



● مقالات تحقیقی (۷)

نقش میزان روی در بروز تشنج و تعیین میزان روی هیپوکامپ در موشهای صحرائی

چکیده

اثر وضعیت روی غذا در گسترش تشنج صرعی و نیز میزان روی هیپوکامپ در سه دسته موش صحرائی که رژیم روی بالا، روی مناسب و آب معمولی مصرف می‌کردند، با استفاده از اسپکتروفتومتر جذب اتمی بررسی شد. نود موش صحرائی در سه گروه مختلف از نظر میزان روی مصرفی در آب به مدت ده هفته مورد بررسی و آزمایش قرار گرفتند. ایجاد تشنج با استفاده از تزریق داخل پریتون کلریدلیتیوم و پیلوکارپین در موشها انجام شد. نتایج بدست آمده از طریق آنالیز واریانس و آزمونهای پس از آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

بروز تشنج با بالارفتن میزان روی کاهش می‌یابد. بالا رفتن روی با افزایش قابل ملاحظه محتوی روی هیپوکامپ همراه بود. این نتایج نشان می‌دهد که روی ممکن است یک اثر پیشگیری کننده در گسترش تشنج داشته باشد و نقش مهمی را در پاتوفیزیولوژی تشنج صرعی به عهده داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: روی، هیپوکامپ، صرع، تشنج

انسانها می‌باشند [۱].

صرع به عنوان یک بی‌نظمی دوره‌ای سیستم عصبی بدنبال یک تخلیه ناگهانی شدید بیمارگونه نوروئهای مغزی اتفاق می‌افتد. این تخلیه باعث اختلال در حس از دست دادن هوشیاری، اختلال در عملکرد

مقدمه

صرع یکی از قدیمی‌ترین بیماریهایی است که بشر آنرا شناخته است اختلالات تشنجی یا صرعهها یک مشکل سلامتی در

دکتر سید شهاب‌الدین صدر

دانشیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

دکتر علیرضا شعبانزاده

استادیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

فرزانه آزاد

کارشناس ارشد دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

علی احدی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی



جدول شماره (۱): درجه بندی رفتار تشنجی

| درجه بندی | نوع رفتار تشنجی | ردیف |
|-----------|-----------------------------------|------|
| ++ | تشنج کامل تونیک - کلونیک | ۱ |
| + | تشنج ناقص (بی حرکتی، خیره شدن) | ۲ |
| +- | اسپاسم عضلانی و یا حرکت سریع پاها | ۳ |

۳۰ meq/kg داخل پریتون و بیست ساعت بعد توسط تزریق ۵۰ meq/kg پیلوکاریپین داخل پریتون انجام می‌گردید [۹].

بعد از تزریق دارو موشها از نظر بروز رفتارهای تشنجی مورد بررسی قرار می‌گرفتند و بر اساس معیارهای استاندارد رفتارهای تشنجی درجه بندی می‌شد.

در موش تشنجی ایجاد نمی‌شد. در مرحله بعد سر موشها با استفاده از گیوتین بریده میشد و به طریق زیر مغز آنها بیرون آورده می‌شد.

موش به سمت بالا نگه داشته می‌شود و یک برش کوچک بین گوشها ایجاد می‌شود. از طریق این برش پوست سر از جلو بطرف بینی و از پشت به سمت اندامهای قدامی بریده می‌شود.

در مرحله بعد پوست را کنار زده و استخوان جمجمه را به آرامی بریده و بر می‌داریم. بعد از بیرون آوردن مغز آنرا از وسط در سطح ساژیتال برش می‌زنیم. بعد از برداشتن قشر مغز هیپوکامپ در زیر آن نمایان می‌گردد که آنرا به آهستگی برش داده بر می‌داریم. هیپوکامپ جدا شده را له کرده هموژنیزه می‌کنیم و مواد زیر را به آن اضافه می‌نماییم:

۱- ۵۰ میکرولیتر محلول اسید سیتریک اشباع

بیماری صرع شیوع بالایی داشته و مشکلات زیادی را برای افراد مبتلا ایجاد می‌کند.

در این مطالعه سعی شده که اثر عنصر روی را در بروز تشنج بررسی کرده و نیز ارتباط سطح روی هیپوکامپ در ایجاد تشنج مورد ارزیابی قرار گیرد. امروزه در مورد اثر روی نظرات مختلفی وجود دارد. لذا ما در صدد هستیم که در حد توان در مشخص نمودن اثر این عنصر مؤثر باشیم.

روش کار

در این مطالعه نود موش صحرایی در محدوده وزنی ۳۵۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. موشها در محیط بادمای ثابت و نیز رطوبت ثابت با دوازده ساعت تاریکی و روشنایی نگهداری شدند.

در شروع آزمایش ظروف آب توسط اسید نیتریک ۱۰ درصد شسته شد و سپس با آب مقطر آبکشی گردید. در هفته اول جهت عادت کردن موشها از آب معمولی استفاده گردید. در شروع آزمایش و نیز هر هفته موشها وزن می‌شدند.

حیوانات بطور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند که در هر گروه ۳۰ حیوان قرار گرفت. هر گروه تحت رژیم آبی خاصی قرار داده شد. به رژیم آب گروه اول روی به میزان ۳۸ meq/kg اضافه شد که این میزان حد استاندارد می‌باشد. گروه دوم در رژیم آب خود روی به میزان ۲۴۸ meq/kg داشتند و گروه سوم از آب معمولی استفاده می‌کردند [۸].

در هفته چهارم بعد از شروع رژیم آبی خاص از هر گروه سه حیوان انتخاب گردید که دو حیوان اول از طریق زیر با استفاده از دارو صرعی می‌شدند.

ایجاد صرع از طریق تزریق کلرید لیتیوم

روانی، حرکات تشنجی یا ترکیبی از اینها می‌گردد [۲].

بیش از پنجاه میلیون انسان مبتلا به صرع در جهان وجود دارد که تشنج آنها توسط داروهای استاندارد ضد صرعی می‌تواند کنترل گردد (۲۵ درصد افراد مبتلا به صرع، نسبت به دارو مقاوم هستند) [۳].

سیناپسهای تحریکی نقش مهمی را در عملکردهای اساسی سیستم عصبی مرکزی دارند. یک اختلال کوچک انتقالی در کارایی انتقالهای تحریکی یا در تعادل بین تحریک و مهار باعث تشنج می‌گردد. متابوتروپیک گلوتامات به عنوان یک جزء تعدیلی در سیناپسهای مهارتی و تحریکی عمل می‌کند. مدارهای این گیرنده‌ها نقشهای حیاتی داشته و تغییر در آنها باعث تشنج در مغز می‌گردد [۴].

فرضیه دیگری بیان می‌کند که طبیعت باقی ماندن صرع پایدار به این دلیل است که تشنج طولانی باعث کاهش پیشرونده در مهار عملکرد GABA در هیپوکامپ شده و در نهایت باعث گسترش صرع پایدار می‌گردد [۵].

عنصر روی در ساختار تعداد زیادی از آنزیمهای مهم شرکت دارد از این طریق می‌تواند در عملکردهای متابولیک بطور غیر مستقیم تأثیر بگذارد [۶]. روی مشابه یک واسطه سیگنالهای سلول به سلول در سیستم عصبی مرکزی عمل می‌کند. مغز پستانداران محتوی غلظت بالای روی است که در پایانه‌های گلوتامات ارژیک بوده و با فعالیت نوروئی آزاد می‌گردد. آزاد شدن درون زاد روی باعث تغییر رفتار تعدادی از کانال‌های گیرنده‌ها می‌شود. بخصوص باعث مهار گیرنده NMDA^(۱) می‌شود [۷].

با توجه به مطالب ذکر شده بنظر می‌رسد که عنصر روی در مبحث صرع نقش داشته باشد



۱- NMDA: N-Methyl Diastartate

جدول شماره (۲): میانگین درجه تشنج و میزان روی در گروه‌های سه گانه

| هیپوکامپ | گروه آب معمولی (خطای استاندارد ±) میانگین | گروه روی (خطای استاندارد ±) میانگین | گروه روی بالا (خطای استاندارد ±) میانگین |
|----------------|---|---|--|
| روی (Zn) | ۳۹/۵۲ (±۸۵۵) | ۶۷/۲۰ (±۲۰/۳۹) | ۱۵۶/۳۷ (±۳۲/۶۳) |
| امتیاز (Score) | ۲۲/۸۰۰ (±۵/۹) | ۲۰/۵۸ (±۵/۷۶) | ۱۳/۳۰ (±۵/۷۶) |

بحث و نتیجه‌گیری

صرعها گروهی از اختلالات هستند که با تغییرات مزمن، عودکننده و پاروکسیسمال کارکرد نورولوژیک در اثر اختلال در فعالیت الکتریکی مغز بوجود می‌آیند [۱۰]. صرع با بیماری زایی طولانی و یا مرگ و میر حاد ارتباط دارد. بعلاوه دوره‌های پشت سر هم صرع در عملکرد و آناتومی سیستم عصبی مرکزی عوارض طولانی مدت و ویرانگری دارد [۱۱].

در تحقیقات مکانیسم سلولی بار تحریک پذیری زیاد اپی لپسی شواهدی وجود دارد که اپی لپسی با اختلال در مهار نورونی ارتباط دارد و باتوجه به اینکه گیرنده مهار سریع را در سیستم عصبی مرکزی واسطه‌گری می‌کند بنظر می‌رسد که ممکن است در پاتولوژی این بیماری نقش داشته باشد.

امروزه شواهدی وجود دارد که از نقش گلوتامات در شروع و افزایش فعالیت‌های تشنجی حمایت می‌کند آنتاگونیستهای گیرنده‌های NMDA و غیر NMDA ثابت شده است که فعالیت ضد تشنجی دارند [۳].

روی ماده معدنی اساسی با غلظت بالایی در هیپوکامپ بخصوص اکسونهای فیبرخزهای نورونهای دانه دار شکنج دندانه‌ای دیده می‌شود. روی که در

توجه به هفته‌های مختلف رژیم مصرف روی تنظیم می‌گردد.

نتایج

به منظور مقایسه اثر رژیم‌های مختلف در میزان تشنج و میزان روی هیپوکامپ ارقام بدست آمده توسط نرم‌افزار SPSS با استفاده از آزمونهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در جدول شماره ۲ میانگین (+ خطای استاندارد) گروه‌های سه گانه از نظر رژیم مصرفی روی از نظر میزان روی در هیپوکامپ و درجه تشنج بررسی شده است. همانطور که در جدول شماره ۳ مشاهده می‌گردد میزان روی در گروه‌های متفاوت دارای اختلاف معنی داری است ($P < 0/05$). همچنین اثر تشنج در میزان روی هیپوکامپ باعث ایجاد یک اختلاف معنی دار شده است ($P < 0/05$) و همچنین اثر تداخلی ایندو نیز در میزان روی هیپوکامپ تفاوت معنی داری ایجاد کرده است ($P < 0/05$).

در جدول شماره ۴ اثر زمان و نیز گروهها بر درجه تشنج موشها مورد بررسی قرار گرفته است. همانطور که ملاحظه می‌گردد زمان تغییر معنی داری بر میزان درجه تشنج ایجاد کرده است ($P < 0/05$) و نیز اثر گروه‌های مختلف بر درجه تشنج معنی دار بوده است.

۲- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۰۳ درصد دای تیزون در تتراکلرید کربن
۳- ۲۰۰ میکرولیتر از محلول یک مولار آمونیوم دی هیدروژن فسفات
نمونه بمدت بیست دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و یک محلول هموزن جهت دادن به دستگاه به دست آمد.

اندازه‌گیری روی هیپوکامپ با استفاده از تکنیک جذب اتمی فاقد شعله و توسط دستگاه جذب اتمی شیمادزو مدل G-6۸۰ مجهز به کوره گرافیتی GFA-4B انجام گرفت. پس از اینکه دستگاه برای طول موج روی (۲۱۳۹ آنگستروم) تنظیم گردید. هر یک از محلولهای استاندارد روی به ترتیب از غلظت پایین به بالا سه بار و در هر مرحله ۱۰ میکرولیتر بداخل کوره حرارتی تزریق گردید. و در صورتی که اختلاف سه منحنی جذبی محلول تزریقی بیشتر یا مساوی ۲۰ درصد باشد مرحله چهارم و پنجم تزریق هر استاندارد را انجام داده تا اختلاف کمتر از ۲۰ درصد بدست آید.

سپس دستگاه بطور خودکار منحنی استاندارد را رسم می‌کند. این نمودار به صورت خطی ارتباط غلظت روی و میزان جذب نوری محلول را نشان می‌دهد. لذا با اندازه‌گیری جذب محلولهای مجهول و بکارگیری نمودار استاندارد می‌توان غلظت آنها را بدست آورد.

دقت و حساسیت دستگاه مورد استفاده نسبت به اندازه‌گیری روی در حد ppb است. در این تحقیق از لامپ دوتریوم برای تصحیح جذبه‌های نوری پس زمینه‌ای استفاده شده است.

مراحل فوق در هفته‌های بعد تا ده هفته انجام می‌گردد.

درجه تشنج موشها بر اساس جدول زیر با



جدول شماره (۳): بررسی اثر زمان، گروه و تشنج در میزان روی هیپوکامپ

| مقدار P | کسر F | میانگین مربعها | درجه آزادی | جمع مربعها | گروه‌های بررسی |
|---------|---------|----------------|------------|------------|-------------------|
| ۰/۵۱۴ | /۹۳۰ | ۱۳۲/۶۶۴ | ۹ | ۱۱۹۳/۹۷۲ | گروه پیگیری |
| ۰/۰۰۰ | ۱۴۹/۳۹۳ | ۲۱۳۱۷/۰۹۳ | ۲ | ۴۲۶۳۴/۱۸۶ | گروه آزمون |
| ۰/۰۰۰ | /۵۶۱ | ۸۰/۰۰۰ | ۱ | ۸۰/۰۰۰ | گروه تشنجی |
| ۰/۲۰۸ | ۱/۳۸۷ | ۱۹۷/۹۰۹ | ۱۸ | ۳۵۶۲/۳۶۹ | گروه پیگیری |
| ۰/۶۲۲ | /۷۹۷ | ۱۱۳/۷۵۰ | ۹ | ۱۰۲۳/۷۵۰ | گروه پیگیری تشنجی |
| ۰/۰۰۰ | /۰۷۱ | ۱۰/۱۳۷ | ۲ | ۲۰/۲۷۵ | گروه تشنجی |
| ۰/۶۶۷ | /۸۱۸ | ۱۱۶/۷۸۱ | ۱۸ | ۲۱۰۲/۰۵۸ | F G C |

جدول شماره (۴): بررسی اثر زمان و گروهها در درجه تشنج

| کسر F | میانگین مربعها | درجه آزادی | جمع مربعها | گروه‌های بررسی |
|--------|----------------|------------|------------|----------------|
| ۶/۷۷۵ | ۸۰۴/۵۹۳ | ۹ | ۷۲۴۱/۳۳۳ | گروه پیگیری |
| ۲۲/۳۸۸ | ۲۶۵۸/۷۶۳ | ۲ | ۵۳۱۷/۵۲۵ | گروه آزمون |

یون روی در پایانه‌های نورونی بوده در حین فعالیت نورونی در فضای خارج سلولی آزاد می‌گردد افزایش سطح روی آزاد شده ضمن فعالیت شدید ممکن است که با صدمه توکسیک مشاهده شده ارتباط داشته باشد.

یونهای روی با غلظت بالایی در فیبرهای خزه‌ای هیپوکامپ هستند ثابت شده است که روی در طی تحریک هیپوکامپ بداخل فضای خارج سلولی آزاد می‌گردد.

آصف و همکارانش در سال ۱۹۸۴ نیز نتیجه مشابهی بدست آوردند. در حیواناتی با تزریق اسید کاینیک دچار تشنج شده بودند میزان روی هیپوکامپ کمتر بود بنابراین فرض می‌شود که حین تشنج محتوی روی هیپوکامپ تخلیه می‌گردد.

نتیجه دیگر بدست آمده در مطالعه ما اثر گروهها در درجه تشنج می‌باشد. امتیازات بالاتر نشانه تشنج شدیدتر و اسکور کمتر نشانه تشنج کمتر می‌باشد. گروهها از نظر رژیم غذایی روی باهم تفاوت داشتند بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که دریافت روی با میزانهای متفاوت می‌تواند بر میزان تشنج تأثیر بگذارد. حیواناتی که روی با غلظت بالا می‌گرفتند تشنج کمتری را نسبت به سایر حیوانات نشان دادند.

نتیجه بدست آمده توسط سایر مطالعات

می‌کردند در مقایسه با دو گروهی که از رژیم مناسب و بالا برخوردار بودند مشاهده کردند. این کاهش در نواحی هیپوکامپ دیده می‌شود اما در نواحی آمیگدال، دم دار، پوتامن و سپتوم هیچ اختلافی وجود نداشت [۱۲].

فیبرهای خزه‌ای نورونهای دانه دار شکنج دندانهای هیپوکامپ محتوی روی با غلظت بالا می‌باشد [۱۲]. نسینگ و همکارانش در سال ۱۹۷۸ در بررسی اثر رژیم غذایی با روی کم در محتوی روی فیبر خزه‌ای هیپوکامپ دیدند حیواناتی که با رژیم روی کم تغذیه می‌شدند کاهش قابل ملاحظه‌ای از محتوی روی در نواحی مختلف نشان می‌دهند [۱۲].

نتیجه دیگر بدست آمده اختلاف معنی‌دار تشنج در میزان روی هیپوکامپ بود. حیواناتی که تشنج کرده بودند نسبت به حیواناتی که در آنها تشنج ایجاد نشده بود از نظر میزان روی هیپوکامپ اختلاف معنی‌داری را نشان دادند.

پایانه‌های فیبر خزه‌ای تجمع یافته نقش مهمی را در تنظیم میانجی عصبی هیپوکامپ بر عهده دارد. به هر حال فعال شدن سلولهای دانه دار شکنج دانه‌ای با تحریک الکتریکی باعث تسهیل برداشت و آزاد شدن روی از هیپوکامپ شده که نشانگر این است که برداشت مجدد متابولیک روی به تحریک الکتروفیزیولوژیک حساس است [۱۲].

یکی از نتایجی که در مطالعه مابه دست آمد اثر معنی‌دار میزان مصرف روی بر محتوی روی هیپوکامپ بود بنظر می‌رسد که افزایش مصرف روی در رژیم غذایی باعث بالا رفتن میزان روی در هیپوکامپ می‌شود.

فوکاهیروراتیو در سال ۱۹۹۰ [۱۲] در رابطه با بررسی میزان روی هیپوکامپ تحقیقی انجام دادند، دیدند که میزان روی هیپوکامپ در حیواناتی که روی با دوز بالا می‌گرفتند بیشتر از حیواناتی بود که روی با دوز استاندارد یا کمتر از حد عادی استفاده

این نتایج ثابت کرد که بروز تشنج در موش‌های صحرایی قابل تنظیم می‌باشد. تشنج که در کاهش روی ایجاد شده با تهیه و کافی شدن روی مهار می‌گردد [۱۲]. ■

همچنین در مطالعه نوکاهوری و اتیو دیده شد که بروز تشنج با کاهش روی افزایش می‌یابد در حالی که افزایش روی باعث کاهش بروز تشنج می‌گردد. به هر حال

نیز تأیید می‌گردد. فلر و همکاران در سال ۱۹۹۱ طی تحقیقی که انجام دادند یک ارتباط معکوس و مشخص را بین روی فیبر خزه‌ای هیپوکامپ و بروز تشنج در موشهایی که تشنج ناشی از قطع الکل داشتند نشان دادند.

مراجع

1. Seyferied TN, Glasver GH. A review of mouse mutants as genetic models of epilepsy. *epilepsia* 1985;26: 143-150.
2. Adams RD, Victor M, Rapper A. Principles of Neurology. Boston: MC Grow Hill; 1997.
3. Portes R, Chadwick D. The epilepsy. Boston: Rutterworth, Heinemann. 1997.
4. Engel J, Pedley TA. Epilepsy a Comprehensive Text Book. Philadelphia: lippincott Raven, 1998.
5. Kapur M, Macdonald R C. Rapid seizure- induced reduced reduction of benzodiazepine and Zn sensitivity of hippocampal dentate granule cell GABAA receptors. *J Neurosci.* 1997; 17: 7532-7540.
6. Berg JM. The galvanization of biology a gnwing appreciation for the rols of Zinc. *Science* 1996; 271: 1081-1082.
7. Sensi SL Canzoniero Ln, Ping YS, et al. Measurment of intracellular Zinc in living cortical neurons: Routes of entery. *Journal Neuresci* 1997;17: 9554-9564.
8. Fukahorc M, Masatoshc I. Effects of dietary zinc on seizure suseptibility and hippocampal zinc content in the EL mouse. *Brain Res* 1990;529: 16-22.
9. Kapur J, Macdnald RL. Rapid Seizure induced reduction of benzodiazepine and Zn sensitivity of hippocampal dentate granule cell GABAA receptors. *Neuroscience* 1997; 17(19): 7532- 7540.
10. Dichts MA, Faucl AS, Braundwald E, et al. Principles of Internal Mdicine. New York : Mc Graw hill, 1998.
11. Coulter DA. Chronic epileptogenic cellular alterations in the limbic system after status epilepticus. *Epilepsia* 1999; 40(suppl1): 523-533.
12. Fukahori M, Itoh M. Effects of dietary Zinc status on Seizures Susceptibility and hippocampal zinc content in the El(epilepsy) mouse. *Brain Res* 1990; 529: 16-22.
14. Asser SY, Chung ehin Ho. Release of endogenous Zn from brain tissue duing activity. *Nature* 1984; 308: 734-736.
15. Feller DJ, Teso O, Savang D. Hippocampal mossy fiber deficient in mice genetically selected for ethanol withdarwal seizure suceptibility. *Brain Res* 1991; 545: 73-79.
13. Wensink J, lenglet W, Vis RD, et al. The effects of dietary zinc deficiency on the mossy fiber zinc content of the rat hippocampus. *Histochemistr* 1987; 87: 65-69. ■