١١١٤٠٦

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین
دانشکده پزشکی شهید بابایی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای پزشکی عمومی

موضوع:

بررسی اثرات ضدتشنجی کینین به روش پنتیلن‌تترازول در موش

استاد راهنما:

دکتر مرجان نصیری اصل

۱۳۸۸/۲/۱۱

استاد مشاور:

دکتر فرزانه زمان سلطانی

نگارش:

بهنام ترابی‌نژاد

شماره پایان نامه: ۷۶۲

سال تحصیلی: ۱۳۸۷-۱۳۸۶

تایپ و صفحه‌آرایی نگار- ساکتی ۰۹۱۲۱۸۲۷۵۲۵

۱۱۱۴۰۶

فهرست مطالب

عنوان صفحه

چکیده

فصل اول: مقدمه و بیان مسئله

مقدمه ۲

فصل دوم: بررسی متون و مروری بر مقالات

مروری بر متون ۳۹

فصل سوم: مواد و روش‌ها

مواد و روش‌ها ۴۴

فصل چهارم: یافته‌ها و نتایج

یافته‌ها ۴۷

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

بحث و نتیجه نهایی ۵۰

فهرست منابع ۵۲

چکیده ۵۹

تقدیر و تشکر

بر خود لازم می‌دانم از **سرکار دکتر مرجان نصیری اصل** که همواره در طول تحقیق در راهنمایی‌های ارزنده ایشان کمال استفاده را برده‌ام، تشکر و قدردانی نمایم.

****

همچنین از زحمات‌وتلاش‌های **سرکار خانم دکتر فرزانه زمان‌سلطانی** در ارائه هرچه بهتر این پایان نامه تقدیر می‌نمایم.

تقدیم به:

مادر عزیزم

که هرچه هستم همه از اوست،

و هرگز ذره‌ای از عشق او برایم قابل جبران نیست.

چکیده فارسی

زمینه: با توجه به مطالعات انجام شده در سال های اخیر، اثرات ضد تشنجی کینین به عنوان مهارکننده اختصاصی کانال های Gap Junctions ، در مطالعات ثبت خارج و داخل سلولی در برش های مغزی مطرح شده است. دراین مطالعه اثرات ضد تشنجی آن، به روش پنتیلن تترازول بر روی موش مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه اثرات ضد تشنجی با استفاده از آزمون تشنجی پنتیلن تترازول بر روی ۹۰ موش نر و در گروه های ۱۰ تایی مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش کینین و دیازپام (کنترل مثبت) و نرمال سالین به صورت داخل صفاقی و به ترتیب با دوزهای ۱۰-۷۰ mg/kg و ۰/۵-۱ mg/kg و ۱۰ ml/kg به موش ها تزریق گردیده و پس از ۳۰ دقیقه، پنتیلن تترازول ۹۰mg/kg به صورت داخل صفاقی به موش های مذکور تزریق گردیده و سپس زمان شروع تشنج و مدت زمان تشنج کلونیک مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: کینین در دوز ۶۰ mg/kg به طور معنی داری موجب تاخیر در زمان شروع تشنج و مدت زمان تشنج کلونیک در مقایسه با کنترل شد. کینین در دوزهای ۴۰-۷۰mg/kg توانست تنها مدت زمان تشنج را در مقایسه با کنترل به صورت معنی داری کاهش دهد. درصد محافظت در برابر تشنج و درصد محافظت در برابر مرگ و میر با افزایش دوز دارو تا ۶۰ mg/kg، افزایش یافت.

نتیجه گیری: از نتایج بدست آمده درخصوص اثرات ضد تشنجی کینین این احتمال وجود دارد که این دارو بتواند در درمان صرع کوچک سودمند باشد و احتمالا بخشی از اثرات آن به تاثیر بر کانال های gap junction بر می گردد. مطالعات بیشتر به منظور روشن شدن مکانیسم اثر این دارو ضرورت دارد.

فصل اول:

مقدمه و بیان مسئله

۱- مقدمه(Introduction)

۱) مفهوم سیناپس- ناحیهٔ خاصی از یک نرون، که با نرون دیگر ارتباط پیدا می‌کند. این توصیف نخستین‌بار با مطالعه بافت‌شناسی از طریق میکروسکوپ نوری مطرح گردید (۱)-(kandel ER et al 2000).

۱-۲) انواع سیناپس

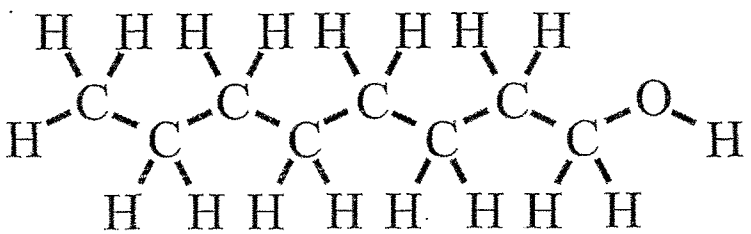
بعد از پیشرفت در تکنیک‌های الکتروفیزیولوژی در دههٔ ۱۹۵۰ و ۱۹۶۰ دو نوع انتقال برای ناقلین شیمیایی مشخص گردید. با وجود آن که در اغلب سیناپس‌ها، سیناپس شیمیایی وجود دارد، ولی در تعدادی از سیناپس‌ها تنها، سیناپس الکتریکی وجود دارد. بعد از ایجاد پیشرفت در دیدن با میکروسکوپ الکترونی، تفاوت‌های ساختمانی در دو نوع سیناپس مشخص گردید. در سیناپس شیمیایی، نرون‌ها توسط یک فضای کوچک، به نام شکاف سیناپسی (Synaptic cleft) جدا می‌گردند و هیچ گونه ارتباطی میان سیتوپلاسم یک سلول، با سلول مجاور وجود ندارد. حال آن که در سیناپس‌های الکتریکی سیتوپلاسم دو سلول مجاور، با کمک کانال‌های gap junction با یکدیگر ارتباط برقرار می‌کنند. در جدول ۱-۱ خصوصیات مهم این دو نوع سیناپس، خلاصه شده است (۱)(kandel ER et al-2000).

جدول ۱-۱: مقایسهٔ خصوصیات سیناپس‌های الکتریکی و شیمیایی (۱)(kandel ER et al-2000) .

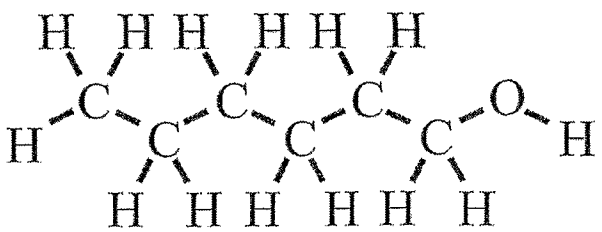
	سیناپس الکتریکی	سیناپس شیمیایی
فاصلهٔ میان غشاء پیش‌سیناپسی و پس‌سیناپسی	۳/۵ نانومتر	۴۰-۲۰ نانومتر
ارتباط سیتوپلاسمی میان سلول های پیش‌سیناپسی و پس‌سیناپسی	ارتباط وجود دارد	ارتباط وجود ندارد
اجزاء اختصاصی	کانال‌های gap junction	پیش‌سیناپس: وزیکول‌ها و نقاط فعال پس‌سیناپس: گیرنده ها
ماده انتقالی	جریان یون	ناقل شیمیایی
تأخیر سیناپسی	وجود ندارد	معمولاً ۵-۱ میلی‌ثانیه می‌باشد (حداقل ۰/۳ میلی‌ثانیه)

۱-۳) عوامل مهارکنندهٔ کانال‌های gap junction (۲)(Sirivanis M et al-2003)

۱-۳-۱) الکل‌های با زنجیرهٔ طولانی نظیر هپتانل و اکتانل

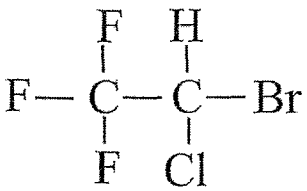


اکتانل

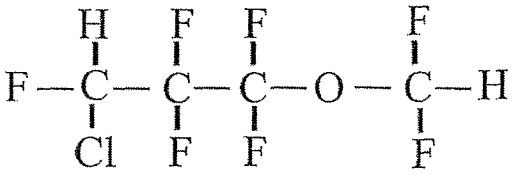


هپتانل

۱-۳-۲) گازهای بیهوشی نظیر هالوتان و اتران (ethrane)

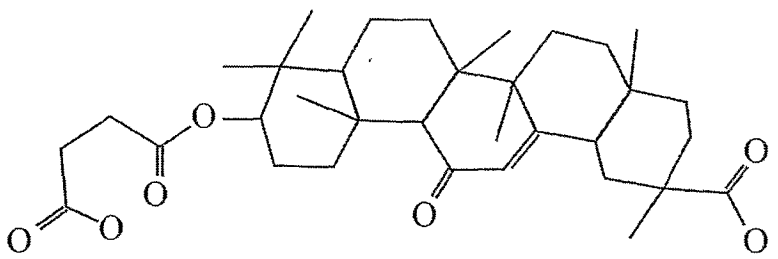


هالوتان



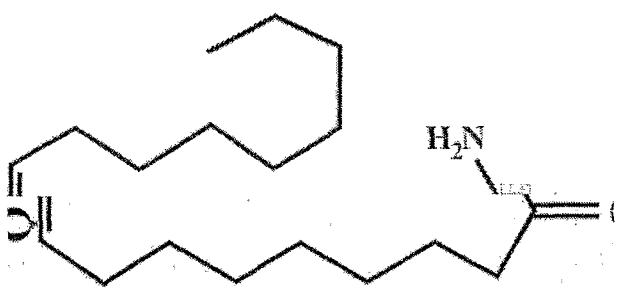
اتران

۱-۳-۳) مشتقات گلیسریتینیک اسید نظیر کربنوکسولون



کربنوکسولون

۱-۳-٤) اولئامید (Oleamide) که یک اندوکانابینوئید (endocannabinoid) می‌باشد.

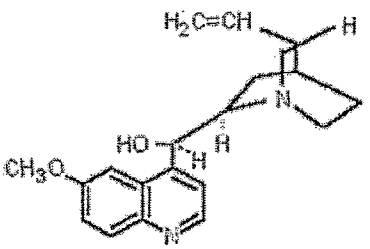


۱-۳-۵) مشتقات آمینو سولفونات نظیر تارین (taurine)

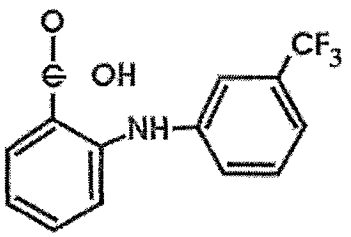
NH2-CH2-CH2-SO3H

۱-۳-٦) یون‌های ترا الکیل آمونیوم نظیر تتراپنتیل آمونیوم ($TpeA^+$)

۱-۳-۷) کینین



۱-۳-۸) فنامات ها نظیر فلوفنامیک اسید



۱-٤) Gap junctions چیست؟

Gap junctions مناطق اختصاصی از غشاهای سلولی که ارتباط میان سلول های همسایه را برقرار می‌کنند. Gap junctions ها از کانال‌های پروتئینی تشکیل شده‌اند که اجازهٔ عبور یون‌ها و مولکول‌های کوچک (وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰۰ دالتون) را میان سلول ها، به صورت غیر فعال می‌دهد (شکل ۱-۱). این کانال‌ها ارتباط میان سلول ها را به منظور برقراری تعادل برای یون‌های تنظیم کنندهٔ حیاتی و مولکول‌های کوچک (نظیر کلسیم و cAMP و گلوتاتیون)، نظیر مواد پیش‌ساز ماکرومولکول (آمینو اسیدها، قندها، نوکلئوئیدها) فراهم می‌کنند (۳)(Kumar MN-1996).

۱-۵) کانال‌های gap junction و ویژگی کلی آنها

واژه کانال‌های gap junction نخستین بار توسط آقایان Revel و Karnovsky، با مطالعه بر روی ساختمان میان سلول‌های قلب و کبد موش در سال ۱۹٦۷ مطرح گردید (٤)(Revel JP et al-2000). به دنبال آن کشف آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای پروتئین‌های کانال‌های gap junction و همچنین کلونینگ مولکول‌های این کانکسین‌ها صورت گرفت.

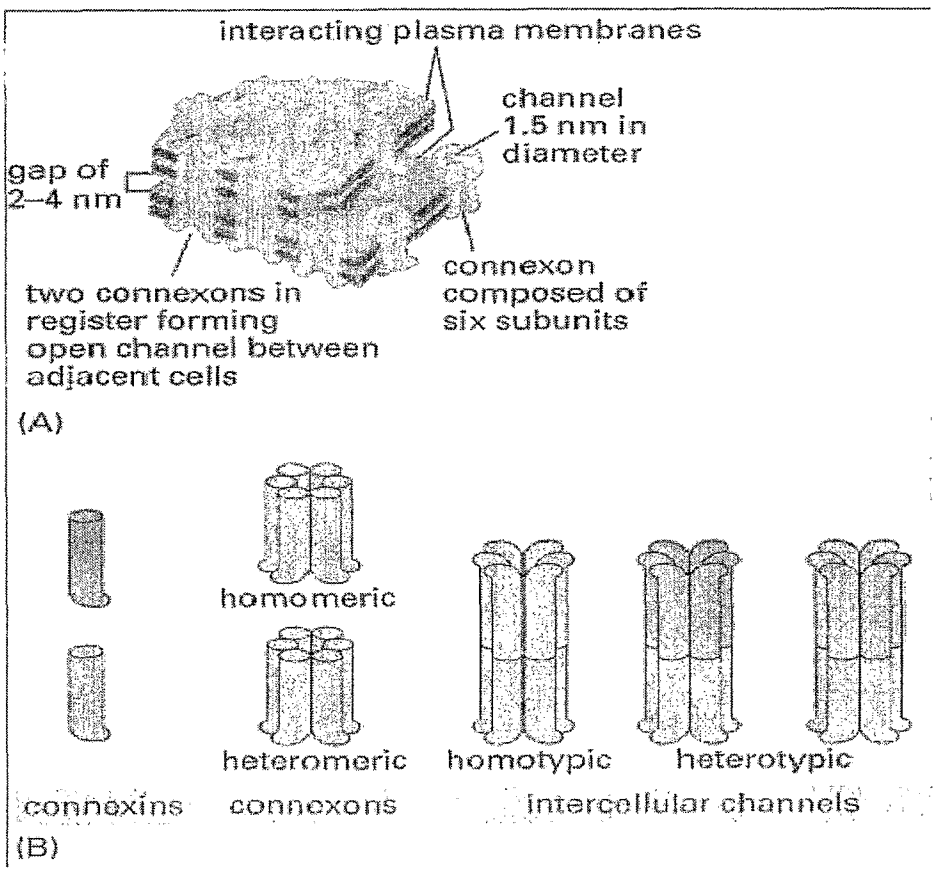
امروزه با وجود تکنیک‌های مختلف انواع این کانال‌ها در بافت‌های مختلف، از جمله مغز مشخص گردیده‌اند و مطالعات فیزیولوژیکی برای یافتن تغییرات ناشی از موتاسیون‌ها در بیماری‌های ژنتیکی مختلف صورت گرفته است (۵)(Rozental R et al-2000).

کانال‌های gap junction در انواع مختلفی از سلول‌های پستانداران یافت می‌شوند که البته چند استثناء وجود دارد. در اریتروسیت‌های در حال گردش و اسپرماتوزوئیدها وجود ندارند. از طریق این کانال‌ها، تبادل مستقیم یون‌ها ، متابولیت‌ها و پیامبرهای ثانویه نظیر (Ca^{+2}, IP_3, cAMP, ATP) میان

نرون‌ها صورت می‌گیرد. تبادل چنین مولکول‌های پیامبر میان سلول‌های گلیال یا میان نرون‌ها و سلول‌های گلیال، مسیرهای کوتاه مدت و طولانی مدت انتقال پیام را در مغز فراهم می‌سازد(٦-Spary DC et al 1998).

خانواده کانکسین‌ها کاملاً همولوگ هستند و در حدود ۵۰٪ از توالی آمینواسیدهای شناخته شده یکسان بوده و از الگوی متنوع توزیع در بافت‌ها تبعیت می‌کنند.

یک سلول می‌تواند بیش از یک نوع کانکسین را از نظر ژنتیکی بیان کند. علاوه بر این کانکسون‌ها (همی‌کانال‌ها) ممکن است به صورت‌های زیر باشند:



شکل ۱-۱: کانال‌های gap junction به صورت مجموعه‌ای از کانال‌های بین سلولی بوده که از ۱۲

جزء (پروتئین‌های کانکسین) تشکیل شده است. هر شش کانکسین، یک کانکسون یا همی کانال را تشکیل می‌دهد که ارتباط میان سلول‌های کوپل شده به یکدیگر را برقرار می‌سازد (۷) (Albert B et al 2004).

در یک سلول تحریک پذیر، این کانال ها به عنوان یک سیناپس الکتریکی، توانایی انتقال سریع ایمپالس‌های الکتریکی را میان سلول ها فراهم می سازند. این کانال در هماهنگ سازی فعالیت الکتریکی (و افزایش جریان) در عضلات صاف قلبی و جریان های خروجی نرونی حائز اهمیت می باشند. همچنین این کانال‌های دارای توانایی در انتقال سریع اطلاعات میان نرون های پیش سیناپسی و پس سیناپسی در رفتارهای گریزی نظیر حرکت سریع دم در Cray Fish می باشند. از سوی دیگر ایجاد این هماهنگی در هنگام اگزوسیتوز در سلولهای اندوکرین نظیر جزایر لانگرهانس به چشم می خورد.

این کانال ها در ایجاد شرایط بافری غلظت پتاسیم خارج سلولی در مغز دخالت دارند: بدنبال فعالیت نرونی و افزایش پتاسیم خارج سلولی، پتاسیم از طریق برداشت سلول گلیال از محیط برداشته شده و سپس از طریق انتقال آن از راه کانال های gap junction از یک سلول گلیال به سلول دیگر، سرانجام به سوی مویرگ ها هدایت می گردد.

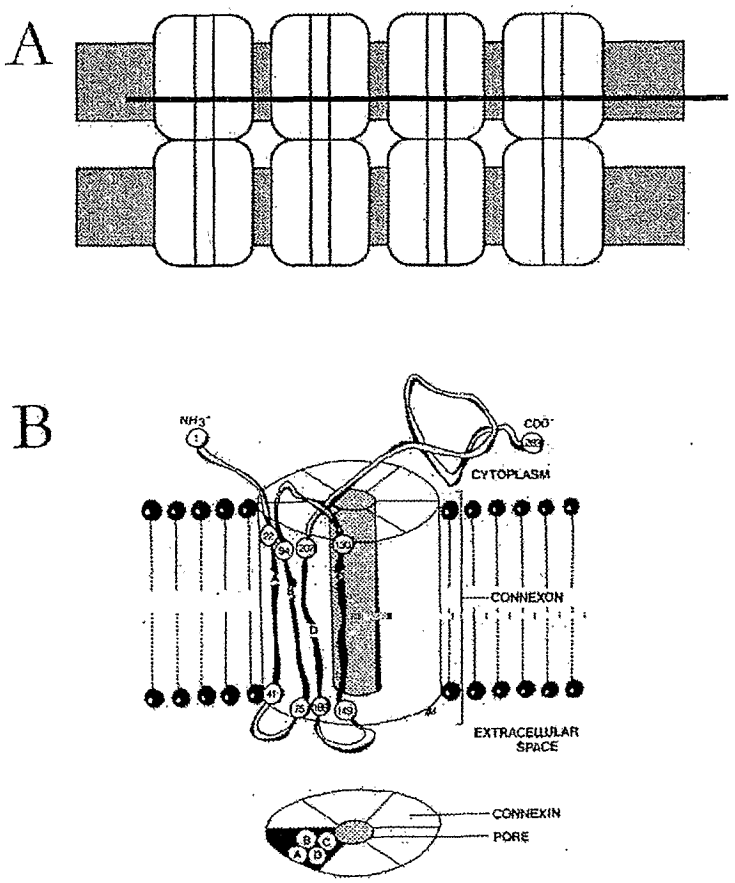
همچنین کانال های gap junction، نقش مهمی را در کنترل رشد سلولی، تمایز و رشد جنینی بر عهده دارند (۸)(Warner AE et al-1984).

با توجه به عملکردهای مختلف این کانال ها، شگفت آور نخواهد بود که موتاسیون در ژن های مربوط به پروتئین های این کانال ها سبب بیماری ها مختلف نظیر نروپاتی محیطی، رشد غیر طبیعی قلب و ناشنوایی مادرزادی می گردد.

۱-٦) تنوع مولکولی کانال های gap junction

در پستانداران پروتئین‌های gap junction توسط ۱۳ ژن کلون شده ساخته می‌شود (۹، ۱۰)-9) (10-Heafliger JA et al-1992)(Beyer EC-1993 و انتظار می‌رود دست کم تعداد کمتری از ژن‌ها به این مجموعه اضافه گردد.

به طور کلی هر gap junction از دو کانال یکسان (کانکسون) تشکیل شده‌اند که هر کانال در یک سلول قرار دارد. هر کانال یکسان (همی کانال) شامل هگزامری از کانکسین بوده و در کانکسین ترمینال کربوکسیل و آمین در ناحیهٔ سیتوپلاسمیک سلول واقع بوده و هر مولکول کانکسین از ٤ دامین پیچ خورده α-هلیکس عبور کرده از غشاء، تشکیل شده است (۱۱)(Dermatizel R et al-1990) (شکل ۱-۲). بخش عبوری هر کانکسین از غشاء از چهار قطعه M1 ، M2 ، M3 و M4 تشکیل شده است و هر دو دامین آمینی (NT domain) و کربوکسیلی (CT domain) در بخش سیتوپلاسمی کانال واقع است. لوپ‌های خارج سلولی C_1 و C_2 از نظر ساختمانی با سه سیستئین در هر لوپ همراه می‌باشد که در تمام ۱۲ کانکسین شناخته شده این وضعیت مشخص شده است (۱۱)(Dermatizel R et al 1990) . چهار دامین عبور کرده از غشاء با حروف بزرگ مشخص شده‌اند. دامینC عبور کرده از غشاء به دلیل آن که ماهیت آمفی فاتیک دارد، در خط مرزی منفذ کانال قرار دارد. ترمینال کربوکسی و آمینی کانکسین در ناحیه سیتوپلاسمیک غشاء پلاسمایی قرار دارد (۱۲) (Dermatizel R-1998)



شکل ۱-۲: نمایش شماتیک از همی کانال‌های جفت شده (A) از تجمع gap junction. (B) تصویر توپولوژیکی از یک مولکول کانکسین در غشاء پلاسمایی. قسمت پائین شکل (B) نمایش مقطع عرضی کانال همراه با قرارگیری کانکسین‌های هگزامر را در اطراف منفذ کانال نمایش می‌دهد (۱۲) (Dermatizel R-1998).

در توالی ژنی کانکسین‌ها بیشترین هومولوژی در مورد اعضاء ژن‌های آن، مربوط به نواحی پیچ خورده غشاء و لوپ خارج سلولی است و هومولوژی لوپ خارج سلولی توجیه کننده این است که چرا همی‌کانال‌های تشکیل شده در بسیاری از انواع کانکسین‌ها توانایی جفت شدن با یکدیگر را دارند.

تا کنون، ۱۵ کانکسین در جوندگان شناسایی شده است که احتمالاً این تعداد کانکسین در انسان هم وجود دارد. در پستانداران:

گروه I (β) از کانکسین‌ها شامل : Cx26 ، Cx30 ، Cx30.3 ، Cx31 ، Cx31.1 و Cx32 .

گروه II (α) از کانکسین‌ها شامل : Cx33 ، Cx37، Cx40 ، Cx43، Cx45 ، Cx46 ، Cx50 و Cx57 که اخیراً مطرح شده است (۱۳)(Manthey D et al-1999).

علاوه بر این Cx36 به عنوان جدیدترین نوع کانکسین در مغز پستانداران شناسایی شده است و به عنوان گروه جدید کانکسین‌ها به صورت گروه III (γ) مطرح شده است (۱٤) (Condorelli DF et al 1999).

تمام پروتئین‌های مربوط به کانکسین‌ها به استثناء Cx36 توسط یک خانواده از ژن‌ها که دارای یک ساختمان مشترک هستند، کد می‌گردند. تمام کانکسین‌ها، از جمله Cx36 از نظر توپولوژی غشایی شبیه یکدیگر هستند.

۸ کانکسین در مغز بیان ژنی داشته که با استفاده از آنتی بادی یا پروب‌های RNA شناخته شده‌اند (۱۵)(Dermatizel R-1993) (جدول ۱-۲).

جدول ۱-۲: انواع mRNAs مربوط به کانکسین بیان شده در سیستم عصبی پستانداران، کانکسین‌ها بر اساس وزن مولکولی پروتئینی که توسط cDNA کد می‌گردد، نامگذاری شده‌اند (۱۲) (Dermatizel R-1998).

RNA کبد (Cx32،Cx26) ، RNA قلب (Cx40، Cx45، Cx43) ، RNA ریه (Cx37).

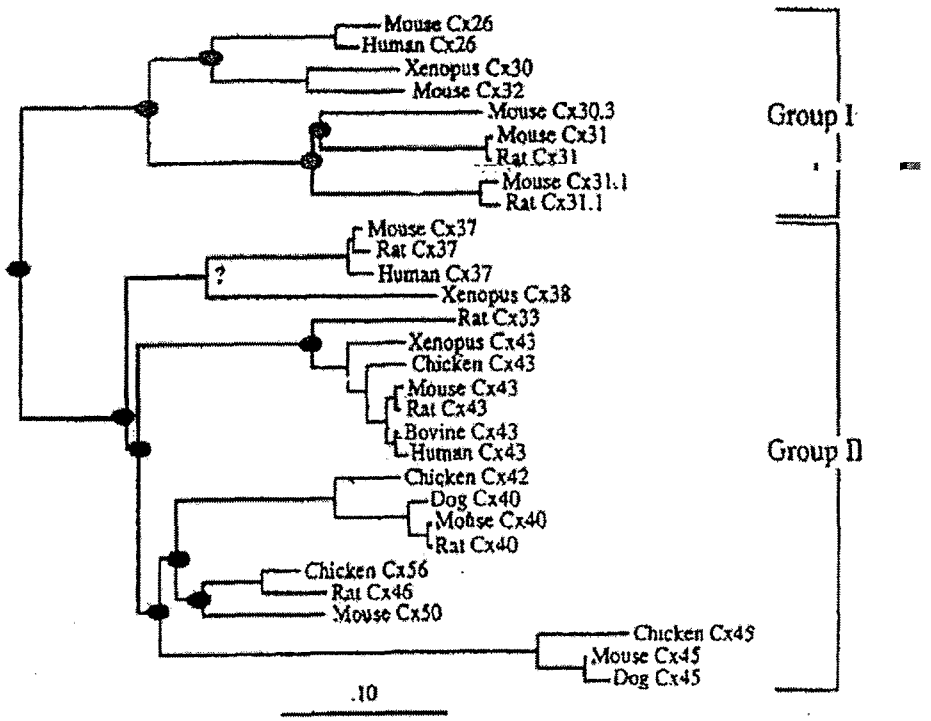
a: در محیط کشت استروسیت‌ها یافت شده‌اند.

b: Cx30 به مقدار زیاد در تمام قسمت‌های مغز هموژن شده بیان می‌شود.

	Cortex	Cerebellum	Hippocampus	Brain Stem	Spinal Cord
Cx32	+	+	+	+ +	+ + +
Cx26	+	+ +	+	+	+
Cx43	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
Cx40	0/+	+	0/+	0/+	0/+
Cx45	+/0	+ +	+	+/0	+/0
Cx37	+	+	+	+	+
Cx33	0	0	0	0	0
Cx46[a]	0	0	0	0	0
Cx50	0	0	0	0	0
Cx30[b]					

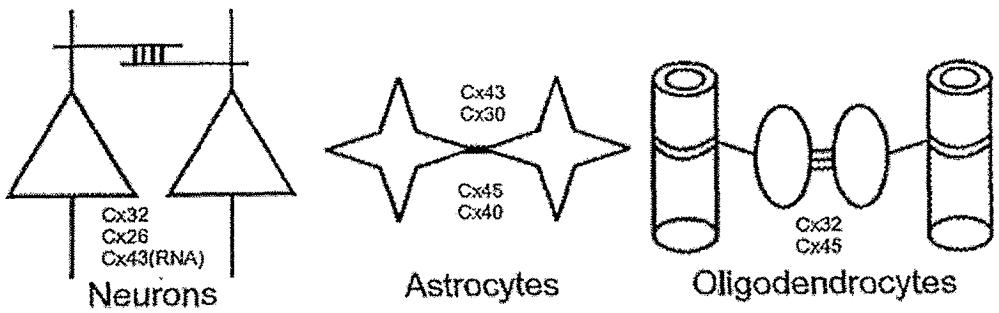
نواحی بیان ژنی نشانگر تنوع سلولی و در عین حال همراه با همپوشانی این نواحی است (جدول ۱-۲). از مقایسه توالی‌های پروتئین یا DNA دو دسته مجزا در کانکسین‌ها را می‌توان تمایز داد که هر گروه به طور تقریبی در ارتباط با سایر اعضاء گروه دیگر می‌باشد.

از وجود دو دسته از کانکسین‌ها به پیدایش یک دوپلیکاسیون ژنی در تکامل اولیه کانال‌های gap junction می‌توان پی برد. گروه I یا خانواده β از دسته کانکسین‌ها که همولوژی بسیاری به Cx32 کبدی دارند.گروهII یا خانوادهٔ α که درجه بالاتری از همولوژی را نسبت به Cx43 قلبی‌دارند(شکل ۱-۳).



شکل ۱-۳: درخت خانوادگی کانکسین از طریق مقایسه تفاوت در توالی‌ها، دایره‌های سیاه‌رنگ در هر شاخه نشانگر دوپلیکاسیون ژنی است. بار کالیبراسیون ۱۰ درصد تفاوت را در توالی نشان می‌دهد (۱۲) (Dermatizel R-1998).

بیان ژنی کانکسین‌های مغزی در شکل ۱-۳ نشان داده شده است. این پروفایل به وضوح نشانگر آن است که یک کانکسین توسط بیش از یک نوع سلول بیان شده و علاوه بر این یک نوع سلول می‌تواند طیف وسیعی از کانکسین‌های مختلف را بیان ژنی کند.



شکل ۱-٤: بیان ژنی کانکسین‌های اختصاصی سلول در بافت‌های مغزی. دیاگرام تصویر کانکسین‌های بیان شده در سلول‌های عصبی و گلیال (۱۲)(Dermatize! R-1998) .

پیچیدگی این کانال‌ها به مقدار زیادی وابسته به ترتیب و ترکیب همی کانال ها در سطح سلولی برمی‌گردد. اوgین پیچیدگی آن است که کانال‌های gap junction می‌تواند هموتاتیپ باشند، مثلاً توسط همی کانال‌های یکسان تشکیل شده باشند یا هتروتاتیپ باشند و توسط همی کانال های با انواع مختلف یا از سلول های مختلف بوجود آمده باشند.

درون دامین اختصاصی gap junction نسبت اختصاصی بودن همی کانال ها به تجمع کامل این کانال‌ها بر می‌گردد که می‌تواند این تجمع متفاوت باشد، بنابراین قدرت کوپلینگ یا وابستگی به ولتاژ و ... را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد.

مسئله دیگر در خصوص ترکیب همی کانال‌ها است که می‌توانند هومومر یا هترومر باشند، به عنوان مثال از یک یا انواع مختلف کانکسین‌ها تشکیل شده باشند (۱٦)(Stauffer KA-1995).

با مطالعه روی cDNAs مربوط به کانکسین‌های مختلف به نظر می‌آید که تعدادی از کانکسین‌ها با یکدیگر به صورت اختصاصی جفت می‌شوند. به عبارت دیگر قادر به جفت شدن برای تشکیل همی‌کانال‌ها با سایر کانکسین‌ها برای تشکیل کانال‌های عملکردی هتروتایپ نیستند. به عنوان مثال