

بررسی اثر مهارکننده های حذف آنزیمی اندوکانابینوئیدها بر تشنج تونیک - کلونیک ناشی از PTZ

پریسا زارعی (MSc)^۱، مهدی صادق (PhD)^{۲*}، محمدرضا پالیزوان (PhD)^۱

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

دریافت: ۹۵/۳/۵، اصلاح: ۹۵/۵/۶، پذیرش: ۹۵/۷/۶

خلاصه

سابقه و هدف: در سالهای اخیر تلاشهای زیادی برای یافتن روشهای درمانی نوین و همچنین درمان بیماران صرع مقاوم به دارو انجام شده است. آناندامیدها (Anandamides; AEA) و دی-آرشیدونیل گلیسرول (2-Arachidonoylglycerol; 2-AG) دو لیگاند اصلی و مهم سیستم اندوکانابینوئیدی هستند که هر کدام طی مسیرها، آنزیمی مشخصی تولید و حذف می شوند. با توجه به فراوانی و اهمیت این دو لیگاند اندوکانابینوئیدی به نظر می رسد می توان با دستکاری فارماکولوژیک در این مسیرهای سطح این دو لیگاند اصلی سیستم اندوکانابینوئیدی را در مغز تغییر داد. لذا این مطالعه به منظور بررسی اثر مهارکننده های حذف آنزیمی اندوکانابینوئیدها بر تشنج تونیک - کلونیک ناشی از PTZ انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ۳۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در ۴ گروه آزمایشی بررسی شدند. تشنجات تونیک - کلونیک با یک تزریق PTZ (۱۵ mg/kg, i.p) ایجاد شدند. مهار حذف آناندامیدها با تزریق URB و LY (۲.۵ mg/kg, i.p) و مهار تجزیه دی-آرشیدونیل گلیسرول با تزریق WWL و JKK (۱ mg/kg, WWL: 5 mg/kg, i.p) محلول در DMSO حدود ۱۵ دقیقه قبل از تزریق PTZ انجام شد. در گروه شاهد PTZ به همراه DMSO تزریق شد. زمان و طول مدت هریک از پنج مرحله رفتاری تشنج به مدت ۳۰ دقیقه ثبت و بررسی شد.

یافته ها: در گروه DMSO+PTZ تاخیر زمان رسیدن به مراحل ۴ و ۵ به ترتیب 206 ± 39 و 209 ± 39 بود در حالیکه در گروه (JJKK+WWL+DMSO+PTZ) تاخیر زمان رسیدن به مراحل ۴ و ۵ به ترتیب 630 ± 159 و 726 ± 360 بود ($p < 0.05$). همچنین درصد وقوع مرحله ۵ تشنج و درصد مرگ ناشی از تشنج در گروه DMSO+PTZ ۹۱٪ بود در حالیکه در گروه (JJKK+WWL+DMSO+PTZ) هر دو شاخص کاهش و به ۵۰٪ رسیدند.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه کاربرد همزمان JJKK و WWL که مهارگرهای حذف دی-آرشیدونیل گلیسرول هستند سبب کاهش تشنج تونیک - کلونیک می شود. **واژه های کلیدی:** دی-آرشیدونیل گلیسرول، آناندامید، دی متیل سولفو کساید، صرع.

مقدمه

سلول منتقل می شوند. آنزیم FAAH (fatty-acid amide hydrolase) مسئول حذف آناندامیدها می باشد (۱۰ و ۸). دی آرشیدونیل گلیسرول عمدتاً توسط آنزیم DAGL (Diacylglycerol Lipase) در درون سلول تولید می شود و سپس به بیرون سلول منتقل می شود. آنزیمهای MAGL (Monoacylglycerol Lipase) و ABHD (Alpha Beta Hydrolase Domain) مسئول تجزیه 2-AG هستند (۱۱ و ۱۲). همچنین میزان برداشت AEA و 2-AG از محیط اطراف سیناپسی به درون سلول توسط یک ناقل کانابینوئیدی کنترل می شود (۶). با توجه به فراوانی و اهمیت این دو لیگاند اندوکانابینوئیدی و مسیرهای اصلی ذکر شده در سنتز و حذف آنها، به نظر می رسد می توان با دستکاری فارماکولوژیک در این مسیرها، سطح این دو لیگاند اصلی سیستم اندوکانابینوئیدی را در مغز تغییر داد. در یک بررسی استفاده از مهارگر آنزیم MAGL که در تجزیه 2-AG نقش دارد سبب افزایش شاخص های تشنج شد (۱۳) در حالیکه در مطالعه دیگر استفاده از مهارگر آنزیم ABHD که آنهم در تجزیه 2-AG نقش دارد سبب بهبود شاخصهای تشنج شد (۱۴). بنابراین در مطالعه حاضر اثر مهارگرهای انتخابی هر دو آنزیم دخیل در حذف

صرع یک سندرم نورولوژیک با شیوع حدود ۱٪ در انسان می باشد (۱ و ۲). افراد دچار صرع با حملات ناگهانی صرعی مواجه هستند که می تواند به شکل تشنجهای تکرار شونده بروز کند (۳ و ۱). یکی از مدل های حیوانی رایج مدل ایجاد تشنج حاد با تزریق پنتیلن تترازول (PTZ) است که یک آنتاگونیست گیرنده های GABA_A محسوب می شود. براساس گزارشهای موجود حدود ۳۰٪ از بیماران به داروهای موجود پاسخ نمی دهند و به عبارتی دچار صرع مقاوم به دارو هستند (۴-۵). در سالهای اخیر تلاشهای زیادی برای یافتن روشهای درمانی نوین و همچنین درمان بیماران صرع مقاوم به دارو انجام شده است. آناندامیدها (Anandamides; AEA) و دی-آرشیدونیل گلیسرول (2-Arachidonoylglycerol) دو لیگاند اصلی و مهم سیستم اندوکانابینوئیدی هستند که هر کدام طی مسیرهای آنزیمی مشخصی تولید و حذف می شوند (۶-۸). حضور این ترکیبات در محیط نورونی و در محل ارتباطات سیناپسی می تواند سبب اثرات تعدیلی بر عملکردهای موجود باشد (۹ و ۸). قسمت اعظم آناندامیدها توسط آنزیم N-acyl-phosphatidylethanolamide- NAPE-PLD (phospholipase D) در درون سلول تولید می شود و به سپس به فضای خارج

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد پریسا زارعی دانشجوی رشته فیزیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر مهدی صادق

آدرس: اراک، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی. تلفن: ۰۸۶-۳۴۱۷۲۰۲۵

E-mail: m.sadegh@arakmu.ac.ir

شدند. حجم تزریق در تمام گروهها برای هر حیوان ثابت و حدود ۰/۸ CC بود. گروههای مورد آزمایش شامل:

گروه اول (تزریق PTZ): تزریق تک دوز PTZ با دوز ۸۰ mg/Kg و بلافاصله بررسی مراحل تشنج به مدت ۳۰ دقیقه

گروه دوم (DMSO+PTZ): یک تزریق DMSO (غلظت ۹۹/۹٪، ۰/۸CC) بصورت داخل صفاقی انجام شد. بعد از ۱۵ دقیقه تزریق PTZ و ادامه مشابه گروه اول.

گروه سوم (DMSO+PTZ+LY+URB): یک تزریق URB (۱ mg/Kg) و LY (۲/۵ mg/Kg) به شکل محلول در DMSO انجام شد سپس ۱۵ دقیقه بعد تزریق تک دوز PTZ و ادامه مشابه گروه اول.

گروه چهارم (DMSO+PTZ+WWL+JJKK): یک تزریق JJKK (۱ mg/Kg) و WWL (۵ mg/Kg) به شکل محلول در DMSO انجام شد سپس ۱۵ دقیقه بعد تزریق تک دوز PTZ و ادامه مشابه گروه اول.

تعداد نمونه ها در گروه PTZ برابر ۱۲ در گروه DMSO+PTZ برابر ۱۱ و در گروههای آزمایش برابر ۶ می باشد

تجزیه و تحلیل آماری داده ها: نرم افزار آماري GraphPad Prism برای تحلیل آماری بکار گرفته شد. داده هایی که از نوع پارامتریک بودند با آزمون One-way ANOVA و سپس آزمون تکمیلی Bonferroni مقایسه و تحلیل آماری شدند. داده های غیرپارامتریک با آزمون Kruskal-wallis و آزمون تکمیلی Dunns مقایسه و تحلیل آماری شدند و $p < 0/05$ معنی داری در نظر گرفته شد. داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده اند.

یافته ها

تزریق JJKK+WWL قبل از تزریق PTZ سبب تاخیر در بروز مراحل ۴ و ۵ تشنج شد در حالیکه تزریق URB+LY مدت زمان مرحله ۵ را افزایش داد. نتایج نشان داد که DMSO بر زمان رسیدن به مراحل ۱ و ۲ تشنج موثر است بطوریکه زمان رسیدن به مرحله ۱ تشنج $(44/0 \pm 5/3)$ ثانیه) در گروه (DMSO+PTZ) نسبت به گروه (PTZ) $(11/9 \pm 1/2)$ ثانیه) بطور معنی داری افزایش را نشان می دهد ($p < 0/001$ برای S1L)، همچنین زمان رسیدن به مرحله ۲ تشنج $(98/7 \pm 18/7)$ ثانیه) در گروه (DMSO+PTZ) نسبت به گروه (PTZ) $(32/3 \pm 4/3)$ ثانیه) بطور معنی داری افزایش یافته است ($p < 0/05$ برای S2L) (شکل ۱-A,B). با این وجود DMSO بر زمان رسیدن به مراحل ۳ تا ۵ و طول دوره این مراحل تاثیر معنی داری نداشت. بررسی آماری نشان داد که گروه دریافت کننده JJKK+WWL (۵ JJKK: 1 mg/kg, WWL: 5 mg/kg) بصورت محلول در DMSO حدود ۱۵ دقیقه قبل از تزریق PTZ در مقایسه با گروهی که قبل از PTZ فقط DMSO دریافت کرده بودند بصورت معنی داری دیرتر به مرحله ۴ و ۵ تشنج تونیک کلونیک رسیدند ($p < 0/05$) (شکل ۱-D,E). درحالیکه گروه دریافت کننده (LY: 2.5 mg/kg, URB: 1 mg/kg) بصورت محلول در DMSO قبل از تزریق PTZ در مقایسه با گروهی که فقط DMSO قبل از PTZ دریافت کرده بودند بصورت معنی داری دوره تشنج تونیک - کلونیک طولانی تری دارند (شکل ۱-H). تزریق

AG-۲ در کنار هم مورد بررسی قرار گرفته است همچنین اثر مهارگرهای حذف آناندامیدها نیز بر بروز تشنجات صرعی مدل PTZ بررسی شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر مهارکننده های حذف آنزیمی اندوکائینوئیدها بر تشنج تونیک- کلونیک ناشی از PTZ می باشد.

مواد و روشها

حیوانات: در این مطالعه تجربی از موشهای صحرایی نر ویستار با وزن ۱۷۰ تا ۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد (دمای ۲۲-۲۵ درجه و ۱۲ ساعت روشنایی- ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. غذا و آب به جز در هنگام آزمایش به شکل آزاد در اختیار قرار داشت. حیوانات بصورت تصادفی در گروههای آزمایش قرار گرفتند و حجم نمونه متناسب با مطالعات مشابه ۵-۸ موش صحرایی در هر گروه انتخاب شد (۱۵و۱۶). اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق پروتکل مصوب کمیته اخلاق منطقه ای مستقر در دانشگاه علوم پزشکی اراک رعایت شد.

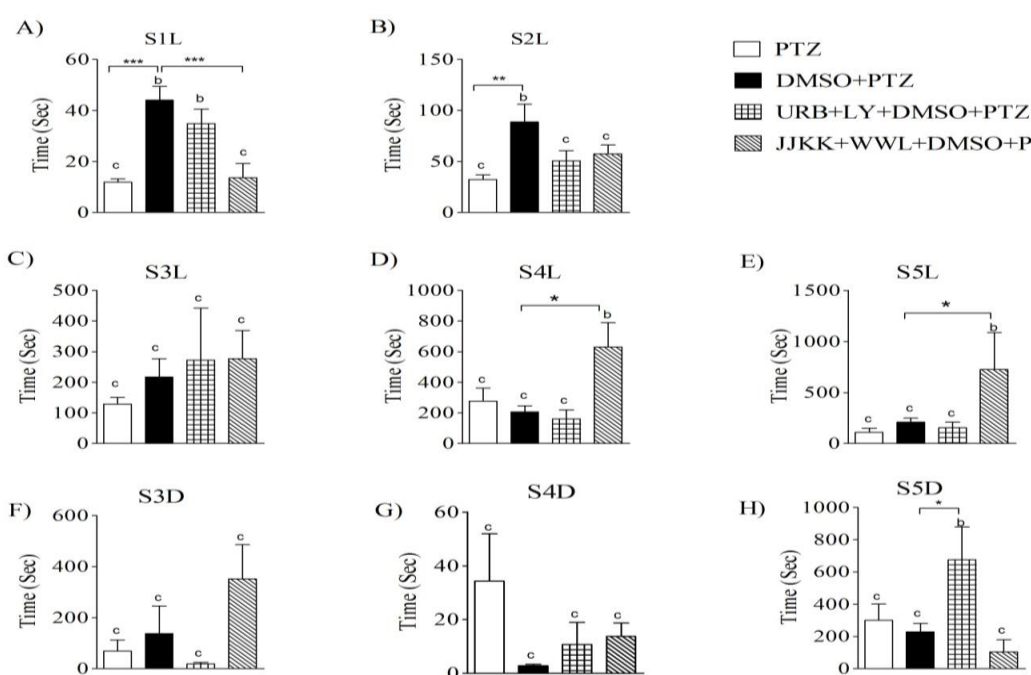
روش ایجاد و بررسی تشنج: برای ارزیابی رفتارهای تشنجی، داروی PTZ (پنتیلین تترازول، از شرکت Sigma-Aldrich) یکبار با غلظت (۸۰ mg/kg) به شکل داخل صفاقی (۱۷)، در گروه PTZ به تنهایی و یا در گروههای دارو و حلال ۱۵ دقیقه پس از دارو یا حلال به حیوان تزریق شد. پس از تزریق PTZ، حیوان در یک جعبه پلکسی گلاس (به ابعاد: ۳۵*۳۵*۳۵ سانتی متر) قرار داده شد و رفتارهای حیوان برای مدت ۳۰ دقیقه تحت نظر قرار گرفت و بروز مراحل رفتاری تشنج یادداشت شد. تمام مراحل تزریق و ثبت مشاهدات رفتاری توسط یک فرد ثابت و آموزش دیده صورت گرفت.

تقسیم بندی مراحل تشنج (۱۸و۱۹): مرحله یک: انقباضات عضلات دهان و صورت. مرحله دو: انقباض و حرکات عضلات سر و گردن. مرحله سوم: انقباضات دست ها. مرحله چهار: انقباضات دست ها و ایستادن روی دو پا. مرحله پنجم: ایستادن روی دو پا به همراه افتادن به پهلو. مدت زمان رسیدن به هر مرحله، مدت زمان طول کشیدن مراحل ۳ تا ۵، تعداد دفعات وقوع هر مرحله و میزان مرگ در حیوانات اندازه گیری و برای تحلیل ثبت شد.

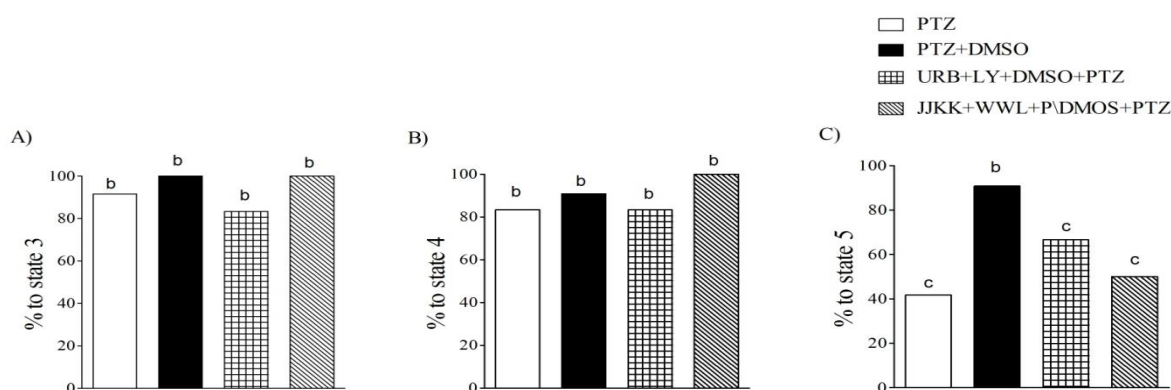
داروها و گروه های آزمایش: داروهای مورد استفاده شامل مهارگرهای حذف برداشت آناندامیدها و AG-۲ بودند. برای افزایش سطح آناندامیدها دو مهارگر مورد استفاده عبارت بودند از: URB597 (Santa Cruz Biotech, US) بعنوان مهارگر آنزیم FAAH که در تجزیه آناندامیدها نقش کلیدی دارد. این مهارگر بصورت ۱ mg/kg استفاده شد (۲۰و۲۱). همچنین LY2183240 (Tocris, US) بعنوان مهارگر ناقل بازجذب آناندامیدها به مقدار ۲/۵ mg/kg در کنار URB597 استفاده شد (۲۲و۲۳). برای افزایش سطح AG-۲ دو مهارگر مورد استفاده عبارت بودند از: JJKK048 (Tocris, US) بعنوان مهارگر آنزیم MAGL که به مقدار ۱ mg/kg استفاده شد (۲۴). در کنار آن WWL70 (Tocris, US) بعنوان مهارگر آنزیم ABHD بصورت 5 mg/kg استفاده شد (۲۵و۲۶). این دو آنزیم در تجزیه AG-۲ نقش اساسی دارند بخصوص MAGL. هر چهار مهارگر به شکل محلول در (DMSO) dimethyl solfoxide (۹۹/۹٪ Sigma-Aldrich), بعنوان حلال با تزریق داخل صفاقی ۱۵ دقیقه قبل از PTZ استفاده

کلونیک موثر است. تزریق JKKK+WWL و URB+LY داخل صفاقی قبل از PTZ تأثیری در بروز مراحل تشنج نداشت. میانگین مرحله تشنجی بروز یافته در چهار گروه (PTZ)، (DMSO+PTZ)، (PTZ)، (DMSO+PTZ) و (URB+LY+DMSO+PTZ) به ترتیب $(4/1 \pm 0/3)$ ، $(4/8 \pm 0/2)$ ، $(4/3 \pm 0/5)$ و $(4/5 \pm 0/2)$ بود. تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود نداشت (شکل ۳). درصد وقوع مرگ در چهار گروه (PTZ)، (DMSO+PTZ)، (URB+LY+DMSO+PTZ) و (JKKK+WWL+DMSO+PTZ) به ترتیب (33%) ، (90%) ، (50%) و (50%) بود. همانگونه که مقادیر عددی نشان می‌دهد میزان مرگ و میر در گروه‌های (URB+LY+DMSO+PTZ) و (JKKK+WWL+DMSO+PTZ) نسبت به گروه (DMSO+PTZ) 40% کاهش یافته است (شکل ۴) که تأثیر قابل ملاحظه‌ای است.

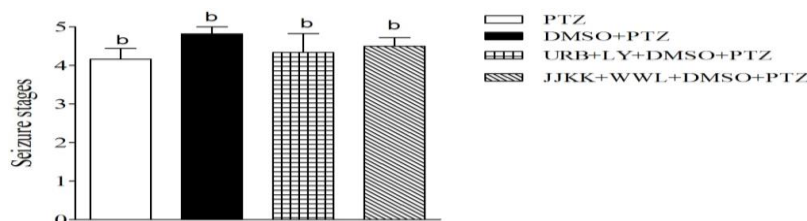
JKKK+WWL قبل از PTZ درصد وقوع مرحله ۵ تشنج را کاهش داد. درصد وقوع مرحله ۳ در چهار گروه (PTZ)، (DMSO+PTZ)، (URB+LY+DMSO+PTZ) و (JKKK+WWL+DMSO+PTZ) به ترتیب 91% ، 100% ، 83% و 100% بود (شکل A-۲) که تفاوت چشمگیری بین گروه‌ها دیده نمی‌شود. درصد وقوع مرحله ۴ در همین چهار گروه به ترتیب 83% ، 91% ، 100% و 83% بود (شکل B-۲) که در این مورد هم تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین گروه‌ها وجود ندارد. درصد وقوع مرحله ۵ در گروه‌های بالا به ترتیب 41% ، 90% ، 66% و 50% بود. کاهش 40% وقوع مرحله ۵ در گروه (JKKK+WWL+DMSO+PTZ) نسبت به گروه (DMSO+PTZ) قابل توجه می‌باشد (شکل C-۲). همانگونه که داده‌های ارائه شده نشان می‌دهد، ظاهراً تزریق JKKK+WWL قبل از PTZ بر وقوع مرحله تشنجات تونیک



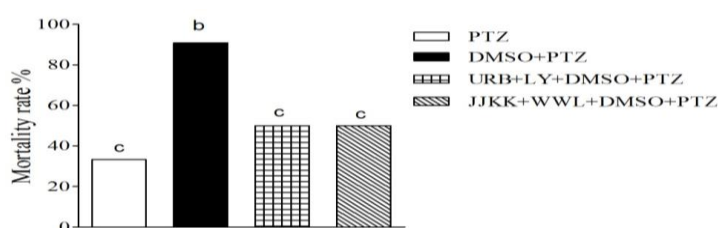
شکل ۱. تزریق JKKK+WWL قبل از تزریق PTZ سبب افزایش معنی‌داری در تأخیر بروز مراحل ۴ و ۵ تشنج شد. حروف غیر مشابه روی ستون‌ها معنی‌داری و حروف مشابه عدم معنی‌داری گروه‌ها را نشان می‌دهد. $p < 0/05$ ، $p < 0/01$ و $p < 0/001$ در گروه PTZ برابر ۱۲ در گروه DMSO+PTZ برابر ۱۱ و در گروه‌های آزمایش برابر ۶ می‌باشد.



شکل ۲. تزریق JKKK+WWL قبل از تزریق PTZ سبب کاهش درصد وقوع مرحله حملات تونیک-کلونیک شد. در قسمت (C) درصد وقوع مرحله ۵ تشنج بصورت چشمگیری در گروه‌های (JKKK+WWL+DMSO+PTZ: 50%) و (URB+LY+DMSO+PTZ: 66%) نسبت به گروه (DMSO+PTZ: 91%) کاهش یافته است. حروف غیر مشابه روی ستون‌ها معنی‌داری و حروف مشابه عدم معنی‌داری گروه‌ها را نشان می‌دهد. n در گروه PTZ برابر ۱۲ در گروه DMSO+PTZ برابر ۱۱ و در گروه‌های آزمایش برابر ۶ می‌باشد.



شکل ۳. تزریق JJKK+WWL و URB+LY داخل صفاقی ۱۵ دقیقه قبل از تزریق PTZ تاثیر معنی داری در بروز مراحل تشنج نداشت. مقایسه میانگین مرحله تشنجی سه گروه با هم از طریق آزمون آماری Kruskal-Wallis و آزمون تکمیلی Dunn نشان داده شده است. داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده اند. حروف غیر مشابه روی ستونهای معنی داری و حروف مشابه عدم معنی داری گروهها را نشان می دهد. n در گروه PTZ برابر ۱۲ در گروه DMSO+PTZ برابر ۱۱ و در گروههای آزمایش برابر ۶ می باشد.



شکل ۴. تزریق JJKK+WWL و URB+LY قبل از تزریق PTZ سبب کاهش درصد مرگ بعد از حمله تونیک - کلونیک شد. درصد وقوع مرگ در چهار گروه آزمایش نشان داده شده است. درصد وقوع مرگ از ۹۱٪ در گروه (DMSO+PTZ) به ۵۰٪ در گروههای دریافت کننده JJKK+WWL و URB+LY کاهش یافته است. داده ها بصورت درصد بیان شده است. حروف غیر مشابه روی ستونهای معنی داری و حروف مشابه عدم معنی داری گروهها را نشان می دهد. n در گروه PTZ برابر ۱۲ در گروه DMSO+PTZ برابر ۱۱ و در گروههای آزمایش برابر ۶ می باشد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه نشان داد تزریق سیستمیک JJKK+WWL می تواند شاخص های تشنج تونیک کلونیک را بصورت قابل ملاحظه ای کاهش دهد. تاخیر زمانی رسیدن به مراحل ۴ و ۵ تشنج افزایش معنی داری داشت بعلاوه درصد وقوع مرحله ۵ تشنج تونیک- کلونیک و درصد مرگ ناشی از تشنج نیز در اثر تزریق JJKK+WWL کاهش چشمگیر یافت. در این مطالعه از WWL70 بعنوان مهارگر قدرتمند آنزیم ABHD و از JJKK048 بعنوان مهارگر اختصاصی و قوی MAGL استفاده کردیم. آنزیمهای ABHD و MAGL دو جزء کلیدی در حذف ۲-AG می باشند. بنابراین استفاده از این دو مهارگر در کنار هم می تواند سبب افزایش سطح ۲-AG شود. نتایج این مطالعه نشان داد تزریق داخل صفاقی JJKK+WWL قبل از تزریق PTZ تاثیر معنی داری بر تاخیر زمان بروز مراحل ۴ و ۵ تشنج تونیک کلونیک می گذارد هرچند بر طول دوره زمانی این مراحل اثری نداشت. افزایش تاخیر زمانی در رسیدن به مراحل تشنج مخصوصا مرحله حملات تونیک کلونیک به معنای تلاش بیشتر سیستمهای مهارگر مغز برای جلوگیری از گسترش تشنجات در کل مغز می باشد به عبارتی تشنجات دیرتر جنرالیزه می شود و پایداری کمتری خواهند داشت (۲۷).

با توجه به مهار مسیرهای آنزیمی اصلی دخیل در حذف ۲-AG توسط این دو مهارگر (JJKK+WWL) احتمال دارد افزایش زمان تاخیر در رسیدن به حملات تونیک کلونیک پیامد افزایش ۲-AG در مغز باشد. بررسی های سالهای اخیر موثر بودن کائابینوئیدها گیاهی را در مهار وقوع تشنجات صرعی در مدل های آزمایشگاهی نشان داده است (۲۸-۳۰). در یک مطالعه کاربرد سیستمیک یک کائابینوئید گیاهی بنام کائابیدیول در دو مدل تشنج القا شده با پیلوکارپین و مدل تشنج ناشی از پنسیلین توانست درصد وقوع مراحل ۴ و ۵ تشنج تونیک- کلونیک را در هر دو مدل، بصورت معنی داری کاهش دهد (۳۱). علی رغم تفاوت در روش

ایجاد تشنج در مطالعه مذکور و مطالعه ما، کاهش درصد وقوع مراحل حمله های تونیک- کلونیک در دو مطالعه هم راستا می باشد. در مطالعه دیگری بر روی مدل تشنج ناشی از PTZ، ترکیبات فیتوکائابینوئیدی که در آزمایشگاه تولید شده بود، توانستند شدت بروز مراحل تشنجی و میزان مرگ پس از تشنج را بطور معنی داری کاهش دهند (۳۲). نتایج ما نیز کاهش مرگ پس از تشنج را در پی تزریق JJKK+WWL نشان داد که تائید کننده قابلیت سیستم اندوکائابینوئیدی مغز برای مهار حملات تشنجی می باشد. در یک مطالعه اخیر، مدل تشنج با استفاده از PTZ و در موشهای ژنی مستعد برای تشنج ایجاد شد و مهار فارماکولوژیک آنزیم ABHD6 که یکی از آنزیمهای دخیل در مسیر حذف ۲-AG می باشد سبب بهبود شدت حمله های تشنجی شد (۱۴). این گزارش علی رغم استفاده از مدل مستعد ژنی برای ایجاد تشنج اما با یافته های مطالعه ما هم جهت می باشد. البته توجه به این نکته ضروری است که ABHD6 تنها بخش کوچکی از حذف ۲-AG را برعهده دارد، در حالیکه بخش عمده حذف ۲-AG بر عهده MAGL می باشد (۸). در مطالعه ما بصورت جامع هم آنزیمهای خانواده ABHD و هم آنزیم MAGL مهار شدند.

در این مطالعه همچنین با هدف افزایش سطح آناندامیدها از URB597 بعنوان مهارگر قوی آنزیم FAAH استفاده شد که آنزیم کلیدی در حذف آناندامیدها می باشد بعلاوه از LY2183240 بعنوان مهارگر ناقل برداشت مجدد آناندامیدها استفاده کردیم. استفاده همزمان این دو مهارگر سبب افزایش معنی دار زمان مرحله ۵ حمله تونیک کلونیک شد. با این حال در آمار مرگ و میر ناشی از تشنج کاهش ایجاد شد. به نظر می رسد افزایش سطح آناندامیدها در مغز کارکردهایی متفاوتی از ۲-AG دارد که الزاما با ۲-AG هم راستا نیست و می تواند پیامدهای متفاوتی داشته باشد. در یک مطالعه نشان داده شد موشهایی که نقص آنزیمی FAAH را

اثر DMSO بر نورونها و مدارهای عصبی در بررسی های بعدی لازم است مورد توجه قرار گیرد. در مجموع این مطالعه در راستای مطالعات گذشته (۳۷ و ۳۶ و ۶ و ۳۱) تأیید کننده قابلیت جزء ۲-AG سیستم اندوکannabinوئیدی در کنترل تشنجات تونیک کلونیک ناشی از PTZ می باشد و به نظر می رسد افزایش سطح آناندامیدها اثر متفاوتی از افزایش سطح ۲-AG بر شاخصهای تشنجی ناشی از PTZ دارد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک جهت حمایت از این تحقیق و از داوران محترم بخاطر بررسی دقیق مقاله اولیه و نظرات ارزشمندشان، تشکر و قدردانی می گردد.

دارند و در نتیجه سطح آناندامیدها در آنها افزایش می یابد استعداد بیشتری برای حملات تشنجی و صرع دارند (۳۳). یافته دیگر در این مطالعه تأثیر حلال DMSO بر شاخص های تشنجی بود. برخی گزارشهای اخیر نشان داده اند که DMSO بصورت وابسته به دوز می تواند پارامترهای الکتروفیزیولوژی را در مدلهای حیوانی صرع دستخوش تغییر کند. این گزارشها بیانگر کاهش تحریک پذیری الکتریکی و شاخص ثبت شده هستند و به همین دلیل اثرات ضدصرعی برای آن پیشنهاد شده است (۳۴ و ۳۵).

براساس نتایج حاضر DMSO بعنوان حلال ترکیبات آلی می تواند در بروز تشنجات ناشی از PTZ موثر باشد. این حلال هرچند تاخیر رسیدن به مرحله ۱ و ۲ را افزایش داد اما درصد وقوع مرحله ۵ تشنج و درصد مرگ ناشی از حمله تونیک- کلونیک را افزایش داد. دلیل این پدیده می تواند به مکانیسمهای عصبی دخیل در بروز مراحل مختلف تشنج برگردد. اما روشن شدن مکانیسمهای

Investigating the effect of enzymatic elimination of endocannabinoids inhibitors on tonic- clonic seizure provoked by PTZ

P. Zareie (MSc)¹, M. Sadegh (PhD)^{*1}, M.R. Palizvan (PhD)¹

1.Department of Physiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(12); Dec 2016; PP: 49-56

Received: May 25th 2016, Revised: Jul 27th 2016, Accepted: Sep 27th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: In recent years, numerous attempts were done to find new treatment methods for patients with drug-resistant epilepsy. Anandamide (Anandamides; AEA) and di-Arachidonoylglycerol (2-Arachidonoylglycerol; 2-AG) are two major ligands of endocannabinoid system can be produced or deleted by a certain enzymatic pathway. Given the frequency and significance of these endocannabinoid ligands, it seems that endocannabinoid system in the brain can be changed with pharmacologically manipulating in the pathway of these two main ligands. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of enzymatic elimination of endocannabinoids inhibitors on tonic-clonic seizure caused by PTZ.

METHODS: In this experimental study 35 Adult male wistar rats were used in 4 groups. Tonic-clonic seizure was induced through single intra-peritoneal injection of PTZ (80 mg/Kg). Latency and duration of each five behavioral seizure stages were monitored for 30 minutes. To inhibit Anandamides elimination, URB and LY (URB: 1 mg/kg, LY: 2.5 mg/kg, i.p), to inhibit 2-Arachidonoylglycerol degradation WWL and JJKK (JJKK: 1 mg/kg, WWL: 5 mg/kg, i.p), were used, all dissolved in DMSO and injected 15 minutes before PTZ injection. In sham group, PTZ was injected after DMSO. Time and duration of all five behavioral stages of seizure were recorded for 30 minutes.

FINDINGS: Delay to stages 4 and 5 in DMSO+PTZ group were 206+39 and 209+39, respectively. While in JJKK+WWL+DMSO+PTZ group delay to stages 4 and 5 were 630+159 and 726+360, respectively, which revealed significant increase ($p<0.05$). In addition, percentage of stage 5 incidence and mortality rate were 91% in DMSO+PTZ group, while both indexes were decreased to 50% in (JJKK+WWL+DMSO) group.

CONCLUSION: Contemporary using both WWL and JJKK as inhibitors of 2-Arachidonoylglycerol elimination effectively reduced tonic- clonic seizure.

KEY WORDS: 2-Arachidonoylglycerol, Anandamide, Dimethylsulfoxide, Epilepsy.

Please cite this article as follows:

Zareie P, Sadegh M, Palizvan MR. Investigating the effect of enzymatic elimination of endocannabinoids inhibitors on tonic-clonic seizure provoked by PTZ. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(12):49-56.

*Corresponding author: M. Sadegh (PhD)

Address: Department of Physiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, I.R.Iran

Tel: +98 86 34172025

E-mail: m.sadegh@arakmu.ac.ir

References

1. Banerjee PN, Filippi D, Hauser WA. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. *Epil Res.* 2009;85(1):31-45.
2. Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 2011;20(5):359-68.
3. Fattore C, Perucca E. Novel medications for epilepsy. *Drugs.* 2011;71(16):2151-78.
4. Schmidt D, Schachter SC. Drug treatment of epilepsy in adults. *BMJ.* 2014;348:g254.
5. Espinosa-Jovel CA, Sobrino-Mejia FE. Drug resistant epilepsy. Clinical and neurobiological concepts. *Rev Neurol.* 2015;61(4):159-66.
6. Lutz B. On-demand activation of the endocannabinoid system in the control of neuronal excitability and epileptiform seizures. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(9):1691-8.
7. Karanian DA, Brown QB, Makriyannis A, Kosten TA, Bahr BA. Dual modulation of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase protects against excitotoxicity. *J Neurosci.* 2005;25(34):7813-20.
8. Basavarajappa BS. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein pept lett.* 2007;14(3):237-46.
9. Sugiura T, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lip.* 2000;108(1):89-106.
10. Ligresti A, Cascio MG, Di Marzo V. Endocannabinoid metabolic pathways and enzymes. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005;4(6):615-23.
11. Zelasko S, Arnold WR, Das A. Endocannabinoid metabolism by cytochrome P450 monooxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015;116(117):112-23.
12. Savinainen J, Saario S, Laitinen J. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta physiologica.* 2012;204(2):267-76.
13. Ma L, Wang L, Yang F, Meng XD, Wu C, Ma H, et al. Disease-modifying effects of RHC80267 and JZL184 in a pilocarpine mouse model of temporal lobe epilepsy. *CNS Neu Ther.* 2014;20(10):905-15.
14. Naydenov AV, Horne EA, Cheah CS, Swinney K, Hsu KL, Cao JK, et al. ABHD6 blockade exerts antiepileptic activity in PTZ-induced seizures and in spontaneous seizures in R6/2 mice. *Neuron.* 2014;83(2):361-71.
15. Keihanian, F, Rostampour Vajari A M, Saeidynia, A, Elmieh A. Effect of ruta graveolens hydro-alcoholic extract on pentylenetetrazole-induced seizure in male mice. *J Babol Univ Med Sci.* 2012;14(4):30-6.[In Persian].
16. Namvar Aghdash S, Mirzae R, Pourabdolhossein F. Study of anti-epileptic effect of cannabis sativa extract on pentylenetetrazol-induced kindling in male rats. *J Babol Univ Med Sci.* 2016;18(4):7-13.[In Persian].
17. Ganjkhani M, Moradi K, Ramezani S, Mirzamohammadi F, Fallah A. Effects of dark Rearing on Clonic Seizure Threshold and Pentylenetetrazol Induced Epileptiform Activity in Mice. *Zahedan Univ Med Sci J.* 2010;18(70):22-30. [In Persian]
18. Sarkisian MR. Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders. *Epil Behav.* 2001;2(3):201-16.
19. Velíšková JA. Behavioral characterization of seizures in rats. In *Models of seizures and epilepsy.* Amsterdam: Elsevier; 2006.p.601-11.
20. Hasanein P, Ghafari-Vahed M. Fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 prevented tolerance and cognitive deficits induced by chronic morphine administration in rats. *Behav Pharma.* 2016;27(1):37-43.
21. Vilela LR, Gomides LF, David BA, Antunes MM, Diniz AB, Moreira Fde A, et al. Cannabidiol rescues acute hepatic toxicity and seizure induced by cocaine. *Mediators Inflamm.* 2015; Article ID:523418.
22. Alexander JP, Cravatt BF. The putative endocannabinoid transport blocker LY2183240 is a potent inhibitor of FAAH and several other brain serine hydrolases. *J Am Chem Soc.* 2006;128(30):9699-704.
23. Maione S, Morera E, Marabese I, Ligresti A, Luongo L, Ortat G, et al. Antinociceptive effects of tetrazole inhibitors of endocannabinoid inactivation: cannabinoid and non-cannabinoid receptor-mediated mechanisms. *Br J Pharmacol.* 2008;155(5):775-82.

24. Aaltonen N, Savinainen JR, Ribas CR, Ronkko J, Kuusisto A, Korhonen J, et al. Piperazine and piperidine triazole ureas as ultrapotent and highly selective inhibitors of monoacylglycerol lipase. *Chem Biol*. 2013;20(3):379-90.
25. Tchantchou F, Zhang Y. Selective inhibition of alpha/beta-hydrolase domain 6 attenuates neurodegeneration, alleviates blood brain barrier breakdown, and improves functional recovery in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2013;30(7):565-79.
26. Wen J, Ribeiro R, Tanaka M, Zhang Y. Activation of CB2 receptor is required for the therapeutic effect of ABHD6 inhibition in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuropharmacol*. 2015;99:196-209.
27. Trevelyan AJ, Schevon CA. How inhibition influences seizure propagation. *Neuropharmacol*. 2013;69:45-54.
28. Cilio MR, Thiele EA, Devinsky O. The case for assessing cannabidiol in epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(6):787-90.
29. Maa E, Figi P. The case for medical marijuana in epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(6):783-6.
30. dos Santos RG, Hallak JE, Leite JP, Zuardi AW, Crippa JA. Phytocannabinoids and epilepsy. *J Clin Pharm Ther*. 2015;40(2):135-43.
31. Jones NA, Glyn SE, Akiyama S, Hill TD, Hill AJ, Weston SE, et al. Cannabidiol exerts anti-convulsant effects in animal models of temporal lobe and partial seizures. *Seizure*. 2012;21(5):344-52.
32. Hill TD, Cascio MG, Romano B, Duncan M, Pertwee RG, Williams CM, et al. Cannabidiol-rich cannabis extracts are anticonvulsant in mouse and rat via a CB1 receptor-independent mechanism. *Br J Pharmacol*. 2013;170(3):679-92.
33. Clement AB, Hawkins EG, Lichtman AH, Cravatt BF. Increased seizure susceptibility and proconvulsant activity of anandamide in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *J Neurosci*. 2003;23(9):3916-23.
34. Kovacs Z, Czurko A, Kekesi KA, Juhasz G. The effect of intraperitoneally administered dimethyl sulfoxide on absence-like epileptic activity of freely moving WAG/Rij rats. *J neuro sci method*. 2011;197(1):133-6.
35. Carletti F, Ferraro G, Rizzo V, Cannizzaro C, Sardo P. Antiepileptic effect of dimethyl sulfoxide in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett*. 2013;546:31-5.
36. Fezza F, Marrone MC, Avvisati R, Di Tommaso M, Lanuti M, Rapino C, et al. Distinct modulation of the endocannabinoid system upon kainic acid-induced in vivo seizures and in vitro epileptiform bursting. *Mol Cell Neurosci*. 2014;62:1-9.
37. Karanian DA, Karim SL, Wood JT, Williams JS, Lin S, Makriyannis A, et al. Endocannabinoid enhancement protects against kainic acid-induced seizures and associated brain damage. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(3):1059-66.