (آنتاگونیست اپیویدی) قادر به مهار اثر ضد تشنجی الکتروشوک است (۱۲)، برخی دیگر از پژوهش‌ها گزارش داده‌اند که تزریق زیر جلدی نالوکسان تخلیه های متعاقب را در کیندلینگ الکتریکی کاهش می‌دهد (۱۳). از طرف دیگر نتایج برخی تحقیقات نشان داده‌اند که تزریق اندولین (آگونیست اپیویدی) تاثیری بر روی کیندلینگ شیمیایی ایجاد شده با پنتیلن ترازول (PTZ)^۱ ندارد (۱۴). بنابراین از آنجا که نقش این اپیویدها در کیندلینگ ایجاد شده با تزریق داخل صفاقی PTZ و بر هم کنش این گیرنده ها با کانال های کلسیمی نوع L تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته است، این تحقیق با هدف تعیین اثر نالوکسان (آنتاگونیست اپیویدی) و وراپامیل (آنتاگونیست کانال‌های کلسیمی نوع L) و اثر تزریق هم زمان این مواد بر روی کیندلینگ شیمیایی ایجاد شده با PTZ در موش های صحرایی نر در سال ۱۳۸۳ انجام گرفت.

مواد و روش ها

در این تحقیق تجربی از ۲۴ موش صحرایی نر نژاد ویستار^۲ (تهیه شده از انستیتو رازی تهران) با وزن بین ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در اتاقی با حرارت ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و آب و غذا به طور آزاد در اختیار آنها قرار داده شد. به منظور ایجاد کیندلینگ شیمیایی هر ۴۸ ساعت یک بار (PTZ) (۳۷/۵ میلی‌گرم بر کیلو گرم به صورت داخل صفاقی) به موش‌ها تزریق شد. پس از تزریق دارو رفتار های حیوان برای مدت ۲۰ دقیقه تحت نظر گرفته شده و پاسخ‌های تشنجی حیوان (مراحل حمله) بر اساس تحقیقات قبلی (۱۵) به شکل زیر طبقه بندی شدند: مرحله‌ی صفر= عدم پاسخ؛ مرحله‌ی اول= انقباض عضلات صورت و گوش‌ها؛ مرحله‌ی دوم= موج انقباضی بدن؛ مرحله‌ی سوم= پرش های میوکلونیک و ایستادن روی دو پا؛ مرحله‌ی چهارم= افتادن به پهلو و مرحله‌ی پنجم= افتادن به پشت و حملات عمومی تونیک و کلونیک. فعالیت‌های تشنجی در طول بیست دقیقه پس از تزریق PTZ ارزیابی شدند. پس از اولین تزریق بعضی از موش‌ها مراحل اول و یا دوم تشنج را از خود نشان دادند، با ادامه‌ی تزریقات به تدریج تشنج در موش‌ها پیشرفت کرد و پس از ۱۲ تا ۱۵ بار تزریق دارو تمام موش‌ها مرحله‌ی پنجم تشنج را از خود نشان دادند. ۴۸ ساعت پس از این که موش‌ها دو بار پی‌در پی در اثر تزریق PTZ مرحله‌ی پنجم تشنج را از خود نشان دادند، موش‌ها به ۴ گروه (۳ گروه آزمون و یک گروه شاهد) تقسیم شدند. گروه اول (گروه شاهد) موش‌هایی بودند که ۲۰ دقیقه قبل از تزریق PTZ سالین (حلال وراپامیل و نالوکسان) را با همان حجم نالوکسان و وراپامیل (به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به شکل داخل صفاقی دریافت کردند. ۲۰ دقیقه قبل از تزریق PTZ، گروه دوم با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن نالوکسان و گروه سوم به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن وراپامیل به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه

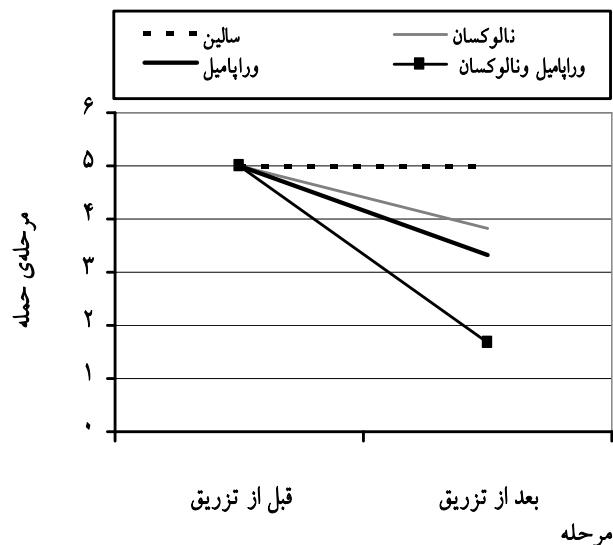
² Wistar

¹ Pentylentetrazol

چهارم نیز موش‌هایی بودند که ۲۰ دقیقه قبل از تزریق PTZ، وراپامیل و نالوکسان را به طور هم زمان (هر یک به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم) و به شکل داخل صفاقی دریافت کردند. تاثیر دارو بر متغیرهای تشنجی (مرحله‌ی حمله، مدت زمانی که حیوان در مرحله‌ی ۵ تشنج به سر می‌برد و معکوس مدت زمانی که طول می‌کشد تا حیوان وارد مرحله‌ی ۵ تشنج گردد) اندازه‌گیری شد و با آزمون آماری ویلکاکسون مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

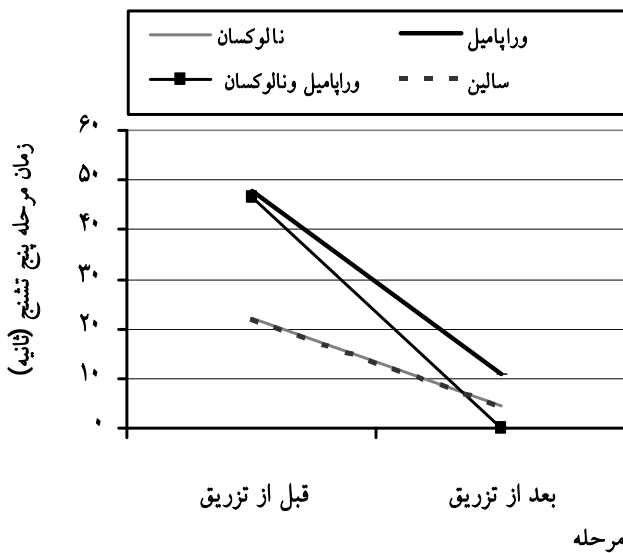
یافته‌ها

تحقیق بر روی ۲۴ موش صحرایی انجام گرفت. بررسی تاثیر تزریق داخل صفاقی داروها بر مرحله‌ی حمله در نمودار (۱) ارایه شده و نشان می‌دهد که تزریق سالین در گروه شاهد تاثیری بر مرحله‌ی حمله نداشت. تزریق نالوکسان مرحله‌ی حمله را کاهش داد ولی این اختلاف معنی‌دار نبود.



نمودار ۱ - اثر تزریق داخل صفاقی سالین، نالوکسان، وراپامیل (هر یک ۱۰ میلی‌گرم در کیلو گرم) و نالوکسان و وراپامیل به طور هم‌زمان بر میانگین مرحله‌ی حمله، اراک ۱۳۸۳

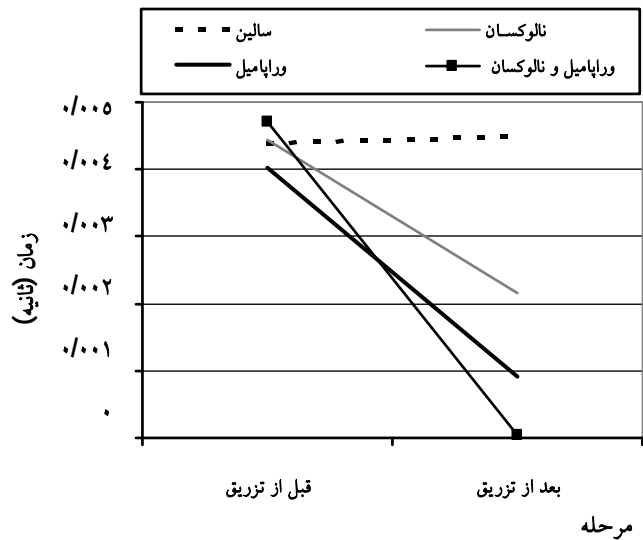
تزریق وراپامیل تاثیر بهتری نسبت به نالوکسان داشت اما این اختلاف نیز به لحاظ آماری معنی‌دار نبود. تزریق هم زمان نالوکسان و وراپامیل مرحله‌ی حمله را از ۵ به



نمودار ۲ - اثر تزریق داخل صفاقی سالین، نالوکسان، وراپامیل (هر یک ۱۰ میلی‌گرم در کیلو گرم) و نالوکسان و وراپامیل به طور هم زمان بر میانگین زمان مرحله‌ی پنج تشنج، اراک ۱۳۸۳

نمودار (۳) تاثیر تزریق داروها را بر روی معکوس مدت زمان لازم برای ورود حیوان به مرحله‌ی ۵ تشنج را نشان می‌دهد. بر این اساس تجویز سالین و نالوکسان تاثیری بر روی این مدت زمان نداشته ولی تزریق وراپامیل این زمان را به طور معنی‌داری کاهش داد ($P=0/05$) و تزریق هم‌زمان نالوکسان و وراپامیل این مدت زمان را از $0/047$ به صفر کاهش داد. آزمون آماری ویلکاکسون نشان داد که اثر تزریق هر دو دارو بر روی هر سه متغیر تشنجی

اندازه‌گیری شده معنی‌دار است ($P=0/05$).



نمودار ۳ - اثر تزریق داخل صفاقی سالین، نالوکسان، وراپامیل (هر یک ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و نالوکسان و وراپامیل به طور هم‌زمان بر روی معکوس مدت زمانی ورود حیوان به مرحله‌ی پنج تشنج، اراک ۱۳۸۳

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که تزریق وراپامیل دارای اثر متوسطی بر مهار تشنج ایجاد شده توسط تزریق PTZ است. تزریق نالوکسان اگر چه پارامترهای تشنجی را کاهش می‌دهد ولی اثر معنی داری بر روی هیچ یک از پارامترها نداشت. این در حالی است که تزریق هم‌زمان وراپامیل و نالوکسان اثرات ضد تشنجی شدیدی را بر روی کیندلینگ ناشی از تزریق داخل صفاقی PTZ ایفا کرد.

تحقیقات زیادی بر روی نقش ضد تشنجی مهارکننده‌های کانال‌های کلسیمی انجام گرفته است. همساز با یافته‌های این تحقیق نتایج یک تحقیق نشان داده است که نیفدیپین^۳ و نیمودیپین^۴ اثرات مهاری اندکی بر روی تشنج ایجاد شده توسط الکتروشوک دارند (۱۶). اگر چه مکانیسم دقیق اثر ضد تشنجی مهارکننده‌های کانال‌های کلسیمی تاکنون

مشخص نشده است، به نظر می‌رسد که وراپامیل از طریق تعدیل رهایش میانجی‌های عصبی اثرات ضد تشنجی خود را اعمال می‌کند (۱۷).

از سوی دیگر بین نتایج تحقیقاتی که در مورد اثرات اپیوئیدها بر روی تشنج انجام گرفته اختلاف مشاهده می‌شود. کین و همکارانش نشان دادند که تزریق مکرر بتا اندورفین، مت‌انکفالین و مورفین به داخل هیپوکمپ و یا آمیگدال پستی در موش‌های صحرایی، سبب تکامل کیندلینگ و تشنجات عمومی می‌گردد و تزریق نالوکسان سبب حذف و یا تخفیف رفتارهای تشنجی می‌گردد (۱۸). نتایج یک تحقیق نشان داده است که به دنبال کیندلینگ الکتریکی آمیگدال غلظت دینورفین در هیپوکمپ خرگوش افزایش می‌یابد. بنابراین اپیوئید مذکور می‌تواند یکی از علل بقای کیندلینگ آمیگدال باشد (۱۹). کاتو و همکارانش نیز گزارش کردند که به دنبال کیندلینگ الکتریکی غلظت بتا دینورفین در مغز موش‌های صحرایی تغییر نمی‌کند (۲۰). برخی تحقیقات (۱۹۹۹) نشان داده‌اند که مهار گیرنده‌های اپیوئیدی دلتا سبب به تعویق انداختن کیندلینگ شیمیایی با PTZ می‌گردد (۲۱) و برخی دیگر (۱۹۹۸) گزارش کرده‌اند که تزریق نالوکسان اثری بر روی کیندلینگ ندارد و یا این که سبب مهار اندکی بر روی کیندلینگ ایجاد شده با PTZ می‌گردد (۲۲). هیپوکمپ نقش مهمی را در بروز حملات تشنجی ایفا می‌کند (۲۳). تحقیقات نشان داده است که اپیوئیدها تعداد پتانسیل‌های عمل و تحریک پذیری را در اغلب نواحی هیپوکمپ افزایش می‌دهند (۲۴-۲۶). مکانیسم این افزایش تحریک پذیری از طریق افزایش هدایت یون‌های پتاسیم و هیپرپلاریزه شدن اینتر نورون‌های گاباژریک است (۲۷). به این ترتیب مهار از روی نورون‌های هرمی برداشته شده و میزان تحریک پذیری افزایش می‌یابد. به این ترتیب به نظر می‌رسد که تزریق هم‌زمان وراپامیل و نالوکسان از طریق دو مکانیسم جداگانه‌ی مهار کانال‌های کلسیمی توسط وراپامیل و برداشت مهار اپیوئیدها از روی اینترنورون‌های مهاری توسط نالوکسان،

³ Nifedipine
⁴ Nimodipine

سبب کنترل حملات تشنجی می گردند. به این ترتیب بر اساس این یافته و یافته‌های مشابه می توان گفت که تجویز هم‌زمان وراپامیل و نالوکسان به عنوان مهار کننده‌ی مؤثر در تشنجات ایجاد شده توسط کیندلینگ شیمیایی با PTZ عمل می‌کنند. با توجه به اثر تزریق هم‌زمان نالوکسان و وراپامیل در سرکوب تشنجات صرعی پیشنهاد می‌گردد که تاثیر این داروها به عنوان یک روش درمانی برای مهار تشنج، مورد تحقیق

بیشتری قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک به لحاظ تامین بودجه‌ی این طرح پژوهشی قدردانی می‌گردد.

منابع

- 1- Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S. **Learning and Memory**. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (editors). **Principles of Neural Science**. USA: McGrohill Co: 2000:227-1246.
- 2- Benardo LS, Pedley LA. Basic mechanisms of epileptic seizure. **Cleve Clin** 1984;51:195-203.
- 3- Dichter MA, Ayala GF. Cellular mechanisms of epilepsy: a status report. **Science** 1987; 237:157-64.
- 4- Barat SA, Abdel-Rahman MS. Cocaine and lidocaine in combination are synergistic convulsants. **Brain Res** 1996;742:157-62.
- 5- Ebert U, Rundfeldt C, Loshner W. Development and pharmacological suppression of secondary afterdischarges in the hippocampus of amygdala-kindled rats. **Eur J Neurosci** 1995;17: 732-41.
- 6- 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** 2001; 47: 141-9
- 7- Mirnajafi-Zadeh J, Mortazavi M, Fathollahi Y, Alasvand Zarasvand M, Palizvan MR. Effect of transient hippocampal inhibition on amygdaloid kindled seizures and amygdaloid kindling rate. **Brain Res** 2002;954: 220-6.
- 8- Palizvan MR, Fathollahi Y, Semnanian S, Hajezadeh S, Mirnajafizadh J. Differential effects of pentylenetetrazol-kindling on long-term potentiation of population excitatory postsynaptic potentials and population spikes in the CA1 region of rat hippocampus. **Brain Res** 2001;898: 82-90.
- 9- Baillie N, Marson AG. Calcium antagonists as an add-on therapy for drug-resistance epilepsy. **Cochrane Syst Rev** 2001; 4: cd002750.

- 10-Hong JS, McGinty JF, Grimes L, Kanamatsu T, Obie J, Mitchell CL. Seizure-induced alterations in the metabolism of hippocampal opioid peptides suggest opioid modulation of seizure-related behaviors. *NIDA Reas Monogr* 1988;82: 48-66.
- 11- Tortella FC, Long JB, Hong JS, Holaday JW. Modulation of endogenous opioid system by eletroconvulsive shock. *Convuls Ther* 1989;5:261-73.
- 12- Rasmussen KG, Pandurangi AK. Naloxone fail to prolong seizure length in ECT. *J ECT* 1999; 15:258- 61.
- 13- Cottrell GA, Nyakas C, Bohus B. Hippocampal kindling-induced after-discharge and behavioural depression: immediate and long-term attenuation by opiate antagonists. *Eur J Pharmacol* 1988;150:1-8.
- 14- Becker A, Braun H, Schroder H, Grecksch G, Hollt V. Effects of enadoline on the development of pentylenetetrazol kindling, learning performance, and hippocampal morphology. *Brain Res*1999;823: 191-7.
- 15- Zhao D, Leung LS, Boon F, Cain DP. persistent physiological effects caused by a single pentylenetetrazol induced seizure in neonatal rats. *Dev Brain Res* 1994;80:190-8.
- 16- Khanna N, Bhalla S, Verma V, Sharma K. Modulatory effects of nifedipine and nimodopine in exerimental convulsions. *Indian J Pharmacol* 2000; 32: 347-52.
- 17 – Middlemiss SN, Spedding MA. A functional correlate for the dihydropyridine binding sites in rat brain. *Nature* 1985; 314:94-6.
- 18- Cain DP, Corcoran ME. Intracerebral beta-endorphin, met-enkephalin and morphin: kindling of seizures and handling-induced potentiation of epileptiform effects. *Life Sci* 1984;34:2535-42.
- 19- Przewlocki R, Lason W, Stach R, Kacz D. Opioid peptides, particularly dynorphin, after amygdaloid-kindling seizures. *Regul Pept* 1983;6:385-92.
- 20- Kato N, Highuchi T, Friesen HG, Wada JA. Changes of immunoreactive somatostatin and beta-endorphin content in rat brain after amygdaloid kindling. *Life Sci* 1983;32: 2415-22.
- 21- Grecksch G, Becker A, Schroeder H, Hollt V. Involvement of delta-opioid receptors in pentylenetetrazol kindling development and kindling-related processes in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999;360:151-6.
- 22- Erdtmann-Vourliotis M, Riechert U, Mayer P, Grecksch G, Hollte V. Pentylenetetrazol (PTZ)-induced c-fos expression in the hippocampus of kindled rats is suppressed by concomitant treatment with naloxone *Brain Res* 1998;792:299-308.
- 23- Geber U, Greene RW, Hass HL, Stevens DR. Characterization of inhibition mediated by adenosine in the

hippocampus of the rat in vitro. *J Physiol* 1989;417:567-78.

24- Henderson O. Electrophysiology analysis of opioid action in the central nervous system. *Br Med Bull* 1983;39: 59-64.

25- Duggan AW, North RA. Electrophysiology of the opioids. *Pharmacol Rev* 1984;35:219-81.

26- Lee HK, Dunwiddie T, Hoffer B. Electrophysiological interactions of enkephalins with neuronal activity in the hippocampus. II effects on interneurons excitability. *Brain Res* 1980;184:331-42.

27- Nicoll R, Medison D. The action of enkephalin on interneurons in the hippocampus. *Soc Neurosci Abstr* 1984;10:660.