



دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته فیزیولوژی جانوری

عنوان موضوع

بررسی تاثیر مینو سایکلین بر تشنجات ناشی از کیندلینگ آمیگدال در موش صحرائی

نگارش

سیدمهدی بهشتی نصر

اساتید راهنما:

دکتر علی مقیمی

دکتر محمد محمدزاده

شهریور ماه 1390



تقدیم بہ :

بارگاہ ملکوتی آقا علی بن موسی الرضا (ع)

تقدیم به پدر و مادرم

که اگر چه نبودند اما یقیناً دعای خیرشان، همواره همراه من بود

و

همسر صبور و مهربانم

تقدیر و تشکر از:

مدیر گروه محترم زیست‌شناسی، اساتید محترم گروه

و همکاری و مساعدت

جناب آقای دکتر علی مقیمی

تقدیر و تشکر از:

جناب آقای دکتر محمود حسینی

سپاس فراوان از معاونت آموزشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار و معاونت پژوهشی

جناب آقای دکتر پیمان

و در نهایت از استاد دکتر اقدار، صبور و دوست داشتنی جناب آقای دکتر محمد محمدزاده مرازر، نمودهای موثر خود

بهره‌مند نمودند.

چکیده

مینوسایکلین یک آنتی بیوتیک از خانواده تتراسایکلین است؛ که علاوه بر خاصیت ضد میکروبی دارای ویژگی ضد التهابی، ضد آپوپتوز و آنتی اکسیدانی است. مینوسایکلین می تواند از سد خونی-مغزی عبور کرده و علاوه بر کاهش التهاب فعالیت سلول های مغزی را تحت تاثیر قرار دهد. در این رابطه نشان داده شده است که مینوسایکلین مهار کننده فعالیت و تکثیر میکروگلیا ها و آستروسیت هاست. در این تحقیق نقش مینوسایکلین بر تشنجات ناشی از کیندلینگ الکتریکی آمیگدال مورد بررسی قرار گرفت. پنج گروه از حیوانات پس از جراحی استرئوتاکسیک و یک هفته دوره بهبودی با تحریکات روزانه آمیگدال (دو بار با فاصله زمانی شش ساعت) کیندل شدند. به گروه های یک تا سه پس از کیندل شدن به ترتیب دوزهای 12/5، 25 و 50 میلی گرم به ازای یک کیلوگرم وزن حیوان مینوسایکلین به صورت داخل صفاقی (60 دقیقه قبل از تحریکات) تزریق شد. گروه چهارم روزانه سالیین (1 ml/kg) و گروه پنجم مینوسایکلین با دوز 25 mg/kg مشابه گروه چهارم دریافت می کردند. در دو گروه مذکور پس از اعمال تحریکات کیندلینگ کمیت های تشنجی ثبت می شدند. در گروه های دوم و سوم (دوز 25 و 50 میلی گرم مینوسایکلین به ازای یک کیلوگرم وزن حیوان) یک ساعت پس از تزریق مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (ADD) نسبت به سالیین بطور معنی داری کاهش یافت. در هر سه دوز مذکور مینوسایکلین کاهش معنی داری در مدت زمان مرحله پنجم تشنج (Stage 5 duration; S₅D) در هر دو زمان 1 و 24 ساعت پس از تزریق مشاهده شد. تنها در گروه 3 (50 mg/kg) مدت زمان تشنج (SD) و مدت زمان تأخیری تا شروع مرحله چهار (S₄L)، یک ساعت پس از تزریق به ترتیب به طور معنی داری کاهش و افزایش نشان داد. در گروه پنجم، تزریق 10 روزه مینوسایکلین (25 mg/kg) توانست ADD تجمعی، SD تجمعی را نسبت به گروه کنترل (گروه چهارم) به طور معنی داری کاهش داده و تعداد تحریکات لازم برای بروز مراحل سوم تا پنجم تشنج را به طور معنی داری افزایش دهد. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش (کاهش ADD، SD و S₅D و افزایش S₄L پس از تزریق مینوسایکلین)، پیشنهاد می شود که مینوسایکلین اثر ضد تشنجی در مدل کیندلینگ آمیگدال دارد.

کلمات کلیدی: تشنج، مینوسایکلین، کیندلینگ، آمیگدال

فهرست مطالب

1	فصل اول: مقدمه
2	مقدمه
4	فصل دوم: مروری بر مطالعات گذشته
5	1-2-1 صرع
6	1-1-2 تقسیم بندی انواع صرع
7	2-1-2 مکانیسم ایجاد صرع
9	3-1-2 آناتومی عملکردی صرع لیمبیک
9	4-1-2 مدل‌های آزمایشگاهی ایجاد صرع
10	2-2-2 کیندلینگ
11	1-2-2 تاریخچه
11	2-2-2 انواع کیندلینگ
12	3-2-2 ویژگی پدیده کیندلینگ
15	4-2-2 رابطه بین کیندلینگ و صرع در انسان
16	3-2-3 مکانیسم‌های اساسی کیندلینگ بر اساس مطالعات انجام شده
16	4-2-4 آمیگدال
17	1-4-2 ساختار تشریحی آمیگدال
18	2-4-2 نقش آمیگدال در فرایند تشنج
19	3-4-2 نقش آمیگدال در کیندلینگ

20 5-2 التهاب نورونی
20 1-5-2 سایتوکاین‌ها
23 2-5-2 سایتوکایتها، التهاب و تشنج
23 6-2 مینوسایکلین
24 1-6-2 اثرات ضد التهابی مینوسایکلین
24 2-6-2 اثرات ضد تشنجی مینوسایکلین
25 3-6-2 مکانیسم اثر تشنجی مینوسایکلین
26 4-6-2 کاربرد دارویی مینوسایکلین
26 1-4-6-2 عوارض جانبی
27 فصل سوم: مواد و روش‌ها
28 1-3 آماده سازی مواد و وسایل
28 1-1-3 آماده سازی الکتروود
29 2-1-3 تهیه و آماده سازی دارو
30 2-3 جراحی حیوانات
31 3-3 موج تحریکی
32 4-3 ثبت کمیت‌های تشنجی
37 5-3 مراحل آزمایش
37 1-5-3 بررسی اثر مینوسایکلین در موش‌های کیندل شده
38 2-5-3 بررسی اثر مینوسایکلین بر فعالیت حرکتی و تعادلی

39	3-5-3 بررسی اثر مینوسایکلین بر روند پیشرفت تشنجات ناشی از کیندلینگ آمیگدال
39	3-6 تایید بافت شناسی
40	3-7 روش تجزیه و تحلیل اطلاعات
41	فصل چهارم: نتایج
42	4-1 نمایش محل قرارگیری الکتروود
43	4-2 نتایج آزمایش اول
51	4-3 نتایج آزمایش دوم
53	4-4 نتایج آزمایش سوم
56	فصل پنجم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادات
57	5-1 بحث و بررسی
64	5-2 نتیجه‌گیری
65	5-3 پیشنهادات
66	منابع و مراجع

جداول

جدول 1-2 تقسیم‌بندی انواع صرع 7

جدول 1-4 اثر تزریق داخل صفاقی مینوسایکلین بر مدت زمان تاخیری تا شروع مراحل 1 تا 3 51

جدول 2-4 اثر تزریق دوز 50 mg/kg مینوسایکلین روی مدت زمان حفظ تعادل 52

جدول 3-4 اثر تزریق دوز 25 mg/kg مینوسایکلین روی مدت زمان حفظ تعادل 52

اشکال

- شکل 1-2 نقشه آناتومی عملکردی صرع و مسیرهای انتقال آن 21
- شکل 2-2 ساختار شماتیک شیمیایی مینوسایکلین 24
- شکل 1-3 وسایل لازم جهت تهیه الکتروود 29
- شکل 2-3 نمایش چگونگی کنترل پوشش تفلونی به وسیله اهم‌متر 30
- شکل 3-3 مراحل جراحی حیوان جهت کارگذاری الکتروود 33
- شکل 4-3 نحوه اتصال دستگاه تحریک کننده و ثبات به سر حیوان 34
- شکل 5-3 مراحل مختلف تشنج 35
- شکل 6-3 نمونه‌ای از ثبت امواج تخلیه متعاقب از آمیگدال 36
- شکل 7-3 پروتوکل زمانی آغاز جراحی تا زمان کیندل شدن حیوان در گروه‌های کیندلینگ 38
- شکل 7-3 پروتوکل زمانی آغاز جراحی تا زمان کیندل شدن حیوان در گروه‌های روند 40
- شکل 1-4 طرح شماتیک گرفته شده از اطلس پاکسینوز و واتسون نشان دهنده موقعیت نوک الکتروود در هسته قاعده‌ای - جانبی آمیگدال 42
- شکل 2-4 اثر تزریق داخل صفاقی مینوسایکلین بر مدت زمان امواج تخلیه متعاقب آمیگدال 44
- شکل 3-4 اثر تزریق داخل صفاقی مینوسایکلین بر عکس زمان تاخیری تا شروع مرحله چهارم 47
- شکل 4-4 اثر تزریق داخل صفاقی مینوسایکلین بر مدت زمان مرحله پنجم تشنج 49
- شکل 5-4 اثر تزریق داخل صفاقی مینوسایکلین بر مدت زمان تشنج 50
- شکل 6-4 اثر تزریق روزانه مینوسایکلین بر مدت زمان امواج تخلیه متعاقب تجمعی 53
- شکل 7-4 اثر تزریق روزانه مینوسایکلین بر مدت زمان تشنج تجمعی 54
- شکل 8-4 تاثیر مینوسایکلین بر بروز مراحل رفتاری تشنجی طی روند کیندلینگ آمیگدال 55

فصل اول

مقدمه

صرع¹ یکی از اختلالات رایج عصبی است که دانش بشری در مورد مکانیسم‌های ایجاد و درمان قطعی آن هنوز ناقص است. از اینرو با استفاده از مدل‌های آزمایشگاهی ایجاد تشنج، مطالعات فراوانی در حال انجام است.

یکی از مدل‌های رایج تشنج، کیندلینگ است که در آن با تحریک مکرر ناحیه خاصی از مغز در حیوانات آزمایشگاهی تشنج ایجاد می‌شود. به کمک این مدل آزمایشگاهی می‌توان نحوه ارتباط بین نواحی مختلف مغزی را بررسی کرد، و نقش داروها و مواد شیمیایی مختلف را بر تشنج ایجاد شده در یک ناحیه مشخص مورد بحث قرار گیرد.

کیندلینگ بهترین مدل برای ایجاد تشنجات موضعی پیچیده می‌باشد [1]؛ که، شایعترین نوع تشنجات در انسان است [2, 3]. در تشنج‌های موضعی پیچیده، منشأ ایجاد تشنج معمولاً لوب گیجگاهی و سیستم لیمبیک است [4, 5]. آمیگدال یکی از نواحی سیستم لیمبیک است، که در ایجاد صرع لوب گیجگاهی دخالت دارد [6]. همچنین آمیگدال بعنوان یکی از مراکز حساس مغز برای ایجاد تشنج به روش کیندلینگ معرفی شده است [4, 7].

با وجود تحقیقات گسترده در زمینه صرع و تشنج در حدود 75 درصد موارد، دلایل ایجاد تشنج روشن نیست [8]. اما مشخص شده است که سایتوکاین‌ها در حین تشنج از میکروگلیاها و آستروسیت‌ها آزاد می‌شوند [9]. در همین رابطه مشاهده شده است که در طی حملات صرعی در مغز جوندگان سیگنال‌های التهاب‌زا همچون سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و پروستاگلاندین‌ها افزایش می‌یابد [10]. سایتوکاین‌ها رابط بین سیستم عصبی و سیستم ایمنی هستند [11-14]. نورون‌ها، گلیاها و لنفوسیت‌ها گیرنده‌های بسیار زیادی برای انواع سایتوکاین‌ها دارند [12, 13, 15].

تولید بیش از حد سایتوکاین‌ها منجر به اثرات نورو توکسیک بر سلول‌های عصبی شده و باعث القاء تشنج می‌شود [16-18]. با توجه به اثرات تشنج‌زایی سایتوکاین‌ها، عواملی که تولید سایتوکاین‌ها را کاهش دهند، و یا اثر آنها را در سطح سلول بلوک کنند؛ می‌تواند برای کاهش تشنج‌های صرعی مفید باشند. عوامل ضد التهابی همانند مینوسایکلین شاید گزینه مناسبی برای کاهش حملات صرعی باشد.

مینوسایکلین یک آنتی بیوتیک از خانواده تتراسایکلین است؛ که علاوه بر خاصیت ضد میکروبی دارای ویژگی ضد التهابی است [19]. تزریق سیستمیک مینوسایکلین موجب کاهش فعالیت میکروگلیا، و کاهش تولید سایتوکاین التهابی در سیستم عصبی مرکزی شده [20-24]، و از نورو ن‌ها در برابر آسیب‌های مغزی ناشی از ضربه و آسیب تروماتیکی محافظت می‌کند [25, 26]. از طرفی با توجه به اثرات ضد التهابی و محافظتی مینوسایکلین، ممکن است این ترکیب، بر تشنج‌های صرعی تاثیرگذار باشد؛ که مورد بررسی قرار نگرفته است.

بنابر این، هدف از این تحقیق بررسی تأثیر مینوسایکلین بر تشنجات ناشی از کیندلینگ آمیگدال است

فصل دوم

مروری بر مطالعات گذشته

2-1 صرع

بقراط اولین بار صرع را یک اختلال مغزی معرفی کرد. صرع یکی از رایجترین اختلالات عصبی در انسان می باشد، و هنوز روش قطعی درمان آن شناخته نشده است. داروهای ضد صرع موجود فقط در 40 درصد موارد، تشنج را از بین می برند؛ و در بقیه موارد فقط فراوانی وقوع تشنجها را کم می کنند [27]. مطابق با آمارهای انجام شده، شیوع صرع در جمعیت انسانی حدود 3% است [28].

بطور کلی، به فعالیت الکتریکی غیرطبیعی، همزمان و آشفته در مغز، تشنج¹ گفته می شود. اگر این اختلال باعث تغییری ناگهانی و گذرا در رفتار شخص شود، به آن تشنج، و اگر این حملات تشنجی بدون علل زمینه‌ای و به طور تکراری رخ دهد، به آن صرع گفته می شود. صرع به اشکال مختلف شامل: آشفته‌گی در رفتار، حس، حرکت و ادراک دیده می شود. این آشفته‌گی‌ها ممکن است با تغییر در سطح هوشیاری همراه باشد [29].

شایع ترین عواملی که ممکن است در ایجاد صرع دخیل باشند عبارت از کمبود اکسیژن، مننژیت باکتریایی²، ضربه های مغزی، تومورهای مغزی³، سوء استعمال داروها یا الکل، عفونت های مغزی و نقایص ژنتیکی می باشد [5, 30].

شناخت مکانیسم های ایجاد صرع از قدیم یکی از موضوعات مورد تحقق بشر بوده است. در قدم های اولیه تغییر در آستانه تحریک پذیری مغز را علت صرع بیان می کردند، اما با پیشرفت تکنیک‌های دقیق الکترو فیزیولوژی مشخص گردید هنگام بروز صرع، درفعالیت نوروها یا گیرنده ها و کانال های یونی نواحی خاصی از مغز، اختلال ایجاد می شود. هم اکنون بررسی علل این اختلالات و چگونگی مقابله با آن ها در دست تحقیق می باشد.

1 - Seizure

2- Bacterial meningitis

3 - Brain tumor

2_1_1 تقسیم بندی انواع صرع

به منظور شناخت دقیق تر و درمان بهتر افراد صرعی، بر اساس نوع رفتار تشنجی، صرع را تقسیم بندی می کنند. "مجمع بین المللی مبارزه با صرع"¹ در سال 1981، بر اساس نشانه های بالینی و الگوهای الکتروانسفالوگرام، صرع را به سه نوع موضعی²، عمومی³، و طبقه بندی نشده⁴، تقسیم نمود [29].

در حالت موضعی، فعالیت غیر طبیعی به ناحیه مشخصی از مغز محدود می شود، این نوع حملات را به دو نوع ساده⁵ و پیچیده⁶ تقسیم بندی می کنند. بر خلاف حملات موضعی ساده، در حملات موضعی پیچیده هوشیاری از دست می رود و انواع مختلفی از علائم کلینیکی در فرد ظاهر می شود.

در تشنجات موضعی پیچیده، منشأ ایجاد تشنج معمولاً لوب گیجگاهی و سیستم لیمبیک می باشد، لذا به تشنجات لوب لیمبیک موسوم هستند. در بین نواحی مختلف سیستم لیمبیک آمیگدال مهمترین ناحیه ای است که منشأ این نوع حملات می باشد [4, 5]. حملات لوب گیجگاهی درصد زیادی از حملات صرعی را شامل می شود و غالباً به دارو درمانی مقاوم هستند [31].

تشنجات عمومی کانون مشخصی ندارند و نواحی وسیعی از هر دو نیمکره مغزی را در بر می گیرد. بر اساس الگوی رفتاری این نوع حملات به گروههای مختلفی از جمله صرع کوچک⁷، تونیک، کلونیک¹، و تونیک-کلونیک (یا صرع بزرگ) تقسیم می شوند.

1- International League Against Epilepsy

2- Partial

3- Generalized

4- Unclassified

5- Simple partial

6- Complex partial

7- Petit mal

جدول 1-2 تقسیم بندی انواع صرع بر اساس نامگذاری مجمع بین المللی مبارزه با صرع

<p>Partial</p> <ul style="list-style-type: none"> Simple partial Motor Sensory Sensory-motor Autonomic Cognitive Complex partial Secondary generalized
<p>Generalized</p> <ul style="list-style-type: none"> Tonic-clonic (grand mal) Absence (petit mal) Myoclonic Tonic Clonic Atonic
<p>Unclassified</p>

تشنجات طبقه بندی نشده آن دسته از تشنجاتی هستند که در هیچکدام از گروه بندی های فوق جای نمی گیرند [32, 33]. جدول (1-2).

2-1-2 مکانیسم های ایجاد صرع

عوامل متعددی در ایجاد صرع دخیل هستند، که شامل مکانیسم های درون سلولی (مربوط به غشای نورونها) و مکانیسم های خارج سلولی (مربوط به الکترولیتها و عوامل خارجی) می باشد. این دو مکانیسم می توانند منجر به تحریک پذیری زیاد نورونهای مغزی شده و فعالیتی همزمان و کلیشه ای در این نورونها ایجاد کنند که به آن-ها² (PDS) گفته می شود. PDS یک موج دپلاریزه کننده نسبتاً بزرگ (20-40mv) و طولانی مدت (100ms) می باشد، که متعاقب آن یک مرحله هیپرپلاریزاسیون دیده می شود. کاهش کلسیم مایع بین سلولی مغز و یا

1 - Clonic

2 - Paroxysmal depolarizing shift

افزایش دوز پتاسیم در آن که ناشی از عملکرد نامطلوب سلولهای گلیاست؛ می تواند منجر به بروز PDS شود [34].

اگر نورون های موجود در کانون تشنج که فعالیت غیر طبیعی دارند، تعدادشان کمتر از هزار عدد باشد؛ هیچگونه تظاهرات بالینی مشاهده نمی شود. این فعالیت الکتریکی غیر طبیعی فقط به شکل اختلالاتی در الکتروانسفالوگرام¹ (EEG) قابل ثبت می باشد.

مهمترین نشانه الکتروفیزیولوژیکی صرع، ثبت اسپایکهای غیر طبیعی در EEG است. اگر این اسپایکها در زمان وقوع حملات صرع ثبت شوند، به آنها اسپایکهای حمله ای² و اگر در مراحل بین حملات صرعی ثبت شوند به آنها اسپایکهای بین حمله ای³ گفته می شود. اسپایکهای حمله ای همیشه با بروز رفتار تشنجی همراه هستند، ولی اسپایک های بین حمله ای رفتار تشنجی ایجاد نمی کنند.

فرایند PDS زمینه ساز اسپایکهای حمله ای می باشد. منشأ PDS و اسپایکهای حمله ای ممکن است حذف مهار پیرامونی⁴، افزایش فرکانس پتانسیلهای پس سیناپسی تحریکی (EPSP)⁵، افزایش ثابت زمانی در دندریتهای نورونهای پس سیناپسی، القای میدان الکتریکی، فعالیت گیرنده های (NMDA)⁶ و کاهش فعالیت سیستم (GABA)⁷ باشد [34].

1 - Electroencephalogram

2 - Ictal discharges

3 - Interictals discharges

4- Surround inhibition

5 - Excitatory postsynaptic potential

6 - N-methyl -D-aspartate

7 - Gamma amino butyric acid

3-1-2 آناتومی عملکردی صرع لیمبیک

منظور از آناتومی عملکردی صرع لیمبیک، تمام مدارهای موضعی است که به هنگام ایجاد این نوع صرع باعث شروع، تعدیل، همزمان سازی و انتشار آن به سایر نواحی مغز می‌شوند. در انسان صرع لوب گیجگاهی شایع‌ترین نوع صرع است و منشأ آن تمام بافت‌هایی هستند که در زیر شیار سیلویین¹ و در زیر لوب گیجگاهی و آهیانه قرار دارند. این ساختارها شامل هیپوکمپ، آمیگدال، قشر پراهیپوکمپ، قشر پیریفورم و دیگر ساختارهای قشر لیمبیک است که منشأ صرع لوب گیجگاهی در انسان می‌باشند [35, 36].

حساسیت بخش‌های مختلف لوب تمپورال به صرع متفاوت است. وایزر² در سال 1987 [37] نشان داد که در لوب تمپورال کانون دو ساختار اصلی (دو ساختار کانون اصلی) صرع می‌باشند: یکی آمیگدال و دیگری هیپوکمپ. وی نتیجه گرفت که در 25% افراد مصروع، کانون صرع در هیپوکمپ، 10% در آمیگدال و 65% در هر دو هسته است.

4-1-2 مدل‌های آزمایشگاهی ایجاد صرع

مدلهای آزمایشگاهی ایجاد صرع باید دارای ویژگیهای خاصی باشد. چند مورد از این ویژگی‌ها عبارتند از :

الف) نوع حملات از لحاظ بالینی باید مشابه حملاتی باشد که در صرع انسانی اتفاق می‌افتد. در انسان حملات موضعی پیچیده از نوع حملات مقاوم به دارو هستند. بنابراین این نوع حملات باید بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد.

ب) حملات ایجاد شده باید همراه با تغییراتی در الکتروانسفالوگرام باشد، بطوری‌که تغییر در الکتروانسفالوگرام را مؤید تظاهرات رفتاری در نتیجه اثر دارو دانست.

1 - Sylvian

2 - Wieser