مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۵، شمـاره‌ی ۱۰۹، خرداد و تیر ۱۳۹۶، صفـحات ۱۱ تا ۲۲

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]، دکتر 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 به‌عنوان یک کانابینوئید درونزاد مهم بر شاخص‌های تشنج‌های تونیک- کلونیک القا شده توسط پنتیلن تترازول (PTZ) بررسی کردیم.*

روش بررسی: *مطالعه روی موش‌های صحرایی‌نر نژاد ویستار (۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم) انجام شد. مدل تشنج تونیک- کلونیک با یک تزریق داخل صفاقی PTZ (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ایجاد و رفتارهای تشنجی به مدت ۳۰ دقیقه بررسی شد. تزریق داخل صفاقی 2-AG (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌صورت 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 ($P<۰/۰۵$)، 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 ($P<۰/۰۵$).*

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 (۲و ۱). 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 (۳و ۱). مدل‌های حیوانی صرع و تشنج کمک شایانی در دست یابی 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 (۵و 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 (۶و۵). 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 (۸و۷). ولی به دلیل محدویت‌های قانونی و اخلاقی در خصوص استفاده از مشتقات گیاه کانابیس (به دلیل طبقه‌بندی در خانواده‌ی مخدرها) هنور 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 کانابینیدیول (CBD) می‌تواند راهکار جدیدی در تشنج‌های مزمن و شدید باشد (۱۰و۹). هر چند مکانیسم دقیق اثر این گروه از فیتوکانابینوئیدها هنوز به‌صورت واضح مشخص نشده است اما به نظر می‌رسد بخشی از اثرها از طریق گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 و CB2 باشد، هرچند مسیرهای دیگری نیز پیشنهاد شده است (۱۱-۹).

سیستم اندوکانابینوئیدی به‌عنوان یک تعدیل گر 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 (۱۳و۱۲). 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 پیام رسانی داشته باشد (۱۴و 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 به‌صورت 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 ۲۲تا۲۵ 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 تا۱۰ 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 تترازول، از شرکت Sigma-Aldrich) یک بار با غلظت (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به شکل داخل

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 سانتی‌متر) قرار داده شد و رفتارهای حیوان برای مدت ۳۰ دقیقه تحت نظر قرار گرفت و بروز مراحل رفتاری تشنج یادداشت شد (۱۷و ۱۶).

تقسیم بندی مراحل تشنج (۱۹و 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 سنج 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 میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت محلول در Dimethyl Solfoxide (DMSO) (۹۹/۹ درصد Sigma-Aldrich,) به‌عنوان 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 میلی‌لیتر بود.

گروه‌های مورد آزمایش

- گروه کنترل (PTZ): یک تزریق PTZ با دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت 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 میلی‌لیتر) به صورت داخل صفاقی انجام شد. بعد از ۱۵ دقیقه تزریق PTZ با دوز ۸۰ میلی‌گرم 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 میلی‌گرم بر کیلوگرم) به شکل محلول در DMSO (غلظت ۹۹/۹ درصد و ۰/۸ میلی‌لیتر) به‌صورت داخل صفاقی انجام شد انجام شد. سپس ۱۵ دقیقه بعد تزریق PTZ با دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت 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. $P < ۰/۰۵$ شاخص معناداری قرار گرفت. داده‌ها به صورت Mean±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 مرحله‌ی 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 Bonfferoni مقایسه و تحلیل شد. نتایج نشان داد که DMSO بر زمان رسیدن به مراحل ۱ و ۲ تشنج موثر است، به‌طوری که زمان رسیدن به مرحله ۱ تشنج (S1L) (۴۴/۰±۵/۳ ثانیه) در گروه

(DMSO+PTZ) نسبت به گروه (PTZ) (۱۱/۹±۱/۲ ثانیه) به‌طور معناداری افزایش را نشان می‌دهد (P< ۰/۰۰۱ برای S1L)، همچنین زمان رسیدن به مرحله‌ی ۲ تشنج (S2L) (۹۸/۷±۱۸/۷ ثانیه) در گروه (DMSO+PTZ) نسبت به گروه (PTZ) (۳۲/۳±۴/۳ ثانیه) به‌طور معناداری افزایش یافته است (P< ۰/۰۵ برای S2L). با این وجود DMSO بر زمان رسیدن به مراحل ۳ تا ۵ و طول دوره این مراحل تاثیر معناداری نداشت (P>۰/۰۵).

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±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 A–۲). 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 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 B-۲). 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 C–۲). 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.

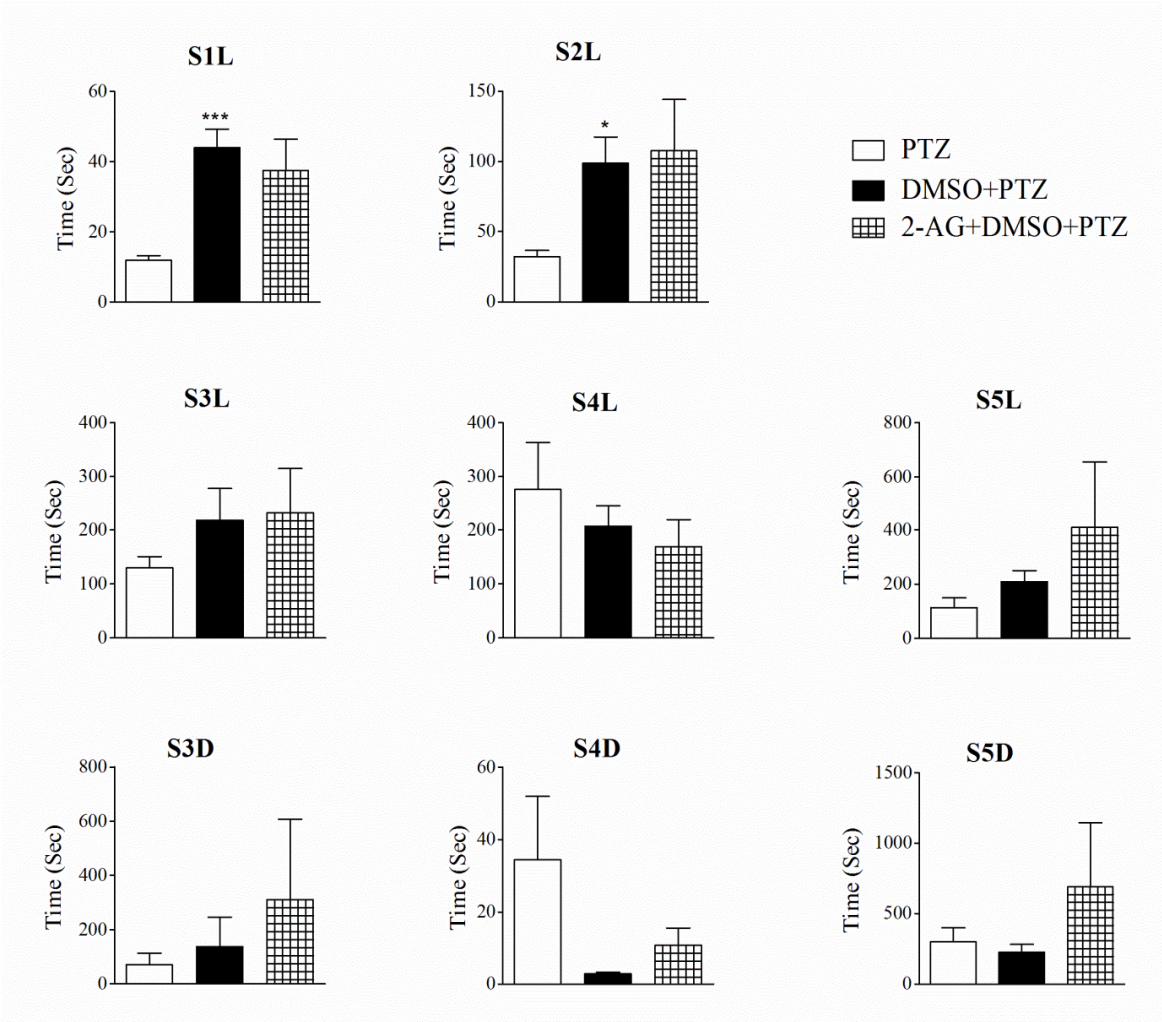
- تزریق 2-AG قبل از تزریق PTZ بروز مراحل تشنج را کاهش داد.

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) به‌ترتیب (۴/۲±۰/۳)، (۴/۸±۰/۲) و (۳/۵±۰/۵) 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< ۰/۰۵)، 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±SEM ارائه شده‌اند.

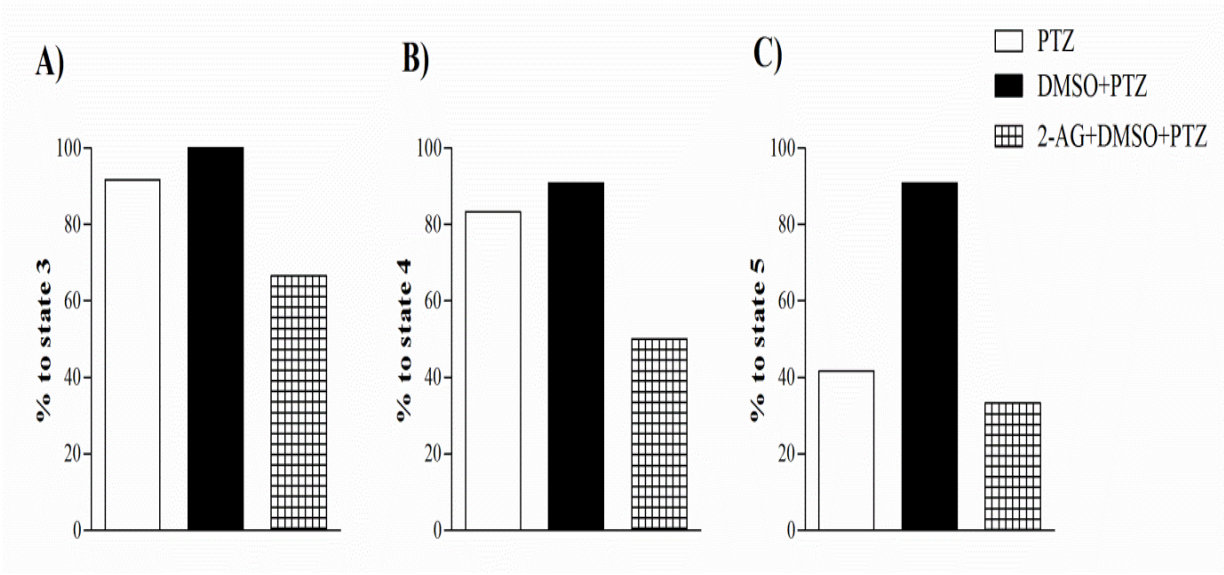
- تزریق 2-AG قبل از تزریق PTZ درصد مرگ ناشی از تشنج تونیک – کلونیک را کاهش داد.

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) به‌ترتیب (۳۳/۳ درصد)، (۹۰/۹ درصد) و (۱۶/۶ درصد) بود.

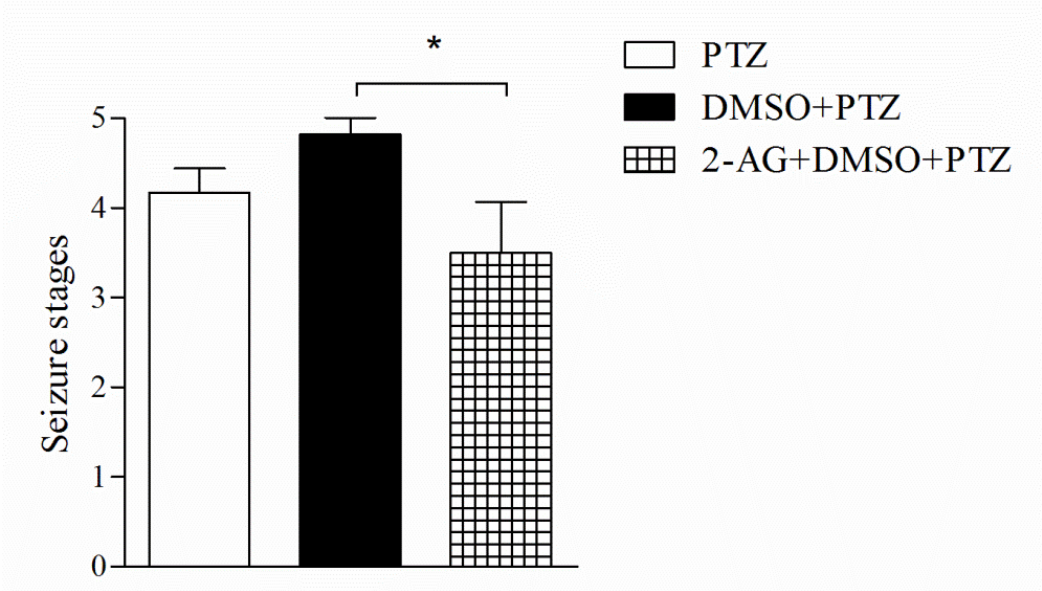
همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد میزان مرگ در گروه (2-AG+DMSO+PTZ) نسبت به گروه (DMSO+PTZ) کاهش یافته است (شکل ۴). تعداد نمونه‌ها در گروه PTZ برابر ۱۲ در گروه DMSO+PTZ برابر ۱۱ و در گروه 2-AG+DMSO+PTZ برابر ۶ می‌باشد.



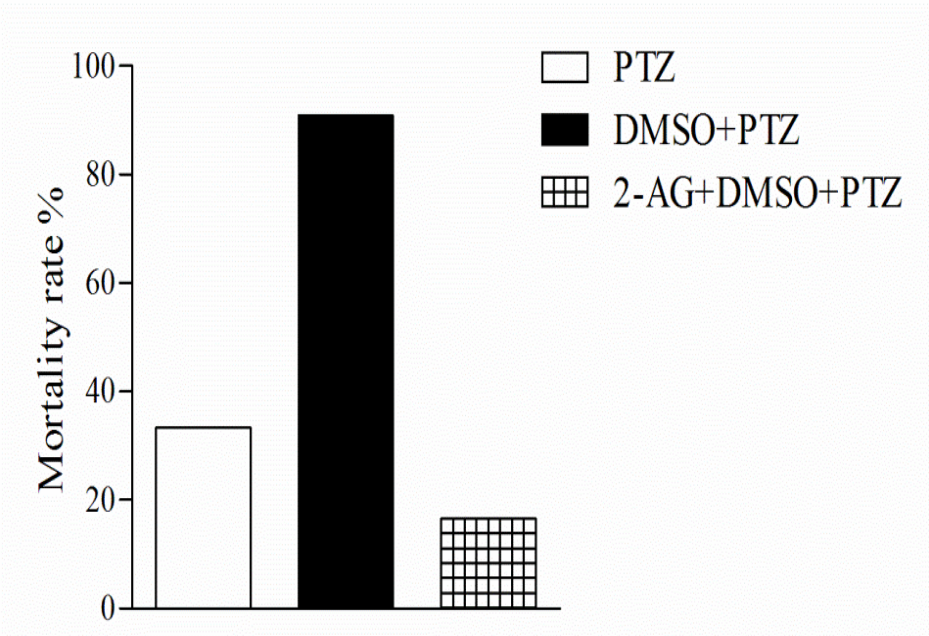
شکل ۱: تزریق 2-AG داخل صفاقی ۱۵ دقیقه قبل از تزریق PTZ تاثیر معناداری بر تاخیر بروز مراحل تشنجی و مدت زمان هر مرحله نداشت. مقایسه مدت زمان رسیدن به مراحل تشنج (Seizure Stage Letancy: S1L-S5L) و طول مدت هر مرحله (Seizure Stage Duration: S3D-S5D) بین گروه‌ها از طریق آزمون آماری One-way ANOVA و آزمون تکمیلی Bonfferoni نشان می‌دهد که زمان رسیدن به مراحل ۱ و ۲ تشنج در گروه (DMSO+PTZ) نسبت به گروه (PTZ) به‌طور معناداری افزایش یافته است (P< ۰/۰۱ برای S1L و P< ۰/۰۵ 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±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 می‌باشد.



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 می‌دهد که میانگین مرحله‌ی تشنجی بروز یافته در گروه (2-AG+DMSO+PTZ) به طور معناداری کمتر از گروه (DMSO+PTZ) است (P< ۰/۰۵). در حالی که بین گروه (DMSO+PTZ) و (PTZ) تفاوت معناداری وجود ندارد. داده‌ها به صورت Mean±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 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 ، به‌طور 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 گشترس 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 (۲۲و ۲۱و 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 (۲۳و ۳) بنابراین ممکن است 2-AG از طریق مسیرهایی 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 به‌صورت چشمگیری کاهش می یابد. در بین مراحل تشنجی این سه مرحله مراحل گسترش تشنج از کانون‌های تشنجزا به سراسر مغز و به عبارتی سراسری شدن تشنج‌های می‌باشد (۱۹و 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 (۹-۷). 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 درصد وقوع مراحل ۴ و ۵ تشنج تونیک- کلونیک را در هر دو مدل، به‌صورت معناداری کاهش دهد (۲۴). علی رغم تفاوت در روش ایجاد تشنج در مطالعه‌ی مذکور و مطالعه‌ی ما، کاهش درصد وقوع مراحل حمله‌های تونیک- کلونیک در دو مطالعه هم راستا می باشد. 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 به‌طور 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 به‌صورت 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 به‌عنوان 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 (۱۴و۱۳). 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 (۱۰و۹)، 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 به‌صورت 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 (۲۵و 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 متناقص با نتایج مطالعه‌ی ما می‌باشد. تفاوت در مدل حیوانی استفاده شده و استراتژی تجویز آنتاگونیست می‌تواند دلیل این تناقص 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 تناقص یافته‌ها ممکن است ناشی از اثر متفاوت دارو در تزریق حاد و مزمن آن باشد که در مطالعات بعدی باید مورد توجه قرار گیرد. در مطالعه‌ی دیگر (۲۳)، آنزیم سنتز کننده‌ی

2-AG در مدل تشنج با PTZ و در موش‌های ژنی مستعد برای تشنج به صورت فارماکولوژیک مهار شد که سبب بهبود شدت حمله‌های تشنجی و پارامترهای الکتروفیزیولوژیک شد. این گزارش با یافته‌های ما همخوانی دارد. همچنین بررسی‌های مرتبط نشان داده‌اند که تزریق مستقیم دی-پالمیتوئیل اتانول آمین به عنوان یک کاندید اندوکانابینوئیدی اثرات مثبت در مدل‌های حیوانی صرع و تشنج دارد (۲۷و۲۶) که هم راستا با نتایج ما موید قابلیت ضد تشنجی اندوکانابینوئیدها می‌باشند.

یافته‌ی جالب دیگر در مطالعه‌ی ما تاثیر حلال DMSO بر شاخص‌های تشنجی بود. برخی گزارش‌های اخیر نشان داده‌اند که DMSO به‌صورت وابسته به دوز می تواند پارامترهای الکتروفیزیولوژی را در مدل‌های حیوانی صرع دستخوش تغییر کند. این گزارش‌ها بیانگر کاهش تحریک پذیری الکتریکی و شاخص ثبت شده هستند و به همین دلیل اثرات ضدصرعی برای آن پیشنهاد شده است (۲۹و ۲۸). براساس نتایج ما DMSO بر شاخص‌های رفتاری تشنج ناشی از PTZ موثر است، هرچند تاخیر رسیدن به مرحله‌ی ۱ و ۲ را افزایش داد اما درصد وقوع مرحله ۵ تشنج و درصد مرگ ناشی از حمله تونیک- کلونیک را نیز بالا برد. دلیل این پدیده می‌تواند به مکانیسم‌های عصبی دخیل در بروز مراحل مختلف تشنج برگردد. اما روشن شدن مکانیسم‌های اثر DMSO بر نورون‌ها و مدارهای عصبی در بررسی‌های بعدی لازم است مورد توجه قرار گیرد. از جمله کمبودهای بررسی ما که لازم 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 می‌شود این بررسی در مدل‌های دیگر صرع و تشنج نظیر الکتروشوک، کیندلینگ و مدل‌های مقاوم به دارو مورد بررسی قرار گیرد. به دلیل محدویت‌های مطالعه بررسی دوزهای بالاتر و پایین‌تر 2-AG مقدور نشد که انجام آن در مطالعات بعدی لازم به نظر می‌رسد.

نتیجه گیری

به نظر می‌رسد 2-AG به‌عنوان یک لیگاند مهم در سیستم اندوکانابینوئیدی می‌تواند 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 کمیته‌ی اخلاق دانشگاه می‌باشد. نویسندگان این مقاله از داوران محترم به خاطر بررسی دقیق مقاله‌ی اولیه و نظرات ارزشمندی که سبب رفع ایرادات مقاله و راهگشای تحقیقات بعدی شد، قدردانی می‌کنند.

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 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. Cannabidivarin-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 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 pentyleneterazol induced epileptiform activity in mice. *J Zanjan 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 pentylenetetrazol _induced seizure in mice. *J Zanjan 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-Archidonyl Glycerol (2-AG) as an Endocannabinoid on Tonic- Clonic Seizures Induced by Pentylenetetrazol (PTZ)

Zareie P[1], Sadegh M[1], Palizvan MR[1]

[1]Dept. 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 solfoxide (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