

اثر مهار ناحیه CA1 هیپوکامپ پستی توسط لیدوکائین بر روند کیندلینگ آمیگدال در موش صحرائی

سید مصطفی مرتضوی^۱، دکتر سیدجواد میر نجفی زاده^۲، دکتر یعقوب فتح الهی^۳، مسعود علاسوند^۴، محمدرضا پالیزوان^۵ و محمد رستم پور^۱

خلاصه

علیرغم تحقیقاتی که تاکنون صورت گرفته، هنوز نقش دقیق هیپوکامپ در تشنج هایی که منشاء ایجاد آنها آمیگدال است به خوبی مشخص نشده است. در این تحقیق به منظور مطالعه نقش نورون های ناحیه هیپوکامپ پستی بر روند ایجاد تشنج ناشی از کیندلینگ آمیگدال، با تزریق لیدوکائین به صورت دوطرفه، فعالیت نورون های این ناحیه کاهش داده شد و اثر آن بر روند ایجاد تشنج بررسی گردید. تعداد ۲۸ حیوان در چهار گروه مورد استفاده قرار گرفتند. در گروه اول، فقط الکتروود سه قطبی در هسته قاعده ای - جانبی آمیگدال قرار داده شد و در گروه های دوم، سوم و چهارم دو کانول نیز در ناحیه CA1 هیپوکامپ پستی کار گذاشته شد. حیوانات گروه اول و دوم، یک هفته پس از جراحی، روزانه یک تحریک با شدت آستانه دریافت کردند تا به مرحله پنج حمله برسند. به حیوانات گروه های سوم و چهارم هر روز به ترتیب سرم فیزیولوژی و لیدوکائین ۲٪ (۱ میکرولیتر در دو دقیقه) تزریق شد و پنج دقیقه پس از تزریق تحریک شدند تا آنها نیز به مرحله پنج تشنج برسند. نتایج حاصل نشان داد که در گروه چهارم تعداد تحریکات لازم برای رسیدن به مرحله پنجم تشنج و تحریکات لازم جهت گذر از مرحله چهارم به مرحله پنجم تشنج، به طور معنی داری نسبت به گروه های دیگر بیشتر است. بنابر این به نظر می رسد که هیپوکامپ در مراحل پایانی و نه اولیه شکل گیری پدیده کیندلینگ آمیگدال نقش مهمی را ایفا می کند.

واژه های کلیدی: صرع، تشنج، کیندلینگ، هیپوکامپ، آمیگدال، لیدوکائین

۱- کارشناس ارشد فیزیولوژی، ۲- استادیار فیزیولوژی، ۳- دانشیار فیزیولوژی، ۴- دانشجوی دکتری فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی تربیت مدرس

مقدمه

صرع یکی از اختلالات عصبی است که تاکنون روشی قطعی برای درمان کامل آن شناخته نشده است (۱۳،۱۸،۳۴). هم اکنون تحقیقات زیادی برای شناسایی مکانیسم های دخیل در ایجاد و تداوم صرع و کشف راه های درمانی بهتر در حال انجام است. در بسیاری از این تحقیقات از مدل های آزمایشگاهی ایجاد صرع استفاده می شود. یکی از این مدل ها کیندلینگ است. در کیندلینگ با تحریک مکرر یک ناحیه مغزی با محرک الکتریکی یا شیمیایی، که در ابتدا قادر به ایجاد تشنج نیست، در حیوان تشنج ایجاد می کنند (۲۷،۲۶). به دلیل این که تشنج های حاصل از این مدل مشابه یکی از شایع ترین انواع تشنج در انسان یعنی تشنج های موضعی پیچیده (Complex partial seizures) می باشد، از این روش در تحقیقات زیادی استفاده می شود (۱۶،۲۶). آمیگدال و هیپوکامپ از نواحی حساس لوب گیجگاهی هستند که سلول های آنها آمادگی زیادی برای ایجاد و تقویت امواج صرعی دارند (۴۲،۴۰،۱۵،۱۱) این دو ناحیه دارای شبکه نورونی مناسب برای تقویت امواج صرعی و گسترش آن بوده (۳) و جزء مهم ترین کانون های ایجاد تشنج به روش کیندلینگ محسوب می شوند (۲۵،۴۳). به علت ارتباط آناتومیک بین این دو ناحیه (۳) و بر اساس مطالعات آناتومیک و فارماکولوژیک پیشنهاد شده است که هیپوکامپ یکی از مراکز تقویت کننده امواج تشنجی حاصل از کیندلینگ آمیگدال می باشد (۱،۲۳،۲۵،۲۸). در این راستا دیده شده است که افزایش فعالیت نورون های بخش قاعده ای - جانبی آمیگدال در طی تشنج با افزایش فعالیت نورون ها در ناحیه CA1 هیپوکامپ همراه است (۲،۱۴). با این حال، نتایج حاصل از برخی مطالعات نشان دهنده عدم تأثیر هیپوکامپ بر تقویت امواج صرعی، در کیندلینگ آمیگدال می باشد (۳۱،۴۰) و هنوز نقش هیپوکامپ در مراحل اولیه شکل گیری و ایجاد کیندلینگ در ناحیه آمیگدال به درستی مشخص نشده است. بنابر این با توجه به نقش مهم دو ناحیه آمیگدال و هیپوکامپ در ایجاد حملات تشنجی به ویژه در انسان (۱۲،۶) شناخت ارتباط این دو ناحیه و نقش هر یک از آنها بر حملات تشنجی ناشی از ناحیه دیگر، می تواند به درک بیشتر و بهتر نحوه گسترش امواج تشنجی در بین این دو ناحیه

کمک نماید. لذا در این تحقیق جهت بررسی نقش هیپوکامپ بر روند تشنج ناشی از کیندلینگ آمیگدال، با تزریق لیدوکائین به ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی فعالیت نورون های این ناحیه به طور گذرا سرکوب شد و تأثیر این عدم فعالیت بر روند ایجاد کیندلینگ آمیگدال مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

آماده سازی حیوانات: در این تحقیق از موش های صحرایی نر با وزن ۳۳۰-۳۵۰ گرم استفاده گردید. حیوانات با تزریق داخل صفاقی پنتوباریتال سدیم (۵۰mg/kg) بیهوش گردیده و در دستگاه استریوتاکی قرار داده شدند. برشی در پوست سر در بخش میانی و به صورت میانی - خلفی ایجاد شد. مطابق اطلس پاکسینوز (۲۹) یک الکتروده سه قطبی (دو قطب برای تحریک و یک قطب برای ثبت) در هسته قاعده ای - جانبی آمیگدال در طرف راست با مختصات (۲/۵ میلیمتر به سمت عقب و ۴/۸ میلیمتر به سمت راست، نسبت به برگما و ۷/۵ میلیمتر زیر سخت شامه) و کانول های هادی در نواحی CA1 هیپوکامپ پشتی راست و چپ با مختصات (۳/۶ میلیمتر به سمت عقب و ۲/۳ میلیمتر به سمت راست و چپ نسبت به برگما و ۲/۲ میلیمتر زیر سخت شامه) کار گذاشته شدند. فقط در گروه اول کانول های هادی در ناحیه CA1 هیپوکامپ کار گذاشته نشد. دو الکتروده تک قطبی (به عنوان الکترودهای زمین و دیفرنشیل) به وسیله پیچ عینک در سطح جمجمه نصب شدند. الکترودها از جنس فولاد ضد زنگ با پوشش تفلون بودند. به جز نوک آنها که عاری از پوشش بود به یک انتهای هر الکتروده یک پین لحیم شده بود و پس از کارگذاری الکترودها (در سطح جمجمه یا درون آمیگدال)، این پین ها درون سوکت مخابراتی قرار گرفتند. سوکت مخابراتی به همراه کانول های تزریق به وسیله سیمان دندانپزشکی روی سطح جمجمه ثابت گردید.

تحریک و آستانه گیری

یک هفته پس از جراحی آستانه تحریک اندازه گیری شد. به این ترتیب که بخش نری سوکت مخابراتی که

گروه سوم (گروه تزریق سالی، $n=6$) جراحی همانند گروه دوم انجام گرفت. پس از بهبودی به آنها هر ۲۴ ساعت یک بار سالی تزریق شد (یک میکرولیتر در دو دقیقه) و ۵ دقیقه بعد تحریک شدند. این عمل هر روز تکرار شد تا تمام حیوانات مرحله پنج تشنج را نشان دهند. در گروه چهارم (گروه تزریق لیدوکائین، $n=6$) جراحی حیوانات همانند گروه دوم و سوم انجام گرفت. حیوانات بعد از یک هفته استراحت و تعیین آستانه تحریک هر ۲۴ ساعت یک بار لیدوکائین ۲٪ (۱ میکرولیتر در ۲ دقیقه) دریافت کرده و پنج دقیقه بعد تحریک شدند. در گروه های فوق، مدت زمان اولین امواج تخلیه متعاقب در زمان آستانه گیری (After discharge duration, ADD1) و آستانه تحریک تعداد روزهای لازم برای رسیدن به مرحله اول ($nS1$)، مرحله دوم ($nS2$)، مرحله سوم ($nS3$)، مرحله چهارم ($nS4$) و مرحله پنجم تشنج ($nS5$)، تعداد تحریکات لازم برای رسیدن از مرحله اول به مرحله دوم ($S1-S2$)، از مرحله دوم به مرحله سوم ($S2-S3$)، از مرحله سوم به مرحله چهارم ($S3-S4$)، و از مرحله چهارم به مرحله پنجم ($S4-S5$) و مرحله حمله تشنجی در روز میانه روند تشنج ($n/2$) اندازه گیری و ثبت گردید. کمیت مرحله حمله تشنجی در روز میانه روند تشنج، پس از این که حیوانات مرحله ۵ تشنج را نشان دادند اندازه گیری شد. برای این منظور تعداد تحریکات و یا به عبارت دیگر تعداد روزهای لازم برای رسیدن به مرحله ۵ تشنج (n) تقسیم بر ۲ شده تا روز میانه تشنج به دست آید. آن گاه مرحله حمله حیوان در این روز ثبت می گردد. این کمیت شاخصی از سرعت پیشرفت کیندلینگ است و هر چه مقدار آن بیشتر باشد نشان دهنده پیشرفت سریع تر کیندلینگ می باشد.

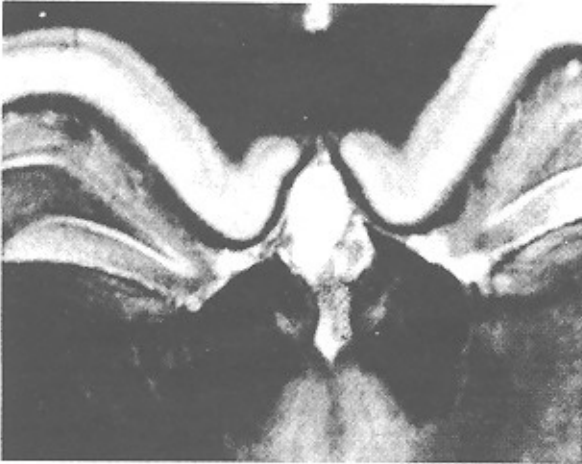
برای تعیین محل الکترود و کانول پس از اتمام آزمایش ها، هر حیوان به وسیله اتر بیهوش شده و از طریق کانول ها ۱ میکرولیتر ماده رنگی آبی متیل درون کانول ها تزریق می گردید. مغز حیوانات خارج شده و در داخل فرمالین قرار می گرفت و سپس از محل کانول و الکترود برش گیری انجام می شد تا محل دقیق الکترود و کانول مشخص گردد. پس از بررسی بافت شناسی، نتایج مربوط به حیواناتی که محل کارگذاری الکترود آنها صحیح نبود حذف می گردید.

متصل به دستگاه تحریک کننده بود به بخش مادگی آن که روی سر حیوان قرار داشت، متصل گردید. موج مربعی با فرکانس ۶۰Hz و عرض پالس ۱ ms و مدت ۲ ثانیه با شدت جریان ۱۰ μA به حیوان اعمال گردید (۲۰). اگر این تحریک باعث ایجاد امواج تخلیه متعاقب به مدت ۵ ثانیه می گردید، این شدت جریان به عنوان آستانه تحریک در نظر گرفته می شد و در غیر این صورت هر ۵ دقیقه یک بار شدت جریان ۱۰ μA افزایش داده می شد تا امواج تخلیه متعاقب ثبت گردد. پس از تعیین آستانه تحریک، حیوانات هر ۲۴ ساعت یک بار طبق دستورالعملی که در قسمت بعدی ذکر خواهد شد، تحریک می شدند تا کیندل شوند و مرحله ۵ تشنج را نشان دهند. مراحل تشنج بر طبق تقسیم بندی Racine به ترتیب زیر بود، مرحله اول حرکات دهان و صورت، مرحله دوم حرکات نوسانی سر به طرف بالا و پایین، مرحله سوم ایجاد کلونوس در اندام جلویی طرف مقابل ناحیه تحریک شده، مرحله چهارم ایستادن حیوان روی پاهای عقبی همراه با کلونوس اندام های جلویی و مرحله پنجم از دست دادن تعادل و به زمین افتادن حیوان (۳۲).

تزریق دارو: در این تحقیق لیدوکائین ۱ و ۲٪ به ناحیه CA1 حیوانات به صورت دو طرفه تزریق گردید. دوزهای مختلف دارو با عبور از فیلتر ۰/۲ μm ساخت شرکت Sartorius) استریل شده و با استفاده از پمپ تزریق (مدل EICOM EP-60، ساخت ژاپن) با سرعت یک میکرولیتر در ۲ دقیقه به حیوان تزریق می شدند.

گروه بندی و انجام آزمایش ها: حیوانات به چهار گروه تقسیم شدند. در حیوانات گروه اول (گروه بدون کانول، $n=9$) فقط یک الکترود ۳ قطبی در ناحیه آمیگدال و ۲ الکترود تک قطبی در سطح جمجمه کار گذاشته شد. پس از یک هفته استراحت، آستانه تحریک مشخص گردید و حیوانات هر ۲۴ ساعت یک تحریک دریافت کردند تا کیندل شدند. در گروه دوم (گروه بدون تزریق، $n=7$) جراحی مثل گروه قبل انجام گرفت اما علاوه بر اعمال ذکر شده، یک کانول نیز در ناحیه CA1 - هیپوکامپ پستی هر طرف کار گذاشته شد. پس از یک هفته استراحت آستانه تحریک حیوانات تعیین شد. حیوانات این گروه بدون تزریق هیچ ماده ای، هر ۲۴ ساعت یک بار تحریک شدند تا کیندل شوند. در حیوانات

به سایر گروه ها افزایش یافته است ($P < 0.01$) و آزمون Tukey تفاوت معنی داری را بین گروه چهارم (تزریق لیدوکائین) و گروه های اول و دوم نشان داد (شکل ۲).



شکل ۱: نمایش برش بافت شناسی از ناحیه CA1 هیپوکامپ. موقعیت کارگذاری کانول پس از تزریق آبی متیل به صورت لکه های رنگی مشاهده می شود. خط مقیاس نشان دهنده $400 \mu\text{m}$ می باشد.

روش های آماری: نتایج حاصل به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین ارائه گردیده است. در این آزمایش برای مقایسه کمیت های مختلف تعداد تحرکات لازم برای رسیدن حیوانات به مراحل اول تا پنجم تشنج و مرحله حمله در روز میانه روند تشنج $\text{ADD1}, n/2$ و شدت تحریک آستانه در بین گروه های مختلف از آزمون ANOVA یک طرفه و به دنبال آن از آزمون Tukey استفاده گردید.

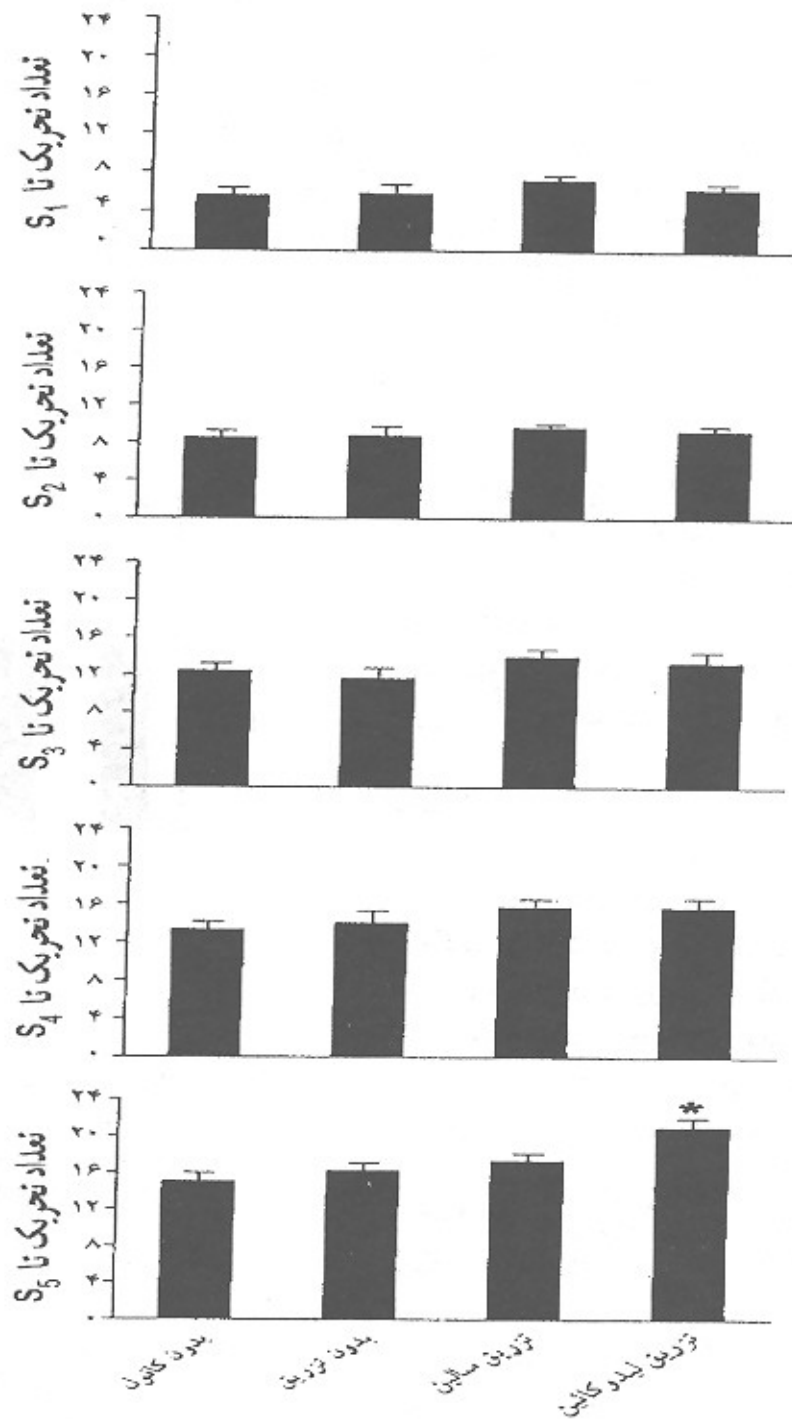
نتایج

بررسی برش های بافت شناسی وجود الکتروود در آمیگدال و کانول راهنما در ناحیه CA1 هیپوکامپ را تأیید نمود (شکل ۱). مقایسه آستانه تحریک آمیگدال و مدت زمان امواج تخلیه متعاقب به هنگام اولین تحریک (ADD1) در چهار گروه نشان داد که اختلاف معنی داری بین گروه های مختلف وجود ندارد ($P = 1/55; \text{ADD1}$ آستانه تحریک: $P = 0/59$) (جدول ۱). آزمون ANOVA یک طرفه نشان داد که تعداد تحرکات لازم برای ایجاد مرحله پنجم تشنج در کیندلینگ آمیگدال (n) در حیواناتی که لیدوکائین دریافت کرده اند به طور معنی داری نسبت

جدول ۱: آستانه تحریک آمیگدال و مدت زمان اولین امواج تخلیه متعاقب به هنگام اولین تحریک در چهار گروه موش صحرائی مورد استفاده

گروه	متغیر	مدت زمان اولین امواج تخلیه متعاقب (ثانیه)	آستانه تحریک (میکروآمپر)
بدون کانول ($n=9$)		$10/00 \pm 1/59$	$33/88 \pm 6/44$
بدون تزریق ($n=7$)		$12/42 \pm 2/63$	$60/00 \pm 24/00$
تزریق سالین ($n=6$)		$6/83 \pm 0/47$	$42/33 \pm 6/14$
تزریق لیدوکائین ($n=6$)		$10/66 \pm 1/8$	$50/00 \pm 15/49$

حیوانات ۵ دقیقه پس از تزریق تحریک شدند. مقادیر به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین نشان داده شده است. آزمون ANOVA یک طرفه تفاوت معنی داری را بین چهار گروه مورد آزمایش نشان نداد.



شکل ۲: مقایسه تعداد تحرکات لازم برای رسیدن حیوانات به مرحله اول (nS1)، دوم (nS2)، سوم (nS3)، چهارم (nS4) و پنجم (nS5) تشنج در گروه های بدون کانول (n=9)، بدون تزریق (n=7)، تزریق سالین (n=6) و تزریق لیدوکائین (n=6). مقادیر به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین نشان داده شده است. * نشان دهنده $P < 0.05$ در مقایسه با گروه بدون کانول و گروه بدون تزریق با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه و آزمون Tukey می باشد.

جدول ۲: تعداد روزهای لازم تحریک جهت رسیدن حیوان از هر مرحله تشنج به مرحله بعدی در چهار گروه موش صحرایی مورد استفاده

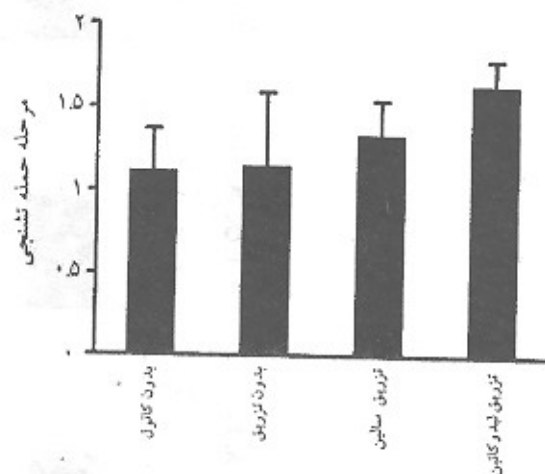
متغیر	از S1 به S2	از S2 به S3	از S3 به S4	از S4 به S5
بدون کانول (n=9)	3/00±0/79	3/88±1/08	0/88±0/42	1/77±0/46
بدون تزریق (n=7)	2/71±1/01	2/85±0/63	2/42±0/94	2/14±0/63
تزریق سالین (n=6)	2/5±0/22	4/33±1/29	1/83±0/40	1/66±0/33
تزریق لیدوکائین (n=6)	4/00±1/89	3/16±0/70	2/33±0/49	5/23±0/95**

تمام حیوانات 5 دقیقه پس از تزریق تحریک شدند. مقادیر بر حسب میانگین ± خطای معیار میانگین می باشد. آزمون تفاوت معنی داری را بین گروه تزریق لیدوکائین با سایر گروه ها از مرحله S4 به S5 نشان داد ($P < 0.01$ ، آزمون Tukey).

به مرحله دوم تشنج ($P=0/8$)، مرحله دوم به مرحله سوم ($P=0/23$) و مرحله سوم به مرحله چهارم ($P=0/72$) تفاوت معنی داری بین گروه های مختلف مشاهده نشد (جدول ۲). همچنین در بررسی مرحله حمله در روز میانه روند تشنج ($n/2$) آزمون ANOVA یک طرفه تفاوت معنی داری بین گروه ها نشان نداد ($P=0/36$) (شکل ۳).

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده آن است که مهار گذرای ناحیه CA1 هیپوکامپ پستی به وسیله لیدوکائین، باعث به تعویق افتادن روند کیندلینگ آمیگدال شده و تعداد روزهای تحریک لازم برای رسیدن به مرحله پنج تشنج را افزایش می دهد. به دنبال تحریک ناحیه آمیگدال، ابتدا امواج تشنجی محدود به همین ناحیه بوده اما به تدریج، هم زمان با شدیدتر شدن شدت تشنج، این امواج به سایر نقاط مغز گسترش می یابند (۱۹، ۲۰، ۳۱). یکی از مراکز مؤثر در انتشار امواج تشنجی آمیگدال، هیپوکامپ است (۲، ۱۷). روش های فارماکولوژیک نشان می دهد که در حیوانات کیندل شده در اثر تحریک الکتریکی آمیگدال، غلظت خارج سلولی گلوتامات (۴۴) و تعداد گیرنده های NMDA در هیپوکامپ افزایش می یابد (۷) و همچنین تزریق آگونیست های GABA به داخل هیپوکامپ باعث کاهش تشنج ناشی از کیندلینگ آمیگدال می گردد (۲۲). عده ای نیز با استفاده از تحقیقات سلولی مولکولی نشان داده اند که هیپوکامپ در گسترش امواج تشنجی حاصل از آمیگدال تاثیر دارد (۱، ۱۹). تمامی این تحقیقات دلالت



شکل ۳: مقایسه مرحله حمله تشنجی در روز میانه روند تشنج در گروه های بدون کانول (n=9)، بدون تزریق (n=7) و تزریق سالین (n=6) و تزریق لیدوکائین (n=6). مقادیر به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین نشان داده شده است. آزمون Kruskal-Wallis تفاوت معنی داری را بین گروه ها نشان نمی دهد.

مقایسه تعداد روزهای لازم برای رسیدن حیوان به مراحل اول تا چهارم تشنج (S1، S2، S3، S4) در ANOVA یک طرفه تفاوت معنی داری را نشان نمی دهد. ($P=0/8$ ، S2)، ($P=0/53$ ، S3)، ($P=0/39$ ، S4)، ($P=0/65$ ، S1) همچنین تعداد روزهای لازم برای رسیدن حیوان از مرحله چهارم تشنج به مرحله پنجم تشنج در گروه تزریق لیدوکائین، نسبت به تمام گروه ها افزایش معنی داری پیدا کرد (جدول ۲). ولی در مورد تعداد روزهای لازم برای رسیدن حیوان از مرحله اول

گروه به مرحله اول تا چهارم تشنج نبوده است، بلکه ناشی از اختلاف بین روزهای لازم جهت رسیدن حیوانات از مرحله چهارم به مرحله پنجم تشنج است. به علاوه عدم تفاوت در تعداد روزهای تحریک لازم برای رسیدن به مرحله پنجم تشنج بین گروه دریافت کننده سالیس و گروهی که به آن لیدوکائین تزریق شده است، ممکن است این احتمال را مطرح نماید که عمل تزریق به هیپوکامپ خود نیز بر روی روند کیندلینگ مؤثر است. اما با توجه به وجود اختلاف معنی دار در تعداد روزهای تحریک لازم برای رسیدن از مرحله چهارم به مرحله پنجم تشنج چنین به نظر می رسد که هم پوشانی بین تعداد تحریکات لازم برای رسیدن به مرحله چهارم و تعداد تحریکات لازم برای رسیدن به مرحله پنجم در حیوانات به گونه ای است که اگر فقط تعداد تحریکات لازم برای رسیدن به مرحله پنجم مورد مقایسه قرار گیرد، اختلاف معنی داری بین این دو گروه مشاهده نمی شود و لذا باید با مقایسه تعداد تحریکات لازم برای رسیدن از مرحله چهارم به مرحله پنجم تشنج، این تفاوت را مشاهده نمود. لذا به نظر می رسد که هیپوکامپ باعث تسهیل در گسترش امواج تشنجی از کانون تشنج (آمیگدال) به نواحی حرکتی مغز می گردد و در گسترش اولیه امواج تشنجی از آمیگدال به این نواحی نقش مهمی ایفا نمی کند و باید نقش هسته های دیگر مغزی را در این رابطه مورد بررسی قرار داد.

در این تحقیق با استفاده از لیدوکائین نورون های هیپوکامپ به صورت گذرا مهار شدند. این روش مهار در تحقیقات زیادی مورد استفاده قرار گرفته است (۲۱،۲۳،۳۸). تحقیقات مختلف بر این نکته تأکید دارند که تزریق موضعی لیدوکائین و یا تزریق سیستمیک آن در دوزهای پایین باعث بی حسی موضعی از طریق مهار کانال های سدیمی می شود (۳۴،۳۷). در این تحقیقات دیده شده است که میزان گسترش لیدوکائین در مدت ۳۰ دقیقه پس از تزریق در بافت عصبی یک میلیمتر بوده است (۲۴،۳۳،۳۷) و می تواند باعث مهار سلول های عصبی از زمان تزریق تا ۳۰ الی ۶۰ دقیقه پس از تزریق شود (۳۳،۳۷). نکته مهمی که باید به آن توجه گردد این است که در برخی از تحقیقات اثر تشنج زایی دوزهای بالای لیدوکائین در مدل کیندلینگ بررسی شده است

بر این دارند که به هنگام کیندلینگ آمیگدال، تحریک پذیری نورون های هیپوکامپ افزایش می یابد. در این تحقیق اثر تزریق لیدوکائین به ناحیه CA1 هیپوکامپ (لیدوکائین ۱٪، ۱ میکرولیتر در ۲ دقیقه) بر روند کیندلینگ مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که مهارگذرای هیپوکامپ، به صورت معنی داری باعث افزایش تعداد روزهای لازم برای رسیدن به مرحله پنجم تشنج می شود. از آنجا که آستانه تحریک و مدت زمان امواج تخلیه متعاقب پس از اولین تحریک در گروه های مختلف تفاوت معنی داری ندارد بنابراین افزایش تعداد روزهای لازم برای رسیدن به مرحله پنجم تشنج نمی تواند حاصل تفاوت در شدت تحریک اعمال شده بر آمیگدال یا تفاوت در تحریک پذیری حیوانات در گروه های مختلف با یکدیگر باشد. در نتیجه می توان نتیجه گرفت که نورون های هیپوکامپ به عنوان تقویت کننده امواجی که در اثر تحریک الکتریکی آمیگدال به وجود می آید، عمل کرده و نقش مؤثری را در گسترش امواج تشنجی حاصل از آمیگدال، ایفا می نمایند. در همین راستا دیده شده است که تزریق کولشسین به ژيروس دنداندار نیز باعث مهار روند کیندلینگ آمیگدال می شود (۱۰).

از طرف دیگر، مرحله حمله در روز میانه روند کیندلینگ و تعداد روزهای لازم برای رسیدن حیوانات به مراحل اول تا چهارم تشنج تفاوت معنی داری را بین گروه های مختلف نشان نمی دهد. این عدم تغییر بیانگر این است که هیپوکامپ بر مراحل اولیه روند کیندلینگ تأثیر مثبتی ندارد. نتایج حاصل از مقایسه تعداد روزهای لازم برای رسیدن حیوانات از مرحله چهارم به مرحله پنجم تشنج، تفاوت معنی داری را بین گروهی که لیدوکائین دریافت کرده و سایر گروه ها نشان می دهد. با توجه به عدم تفاوت معنی دار در تعداد روزهای تحریک لازم برای رسیدن حیوان به مراحل اول تا چهارم تشنج و همچنین با توجه به تفاوت معنی داری که در روند کیندلینگ آمیگدال در رسیدن به مرحله پنج تشنج در گروه دریافت کننده لیدوکائین با سایر گروه ها مشاهده می شود، می توان نتیجه گرفت که تفاوت معنی دار در رسیدن حیوانات به مرحله پنجم تشنج در این گروه، ناشی از تفاوت در تعداد روزهای لازم برای رسیدن حیوانات این

دقیقه به هیپوکامپ تزریق شده است، لذا غلظت داروی تزریقی $0.2 \mu\text{g/ml}$ بوده است. بنابر این همانطور که ملاحظه می گردد غلظت لیدوکائین تزریقی بسیار پایین تر از حدی است که بتواند تشنج ایجاد کند (۴،۴۱) و مقدار تزریق شده با مقادیر مورد استفاده جهت بی حسی موضعی در تحقیقات دیگر (۳۳،۳۷،۳۸) مطابقت دارد. بنابر این تمامی نتایج حاصل از این تحقیق را می توان ناشی از مهار گذرای نورون های هیپوکامپ توسط لیدوکائین دانست. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق می توان این احتمال را مطرح کرد که در مراحل اولیه شکل گیری رفتارهای تشنجی در کیندلینگ آمیگدال، هیپوکامپ تأثیر معنی داری بر گسترش امواج تشنجی از کانون تشنج به نواحی حرکتی ندارد و پس از عمومی شدن تشنج نقش خود را ایفا می کند.

تشکر و قدرانی

این تحقیق در گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است. لذا بدین وسیله از مدیریت و تمامی اعضای محترم آن گروه به ویژه جناب آقای صفرعلی غفاری که همکاری زیادی در طول این پروژه داشتند تشکر و قدردانی به عمل می آید.

Summary

Effect of Reversible Inhibition of Hippocampal CA₁ Region by Lidocaine on Amygdala Kindling Rate in Rats

Mortazavi M, MSc¹, Mirnajafi-Zadeh SJ, PhD², Fathollahi Y, PhD³, Alasvand M, MSc¹, Palizvan MR, MSc⁴, and Rostampour M, MSc⁴

1. MSc in Physiology, 2. Assistant Professor, 3. Associate Professor of Physiology, 4. PhD Student of Physiology, University of Tarbiat Modares, Tehran, Iran

In this study the role of CA₁ region of dorsal hippocampus on amygdala kindling rate was investigated by bilateral microinjection of lidocaine into the hippocampus. 28 rats were divided into four groups. In group 1, animals were implanted only with a tripolar electrode into the amygdala but in groups 2-4, two guide cannulae were also implanted into the CA₁ region of the dorsal hippocampus. Two monopolar electrodes were also attached to the skull as earth and differential. One week after surgery, the threshold stimulus was determined and each animal was stimulated daily by threshold stimulus to be kindled. In group 3 and 4, saline or lidocaine 2% (1 $\mu\text{lit}/2\text{min}$) was also injected bilaterally into the hippocampus respectively and animals were stimulated 5 min after injection. Obtained results showed that the number of stimulation to receive from stage 4 to stage 5 seizure was significantly increased in group 4. Thus, it may be suggested that CA₁ region of the hippocampus plays an important role in late but not early stages of amygdaloid kindled seizures and amygdala kindling rate.

(۳۰،۳۶،۴۱). بعضی محققان با تزریق داخل صفاقی لیدوکائین به مقدار 65mg/kg به تعداد ۱۲ تا ۱۴ بار و در هر روز یک تزریق در حیوانات آزمایشگاهی کیندلینگ ایجاد کرده اند (۳۰،۴۱). تزریق وریدی 20mg/kg لیدوکائین باعث تشنج در موش صحرایی شده است. در این حالت غلظت لیدوکائین در پلاسما خون، $4/9 \pm 0/8 \mu\text{g/ml}$ و در مغز $12/9 \pm 1/1 \mu\text{g/g}$ گزارش شده است (۵). همچنین با روش های کروماتوگرافی و آیونتوفورز نشان داده اند که دوز بالای لیدوکائین به مقدار فوق الذکر یا بیشتر در پلاسما خون می تواند تشنج ایجاد نماید (۴). تزریق مقدار زیاد لیدوکائین در انسان نیز تشنج ایجاد کرده است (۹،۳۶،۴۱) و مصرف زیاد آن در حیواناتی مثل سگ، میمون یا خوک باعث ایجاد تشنج شده است (۳۹). به منظور تعیین مکانیسم ایجاد تشنج ناشی از دوز بالای لیدوکائین نیز تحقیقاتی انجام شده است. بررسی ها نشان می دهد در حیواناتی که به وسیله لیدوکائین کیندل شده اند، ترشح GABA کاهش می یابد (۲۲) و تزریق لیدوکائین با دوز بالا باعث افزایش تعداد گیرنده های NMDA در هیپوکامپ و آمیگدال می شود (۸). با توجه به اینکه در این تحقیق لیدوکائین ۲٪ به میزان ۱ میکرولیتر در دو

Key words: Seizures, Convulsion, Kindling, Hypocampus, Amygdala, Lidocaine
Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2002; 9(4): 173-183

References

1. Akiyama K, Ono M, Kohira I, Daigen A, Ishihara T and Kuroda S. Long-lasting increase in protein kinase C activity in the hippocampus of amygdala kindled rats. *Brain Res* 1995; 679(2): 212-220.
2. Alasvand Zarasvand M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y and 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(1-2): 141-149.
3. Amaral DG and Witter MP. Hippocampal formation. In: Paxinos G (ed). The rat nervous system. San Diego, Academic press, 1995; PP 443-493.
4. Barat SA and Abdel-Rahman MS. Cocaine and lidocaine in combination are synergistic convulsants. *Brain Res* 1996; 742(1-2): 157-162.
5. Biella G and Sotgiu ML. Central effects of systemic lidocaine mediated by glycine spinal receptors: An iontophoretic study in the rat spinal cord. *Brain Res* 1993; 603(2): 201-206.
6. Cain DP. Kindling and the amygdala. In: Aggleton JP (ed). The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction. New York, The willey-liss, 1992; PP539-560.
7. Chiasson BJ, Dennison Z and Robertson HA. Amygdala Kindling and immediate-early genes. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 29(1): 191-199.
8. Chu PJ, Shirahata A, Samejima K, Saito H and Abe K. N-(3-Aminopropyl)-cyclohexylamine blocks facilitation by spermidine of N-methyl-DL-aspartate-induced seizure in mice in vivo. *Eur J Pharmacol* 1994; 256(2): 155-160.
9. Clark JBF. Local anesthetic drugs. In: Clark JBF, Queener FS and Kabb VB, (eds). Pharmacological basis of nursing practice. Totowa, The human press, 1995; PP337-344.
10. Dasheiff RM and McNamara JO. Intradentate colchicine retards the development of amygdala kindling. *Ann Neurol* 1982; 11(4): 347-352.
11. Davis M, Rainnie D and Cassell M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci* 1994; 17(5): 208-214.
12. DeGiorgio CM, Tomiyasu U, Gott PS and Treiman DM. Hippocampal pyramidal cell loss in human status epilepticus. *Epilepsia* 1992; 33(1): 23-27.
13. Dreifuss FE. Classification of epileptic seizures. In: Engel J and Pedley TA (eds). *Epilepsy: A comprehensive textbook*. Philadelphia, Raven press, 1998; PP517-524.
14. Ebert U, Rundfeldt C and Loscher W. Development and pharmacological suppression of secondary afterdischarges in the hippocampus of amygdala-kindled rats. *Eur J Neurosci* 1995; 7(4): 732-741.
15. Franck JAE, Schwartzkroin PA, Philips JO and Fuch AF. The limbic system. In: Patton H.D, Fuchs AF, Hille B, Scher AM and Steiner R (eds). *Textbook of physiology*. Philadelphia, W.B. Saunders, 1989; PP693-717.
16. Goddard GV, McIntyre DC and Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 1969; 25(3): 295-330.
17. Haas KZ, Sperber EF, Opanashuk LA, Stanton PK and Moshe SL. Resistance of immature hippocampus to morphologic and physiologic alterations following status epilepticus or kindling. *Hippocampus* 2001; 11(6): 615-625.
18. Hauser WA and Kurland LT. The epidemiology of epilepsy in Rochester,

- Minnesota, 1935 through 1967. *Epilepsia* 1975; 16(1): 1-66.
19. Hirao T, Morimoto K, Yamamoto Y *et al.* Time-dependent and regional expression of GABA transporter mRNAs following amygdala kindled seizures in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 54(1): 49-55.
 20. Holmes KH, Bilkey DK and Laverty R. The infusion of an NMDA antagonist into perirhinal cortex suppresses amygdala-kindled seizures. *Brain Res* 1992; 587(2): 285-290.
 21. Ingvar M and Shapiro HM. Selective metabolic activation of the hippocampus during lidocaine-induced pre-seizure activity. *Anesthesiology* 1981; 54(1): 33-37.
 22. Ikeda M, Dohi T and Tsujimoto A. Protection from local anesthetic-induced convulsions GABA. *Anesthesiology* 1982; 56: 365-368.
 23. Margolis RL, Chuang DM, Dick D, Weiss SR and Post RM. Effect of cocaine lidocaine kindling and carbamazepine on batrachotoxin-induced phosphoinositid hydrolysis in rat brain slices. *Brain Res* 1993; 614(1-2): 185-90.
 24. Martin JH. Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neurosci Lett* 1991; 127(2): 160-164.
 25. McCandles DW and Finesmith RB. Chemically induced models of Seizurs. In: Bouton AA, Baker GB and Butterus RF (eds). *Neuromethods*. Vol 22, Totowa, The human press, 1992; PP133-151.
 26. McNamara JO, Byrne MC, Dasheiff RM and Fitz JG. The kindling model of epilepsy: A review. *Prog Neurobiol* 1980; 15(2): 139-159.
 27. McNamara JO and Wada JA. Kindling model. In: Engel J and Pedley TA (eds). *Epilepsy: A comprehensive textbook*. Raven, Philadelphia press, 1998; PP419-426.
 28. Miyamoto O, Itano T, Yamamoto Y, *et al.* Effect of embryonic hippocampal transplantation in amygdaloid kindled rat. *Brain Res* 1993; 603(1): 143-147.
 29. Paxinos G and Watson C: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. California, Academic press, 1986.
 30. Post RM, Kennedy C, Schinohara M, *et al.* Metabolic and behavioral consequences of lidocaine-kindled seizures. *Brain Res* 1984; 324(2): 295-303.
 31. Pourgholami MH, Mirnajafi-Zadeh J and Behzadi J. Effect of intraperitoneal and intrahippocampal (CA1) 2-Chloroadenosine in amygdaloid kindled rats. *Brain Res* 1997; 751(2): 259-264.
 32. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: 2, motor seizure, electroencephalogr. *Clin Neurophysiol* 1972; 32: 281-294.
 33. Randich A and Aicher SA. Medullary substrates mediating antinociception produced by electrical stimulation of the vagus. *Brain Res* 1988; 445(1): 68-76.
 34. Ritchie JM. Mechanism of action of local anesthetic agents and biotoxins. *Brain J Anaesth* 1975; 45 suppl: 191-198.
 35. Rocha LL, Evans CJ and Maidment NT. Amygdala kindling modifies extracellular opioid peptide content in rat hippocampus measured by microdialysis. *J Neurochem* 1997; 68(2): 616-624.
 36. Ronald D and Miller MD. Local anesthetic drugs. In: Katzung BG (ed) *Basic and clinical pharmacology*. Appleton and Lange 1998; PP565-575.
 37. Sandköhler J and Gebhart GF. Relative contribution of the nucleus raphe magnus and adjacent medullary reticular formation to the inhibition by stimulation in the periaqueductal gray of spinal nociceptive reflex in the pentobarbital-anesthetized rat. *Brain Res* 1984; 305: 77-87.
 38. Sarihi A, Motamedi F, Rashidy-pour A, Naghdi N and Behzadi G. Reversible inactivation of the median raphe nucleus enhances consolidation and retrieval but not acquisition of passive avoidance learning in rats. *Brain Res* 1999; 817(1-2): 59-66.
 39. Satas S, Johannessen SI, Hoem NO, Haaland K, Sorensen DR and Thoresen M. Lidocaine pharmacokinetics and toxicity in newborn pigs. *Anesth Analg* 1997; 85(2): 306-312.

40. Savage DD, Rigsbee LC and McNamara Jo. Knife-cuts of entorhinal cortex: effects on development of amygdaloid kindling and seizure-induced decrease of muscarinic cholinergic receptors. *J Neurosci* 1985; 5(2): 408-413.
41. Shimosato K, Watanabe S, Katsura M and Ohkuma S. Role of cerebral spermidine in the development of sensitization to convulsant activity of cocaine and lidocaine. *Brain Res* 1977; 775(1-2): 198-202.
42. Sutala T, Harrisson C and Steward O. Chronic epileptogenesis induced by kindling of the entorhinal cortex: The role of the dentate gyrus. *Brain Res* 1986; 385(2): 291-9.
43. Sutula TP. Experimental models of temporal lobe epilepsy: New insights from the study of kindling and synaptic reorganization. *Epilepsia* 1990; 31(3): 45-54.
44. Ueda Y and Tsuru N. Simultaneous monitoring of the seizure-related changes in extracellular glutamate and gamma-aminobutyric acid concentration in bilateral hippocampi following development of amygdaloid kindling. *Epilepsy Res* 1995; 20(3): 213-219.