بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم سیمین نامور آغداش رشته فیزیو لوژی رساله دکتری خود را با عنوان: بررسی نقش آنزیم فسفو دی استراز و بیان زیرواحد آلفای پروتئین های Gs و Gi و عوامل تنظیم کننده آنها در اثرات ضدتشنجی تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین در کیندلینگ مسیر پرفورنت در موش صحرایی

در تاریخ ۸۹/۵/۲۵ ارائه کردند. اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر سیدجواد میرنجفی زاده	
استاد مشاور	دکتر محمد جوان	
استاد ناظر	دکتر علیرضا مانی	
استاد ناظر	دکتر ابوالحسن احمدیانی	
استاد ناظر	دکتر محمد سیاح	۸۹/۵/۲۵
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر سعید سمنانیان	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **سیمین نامور** دانشجوی رشته **فیزیولوژی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۴** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

۸۹/۷/۵

امضا

تاریخ

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **فیزیولوزی** است که در سال **۱۳۸۹** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی آقای **دکتر جواد میر نجفی زاده** ، مشاوره **آقای دکتر محمد جوان** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **سیمین نامور** دانشجوی رشته **فیزیولوژی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

سیمین نامور

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا ۸۹/۷/۵

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته فیزیولوژی

عنوان

بررسی نقش آنزیم فسفو دی استراز و بیان زیر واحد آلفای پروتیین های G_s و G_i و عوامل تنظیم کننده آن ها در اثرات ضد تشنجی تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین در کیندلینگ مسیر پرفورنت در موش صحرایی

نگارش

سیمین نامور

استاد راهنما

دکتر جواد میر نجفی زاده

استاد مشاور

دکتر محمد جوان

تابستان ۱۳۸۹

تشکر و قدردانی

درآغازسخن برخودلازم می‌دانم اززحمات وراهنمائی‌های بی‌دریغ استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر سید جواد میر نجفی زاده، استاد مشاوره بزرگوارم آقای دکتر محمد جوان که همواره با رویی گشاده مرا از راهنمایی های خود بهره مند می ساخت و آقای دکتر علی رضا مانی که بزرگواری تمام مرا از راهنماییهای خود بهرمند می کردند همچنین از آقای دکتر فتح اللهی، آقای دکتر سمنانیان و آقای دکتر حاجی زاده تشکر و قدردانی می کنم. همچنین از همکلاسی های خوبم خانم ها زراعتی ، پورعبد الحسین، نوید حمیدی ، کوروش آرامی و آقای روهام پور و از هم آزمایشگاهی هایی خوبم به خصوص آقای شجاعی تشکر می کنم. از صبر و حوصله همسر عزیزم که بی شک از اوقات خوش زندگی اش در تمام مدت تحصیلم مایه گذاشت و همواره مشوقم بود خالصانه تشکر نمایم.

چکیده

تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (LFS) دارای اثرات ضد تشنجی است. یکی از مکانیسم های عمل LFS از طریق فعالیت نوروترانسمیتر هایی است که به پروتیین های G به خصوص به G_i جفت می شوند. بنابراین در این تحقیق تاثیر مهارگر آنزیم فسفودی استراز و نیز تغییر میزان بیان پروتیین G_i و G_s و پروتیین های تنظیم کننده آن ها، پروتیین های (RGS4، RGS10 و RGS2) به دنبال ایجاد اثرات ضد تشنجی LFS مورد بررسی قرار گرفت. حیوانات 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. LFS (۸ بسته با فرکانس ۱ هرتز، مدت هر پالس ۰/۱ میلی ثانیه و با شدت آستانه تحریکات کیندلینگ) هر روز پس از اتمام تحریکات کیندلینگ اعمال می شد. بعد از اتمام ثبت های الکتروفیزیولوژیک که به طور متوسط ۶ روز طول می کشید، از ناحیه شکنج دندانه دار نمونه برداری انجام شد. سپس به وسیله روش وسترن بلات تغییر بیان پروتیین های G_i، G_s و پروتیین های RGS4 و RGS10 (به عنوان تنظیم کننده های منفی G_i) و همچنین پروتیین RGS2 (به عنوان تنظیم کننده منفی پروتیین G_s) به دنبال تحریکات کیندلینگ و LFS مورد بررسی قرار گرفت. به علاوه تأثیر تزریق رولیپرام (مهار کننده فسفو دی استراز) بر اثرت ضد تشنجی LFS مورد بررسی قرار گرفت. اعمال LFS به مسیر پرفورنت به طور معنی داری روند کیندلینگ را به تأخیر انداخت و تعداد تحریکات لازم برای رسیدن به هر یک از مراحل مختلف تشنج را افزایش داد و مدت زمان امواج تخلیه های متعاقب را به طور بارزی کاهش داد. همچنین اعمال LFS از افزایش شیب پتانسیل های میدانی برانگیخته و دامنه اسپایک های تجمعی در طی کیندلینگ ممانعت کرد. علاو بر این، LFS از افزایش تضعیف زوج پالس اولیه و ثانویه توسط کیندلینگ جلوگیری کرد. تزریق داخل بطنی رولیپرام (آنتاگونیست آنزیم فسفو دی استراز) با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار، از اثرات مهاری LFS بر روند کیندلینگ ممانعت کرد. اعمال LFS پس از تحریکات کیندلینگ سبب کاهش بیان پروتیین های RGS4 و RGS10 شد ولی تغییری در بیان پروتیین های G_i و G_s به دنبال LFS مشاهده نشد. بیان پروتیین RGS2 نیز به دنبال کیندلینگ کاهش پیدا کرد. LFS احتمالاً با فعال نمودن آنزیم فسفو دی استراز و کاهش میزان cAMP بخشی از اثرات ضد تشنجی خود را اعمال می کند. در همین راستا احتمال داده می شود که یکی از مکانیسم های دخیل در ایجاد اثرات ضد تشنجی LFS افزایش مدت زمان فعالیت پروتیین G_i و کاهش مدت زمان فعالیت پروتیین G_s می باشد

واژگان کلیدی: تشنج، تحریک الکتریکی با فرکانس پایین ، فسفو دی استراز، cAMP، پروتیین های RGS، پروتیین های G، شکنج دندانه دار و کیندلینگ

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱
۱-۱- مقدمه ۲
۱-۲- صرع ٤
۱-۳- کیندلینگ ۵
۱-٤- تشکیلات هیپوکمپ ۷
۱-٤-۱- شکنج دندانه دار ۷
۱-٤-۲- شکنج دندانه دار و کیندلینگ ۸
۱-۵- درمان صرع ۸
۱-۵-۱- تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (LFS) ۹
۱-۵-۲- مکانیسم های احتمالی عمل صرع LFS ۱۰
۱-٦- پروتیین های G ۱۵
۱-۷- پروتیین های تنظیم کننده سیگنالینگ پروتیین های G ۱٦
۱-۷-۱- مکانیسم های عمل پروتیین های RGS ۱٦
۱-۷-۲- نقش پروتیین های RGS در فعالیت مغز ۱۸
۱-۸- هدف از تحقیق حاضر ۱۹
فصل دوم: مواد و روش ها ۲۰
۲-۱- آماده سازی مواد و وسایل لازم ۲۱
۲-۱-۱- تهیه الکترود ۲۱
۲-۱-۲- تهیه کانول ۲۲
۲-۲- جراحی حیوانات ۲۲
۲-۳- تحریک حیوان ۲۳
۲-۳-۱- نحوه تحریک حیوان ۲۳
۲-٤- کمیت های اندازه گیری شده ۲٤
۲-٤-۱- کمیت های تشنجی ۲٤

۲-٤-۲- کمیت های ثبت پتانسیل های میدانی ۲۵
۲-۵- تزریق دارو ۲۵
۲-۵-۱- داروی مورد استفاده ۲۵
۲-۵-۲- آماده سازی دارو ۲٦
۲-٦- تهیه نمونه شکنج دندانه دار ۲٦
۲-٦-۱- استخراج پروتیین از بافت شکنج دندانه دار ۲۷
۲-٦-۲- تعیین غلظت پروتیین به روش برادفورد ۲۷
۲-۷- ژل الکتروفورز SDS-PAGE ۲۸
۲-۸- ترانسفر یا ایمنوبلات ۳۱
۲-۸-۱- روش انجام ترانسفر ۳۱
۲-۹- مرحله Blocking ۳۳
۲-۱۰- مرحله انکوبه کردن با آنتی بادی اولیه ۳٤
۲-۱۰-۱- مرحله انکوبه کردن با آنتی بادی ثانویه ۳٤
۲- ۱۱- مرحله آشکارسازی ۳۵
۲-۱۱-۱- ظهور فیلم در تاریک خانه ۳۵
۳-۱۲- آزمایش ها ۳۵
۲-۱۳- روش تجزیه و تحلیل آماری ۳۷
فصل سوم: نتایج ۳۸
۳-۱- نتایج آزمایش اول ۳۹
۳-۱-۱- تأثیر تزریق Rolipram بر اثرات مهاری LFS در طی کیندلینگ ۳۹
۳-۱-۲- اثر رولیپرام در اعمال اثرات مهاری LFS بر تغییرات زوج پالس در طی کیندلینگ ٤۸
۳-۲- نتایج آزمایش دوم: اندازه گیری بیان پروتیین های $G\alpha_i$، $G\alpha_s$، RGS2، RGS4 و RGS10 به روش وسترن بلات ۵۳
فصل چهارم: بحث، نتیج گیری، پیشنهادات ۵۷
٤-۱- اثر LFS بر پاسخ های رفتاری و الکتروفیزیولوژیک ناشی از کیندلینگ مسیر پرفورنت ۵۸
٤-۲- نقش آنزیم فسفو دی استراز در ایجاد اثرات مهاری LFS بر پاسخ های رفتاری و الکتروفیزیوژیک ناشی از کیندلینگ مسیر پرفورنت ٦۲

٤-٣- نقش پروتیین G_i و پروتیین های RGS4 و RGS10 به عنوان تنظیم کننده های منفی آن و پروتیین G_s و RGS2 یه عنوان تنظیم کننده آن در اثرات ضد تشنجی LFS ٦٣
٤-٤- نتیجه گیری ٦٩
٤-٥- پیشنهادها ٧٠
فهرست منابع ٧١

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱) تصویر شماتیک برش عرضی تشکیلات هیپوکمپ و ارتباط بین نواحی مختلف آن ٦
شکل ۲-۱) نمونه ثبت پتانسیل های میدانی از ناحیه شکنج دندانه دار ۲۵
شکل ۲-۲) دستگاه الکتروفورز A) تانک و اتصلات B) صفحات شیشه ای و شانه ها C) guide برای قرار دادن نمونه ها D) نگهدارنده صفحات شیشه ای ۳۰
شکل ۲-۳) انتقال پروتیین از ژل تا آشکارسازی در فیلم رادیوگرافی ۳۲
شکل ۲-٤) نحوه گیری اجزای ساندویج انتقال و همین طور جهت گذاشتن آن بین دو الکترود ۳۳
شکل ۲-۵) پروتکل مورد استفاده برای بررسی اثر LFS در طی روند ایجاد کیندلینگ ۳۷
شکل ۳-۱) مراحل رفتاری تشنج در طی کیندلینگ..... ٤۱
شکل ۳-۲) اعمال تحریکات کیندلینگ در گروه گروه کیندل..... ٤۲
شکل ۳-۳) تزریق رولیپرام بر پتانسیل های میدانی ٤۳
شکل ۳-٤) مراحل رفتاری تشنج در طی روند کیندلینگ ٤٤
شکل ۳-۵) نزریق رولیپرام با غلظت ۰/۲۵ میکرومولار ٤٦
شکل ۳-٦) تاثیر رولیپرام بر اثرات مهاری LFS بر پتانسیل های میدانی..... ٤۷
شکل ۳-۷) مقادیر شاخص زوج پالس در گروه کیندل ٤۹
شکل ۳-۸) درصد تغییرات در شاخص زوج پالس ۵۰
شکل ۳-۹) مقادیر زوج پالس در گروه KLFS ۵۱
شکل ۳-۱۰) در صد تغییرات در شاخص زوج پالس ۵۲
شکل ۳-۱۱) تغییر بیان پروتیین های Gi و Gs ۵٤
شکل ۳-۱۲) تغییر بیان پروتیین های RGS4 وRGS10 ..... ۵۵
شکل ۳-۱۳) تغییر بیان پروتیین RGS2 ..... ۵٦
شکل ٤-۱) نمایش ارتباط بین اثرات تشنجی LFS بر مدل کیتدلینگ و تاثیر پروتیین G و RGS بر این روند ٦۸

فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. مقدمه

صرع[1] مجموعه ای از اختلالات نورولوژیکی مزمن می‌باشد که بیش از ۱ درصد جمعیت جهان از آن رنج می‌برند [۳-۱]. صرع لوب گیجگاهی[2] یکی از شایع‌ترین اختلالات صرعی در بالغین است. این نوع صرع، با تخلیه هایی که از ساختار های لوب گیجگاهی شروع می‌شود، مشخص می‌گردد. به دنبال آن اغلب نواحی مغز را تحت تأثیر قرار داده و در نهایت تبدیل به تشنج عمومی می‌شود [۶]. برای مطالعه صرع لوب گیجگاهی و فهم فرایند های دخیل در ایجاد آن، از مدل های حیوانی نظیر کیندلینگ الکتریکی استفاده می شود [۴] در کیندلینگ به دنبال تحریک الکتریکی روزانه نواحی ویژه‌ای از مغز قدامی، با شدت پایین و زیر آستانه تشنج‌های رفتاری و الکتروگرافیک پیشرونده ایجاد می‌شود [۱۰-۸]. بر اساس عامل تحریک، کیندلینگ به دو نوع اصلی الکتریکی و شیمیایی تقسیم می‌شود [۱۱]. در مدل کیندلینگ الکتریکی سریع، که توسط Lothman ابداع شد به کار بردن تحریکات مکرر می‌تواند تشنج‌هایی ایجاد کند که فقط چند دقیقه از هم فاصله دارند. این پروتکل تحریکی هر ۵ دقیقه یک بار اعمال می‌شود [۱۲]. یکی از نواحی رایج در ایجاد صرع لوب گیجگاهی ناحیه شکنج دندانه دار در تشکیلات هیپوکمپ است [۱۶ و۱۵]. علی رغم استفاده از داروهای ضد صرعی، تقریبا" ٪۳۰ بیماران از صرع مقاوم به درمان رنج

[1] - Epilepsy
[2] - Temporal lobe epilepsy

می‌برند [۲۴]. در این بیماران، بافت صرعی بوسیله جراحی برداشته می‌شود ولی به علت عوارض جانبی زیاد آن، محققین به دنبال یافتن درمان جایگزین دیگر هستند [۲۵ و ۲۴].

یک نوع روش پیشنهادی برای صرع مقاوم به دارو، تحریک الکتریکی مستقیم ناحیه صرعی می-باشد [۱۱]. در استفاده از این روش، دو مسأله مهم باید در نظر گرفته شود اول این که کدام ساختارهای مغزی باید تحریک شوند واین که چه ویژگی هایی از محرک (از قبیل فرکانس وشدت و ...) مؤثر هستند [۱۱]. امروزه سعی می‌کنند که در درمان صرع مقاوم به دارو، از تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین[۱] (LFS) استفاده کنند. به نظر می‌رسد که مکانیسم ضد تشنجی LFS مشابه با مکانیسم‌های دخیل در ایجاد تضعیف طولانی مدت (LTD) و یا تضعیف پس از تقویت[۲] باشد [۳۱ و ۲۴].

مطالعات فارماکولوژیکی نشان داده است که در این دو نوع شکل پذیری سیناپسی نوروترانسمیتر ها و گیرنده های مختلفی نقش دارند. نوترانسمیتر هایی مانند آدنوزین، گلوتامات، گابا، دوپامین و گالانین نقش مهمی در اثرات مهاری LFS دارند [۳۴،۴۰، ۴۹ و۵۲]. گیرنده های تمام نوروترانسمیترهای دخیل در اثرات مهاری تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین به پروتیین های G جفت می شوند. پروتیین‌های G را براساس تشابه ساختاری و عملکردی زیرواحدهای α به چهار خانواده تقسیم می‌کنند [۵۳]. G_s که گیرنده‌ها را به صورت تحریکی به آدنیلات سیکلاز جفت کرده و سبب فعال شدن آدنیلات سیکلازمی شود. $G_{i/o}$ به طور مهاری به آدنیلات سیکلاز جفت می شود. در نهایت این زیر واحدها سبب تغییر در سطح cAMP داخل سلولی می شوند [۵۳]. تنظیم سرعت سیگتالینگ پروتیین های G توسط انواع مختلفی از پروتیین ها صورت می گیرد. یکی از مهمترین انواع این پروتیین ها، " پروتیین های تنظیم کننده سیگنالینگ پروتیین های G [۳] (RGS) نامیده می شوند [۵۴]. بررسی توزیع یبان این پروتیین ها نشان دداده است که حداقل ۱۰ نوع RGS با تراکم بالا در مغز بیان می شوند. تعدادی از این پروتیین ها در

[1]- Low frequency stimulation
[2] - Depotentiation
[3]- Regulatory of G proteins signaling–

هیپوکمپ به طور متراکمی بیان می شوند [۵۵]. RGS2 به میزان زیادی در مغز بیان می‌شود. این پروتیین آدنیلات سیکلاز را مهار کرده ومیزان cAMP را در داخل سلول پایین نگه می‌دارد علاوه بر این، احتمال دارد که فعالیت GTpase پروتیین $G_{\alpha s}$ را افزایش دهد. پروتیین RGS2 به مقدار زیادی در هیپوکمپ بیان می‌شود [۵۸]. RGS4 نیز که به عنوان فعال کننده فعالیت GTpase چندین عضو زیرواحدهای $G_{\alpha i}$ عمل کرده و از مهار آدنیلات سیکلاز جلوگیری می‌کند، نیز به میزان زیادی در هیپوکمپ بیان می‌شود [۵۹]. RGS10 به طور متراکمی در سلول های گرانولی Dentate gyrus بیان می‌شود. فعالیت این پروتیین ها نیز فعالیت GTpase $G_{i/o}$ را افزایش می‌دهد و در نهایت میزان cAMP را بالا نگه می‌دارد [۶۰].

بنابراین در این تحقیق تأثیر فعالیت آنزیم فسفو دی استراز (به عنوان مهمترین کنترل کننده میزان cAMP داخل سلولی) و میزان بیان پروتیین های RGS2، RGS4 و RGS10 و همچنین تغییر بیان زیر واحد آلفای پروتیین های G_i و G_s به دنبال اهمال تحریکات الکتریکی کیندلینگ و تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین مورد مطالعه قرار گرفت.

۱-۲. صرع

صرع مجموعه ای از اختلالات نورولوژیکی مزمن می‌باشد که بیش از ۱ درصد جمعیت جهان از آن رنج می‌برند. این اختلال با تخلیه های ناگهانی و همزمان مجموعه ای از نورون ها مشخص می‌گردد [۱-۳]. واژه epilepsy از کلمه یونانی Epilambanien به معنای حمله گرفته شده است [۴].

انجمن بین المللی مقابله با صرع[1] در سال ۱۹۸۱ یک تقسیم بندی کلی برای تشنج ها مطرح کرد. در این تقسیم بندی تشنج ها در دو گروه کلی موضعی و عمومی قرار داده می شوند. صرع موضعی از ناحیه مشخصی در مغز شروع می شود و به دو نوع ساده و پیچیده تقسیم می شود [۵].

[1]- International League Against Epilepsy

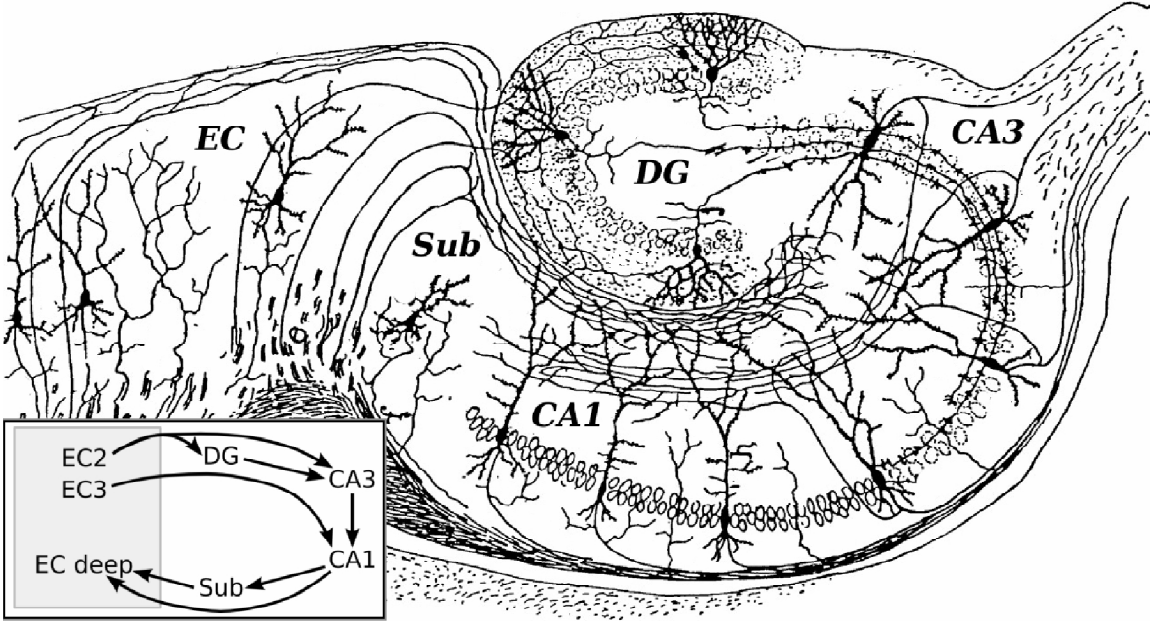
در صرع موضعی ساده فرد احساس های غیر عادی مرتبط با ناحیه درگیر در مغز به نام اورا[1] را تجربه می کند ولی هوشیاری خود را از دست نمی دهد. در صرع موضعی پیچیده سطح هوشیاری پایین می آید اما فرد به ندرت اورا را تجربه می کند [۵]. صرع لوب گیجگاهی که از نوع تشنج موضعی پیچیده است، یکی از شایع‌ترین اختلالات صرعی در بالغین است. این نوع صرع، با تخلیه هایی که از ساختار های لوب گیجگاهی شروع می‌شود، مشخص می‌گردد. به دنبال آن اغلب نواحی مغز را تحت تأثیر قرار داده و در نهایت تبدیل به تشنج عمومی می‌شود [۶]. حساسیت قسمت های مختلف لوب گیجگاهی به صرع متفاوت است. در ۲۵٪ موارد کانون صرع در تشکیلات هیپوکمپ می باشد. برای مطالعه صرع لوب گیجگاهی و فهم فرایند های دخیل در ایجاد آن، از مدل های حیوانی نظیر کیندلینگ الکتریکی استفاده می شود [۷].

۱-۳. کیندلینگ

در کیندلینگ به دنبال تحریک الکتریکی روزانه نواحی ویژه‌ای از مغز قدامی، با شدت پایین و زیر آستانه تشنج‌های رفتاری و الکتروگرافیک پیشرونده ایجاد می‌شود. این تغییرات را به علت شباهت آن به شعله ور شدن آتش کیندلینگ[2] نام گذاری کردند [۱۰-۸]. بر اساس عامل تحریک، کیندلینگ به دو نوع اصلی الکتریکی و شیمیایی تقسیم می‌شود [۱۱]. در مدل کیندلینگ الکتریکی سریع، که توسط Lothman ابداع شد به کار بردن تحریکات مکرر می‌تواند تشنج‌هایی ایجاد کند که فقط چند دقیقه از هم فاصله دارند. این پروتکل تحریکی هر ۵ دقیقه یک بار اعمال می‌شود [۱۲].

[1]- aura

[2]- Kindling



شکل ۱-۱- تصویر شماتیک برش عرضی تشکیلات هیپوکمپ و ارتباط بین نواحی مختلف آن. DG=Dentate gyrus, Sub= Subiculum, EC= Entorhinal cortex

Racine پیشرفت روند تشنجی را در کیندلینگ به ۵ مرحله تقسیم کرد: ۱- مرحله یک: انقباضات عضلانی صورت،[1] ۲- مرحله دوم: حرکت دادن سر به بالا و پایین،[2] ۳- مرحله سوم: کلونوس اندام جلویی،[3]۴- مرحله چهارم: ایستادن روی دو پا همراه با بالا بردن اندام جلویی[4] و ۵- مرحله پنجم: ایستادن روی هر دو پا همراه با از دست دادن تعادل[5] [۱۳]. به علت این که تشکیلات هیپوکمپ و شکنج دندانه دار از نواحی رایج در ایجاد صرع لوب گیجگاهی است، بنابراین این نواحی به طور وسیعی در کیندلینگ مورد مطالعه قرار گرفته اند.

[1]- Facial clonus

[2]- Head nodding

[3]- Forelimb clonus

[4]- Forelimb clonus

[5]- Rearing and falling

۱-۴. تشکیلات هیپوکمپ

تشکیلات هیپوکمپ[1] شامل مجموعه ای از نواحی نوروآناتومیکی متفاوت است که در کنار هم قرار گرفته‌اند. همانطور که در شکل ۱-۱ نشان داده شده است، این نواحی شامل شکنج دندانه‌دار، هیپوکمپ، پره‌سابیکولوم، سابیکولوم و پاراسابیکولوم می باشند [۱۴].

۱- ۴- ۱. شکنج دندانه دار

شکنج دندانه‌دار[2] از سه لایه تشکیل شده است. ۱) لایه ملکولی که سطحی‌ترین لایه است و تقریباً لایه بدون سلول می باشد (۲). لایه اصلی، لایه گرانولی است که در عمق لایه ملکولی واقع شده و به اندازه ۴-۸ سلول گرانولی ضخامت دارد (۳). لایه پلی‌مورفیک لایه سوم شکنج دندانه دار می‌باشد و توسط دو لایه فوق احاطه می‌شود [۱۴].

شکنج دندانه‌دار ورودی اصلی خود را از قشر انتورینال و از طریق مسیر پرفورنت[3] دریافت می‌کند [۱۴]. این مسیر از لایه دوم قشر انتورینال منشأ می‌گیرد و در لایه ملکولی شکنج دندانه‌دار ختم می‌شود و در آنجا، سیناپس های نامتقارن و تحریکی با خارهای دندریتی سلول های گرانولی و همچنین با تعدادی از اینترنورون های مهاری تشکیل می‌دهند [۱۴].

یکی از نواحی که درایجاد تشنج موضعی پیچیده و در تبدیل آن به تشنج عمومی در گیر می‌باشد، تشکیلات هیپوکمپ است. در این ناحیه فعالیت الکتریکی غیر طبیعی و همزمانی در درون بخشی از نورون ها به وجود آمده و منجر به ایجاد صرع می‌شود. این ناحیه از سیستم لیمبیک به طور وسیعی در کیندلینگ مورد مطالعه قرار گرفته‌است. برای فهم فرایندهای ایجاد و یا حفظ شرایط نورولوژیکی صرع، از مدل های حیوانی نظیر کیندلینگ، (که مدلی از صرع لوب گیجگاهی است) استفاده می‌کنند [۷].

---

[1]- Hippocampal formation

[2]- Dentate gyrous

[3]- Perforant Pathway

۱-۴-۲. شکنج دندانه دار و کیندلینگ

شکنج دندانه دار نقش مهمی در صرع لوب گیجگاهی دارد و یکی از نواحی حساس برای ایجاد کیندلینگ است [۱۶ و ۱۵]. کیندلینگ سبب تقویت مدارهای مهاری و تحریکی در شکنج دندانه دار می شود [۲۰-۱۷]. برای مثال نشان داده شده است که کیندلینگ شیب پتانسیل های میدانی و دامنه اسپایک های تجمعی را افزایش می دهد [۲۲ و ۲۱]. علاوه بر این، کیندلینگ در شکنج دندانه دار تضعیف اولیه زوج پالس و تضعیف تاخیری زوج پالس را تقویت می کند، که ممکن است ناشی از تقویت در انتقال سیناپس های نورون های مهاری باشد. کیندلینگ تسهیل زوج پالس را نیز در این ناحیه کاهش می دهد [۲۳]. ایجاد صرع به وسیله مدل‌های مختلف، امکان دستیابی به روش‌های جدید و موثر را در درمان صرع امکان پذیر می‌سازد.

۱-۵- درمان صرع

علی رغم استفاده از داروهای ضد صرعی، تقریبا" ٪۳۰ بیماران از صرع مقاوم به درمان رنج می‌برند [۲۴]. در این بیماران، بافت صرعی بوسیله جراحی برداشته می‌شود ولی به علت عوارض جانبی زیاد آن، محققین به دنبال یافتن درمان جایگزین دیگر هستند [۲۵ و ۲۴]. یک نوع روش پیشنهادی برای صرع مقاوم به دارو، تحریک الکتریکی مستقیم ناحیه صرعی می‌باشد [۱۱]. استفاده از تحریک الکتریکی مستقیم مغز، برای تعدیل فعالیت آن از سال ۱۸۷۰ مورد استفاده قرار گرفته است، زمانی که مشاهده شد تحریک الکتریکی قشر حرکتی، در سگ‌ها سبب حرکت اندام ها می‌شود. امروزه تحریک الکتریکی عمقی مغز در درمان اختلالات مغزی مقاوم به درمان از قبیل درد مزمن، بیماری پارکینسون و دیس تونیا مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۶ و ۱۱].

برای اولین بار برای درمان این اختلالات از تحریک الکتریکی با فرکانس بالا استفاده شد. با این روش، اثرات درمانی مشابه درمانهای جراحی دیده شد ولی عوارض جانبی درمان‌های فوق را نیز نداشت