بررسی آسیب نورونهای آمیگدال به دنبال تشنجات حاد ناشی از تزریق داخل صفاقی پنتیلن تترازول

The Histological Assessment of Acute Seizure on the Amygdala in Rat

فریبا کریم زاده[۱،۲]، مریم جعفریان[۱،۲]، فاطمه علی پور[۲،۳]، بهزاد خلاقی[۲]

۱. دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، تهران، ایران.
۳. دانشگاه تربیت معلم، تهران، ایران.

Fariba Karimzadeh[1,2], Maryam Jafarian[1,2], Fatemeh Ali Poor[2,3], Behzad Khallaghi[2]

1. School of Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.
2. Shefa Neuroscience Research Center, Tehran, Iran.
3. Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran.

اطلاعات مقاله
دریافت: ۲۷ شهریور ۱۳۹۱
پذیرش: ۳ آبان ۱۳۹۱

کلید واژه:
نورون،
تشنج،
آمیگدال،
پنتیلن تترازول.

چکیده

مقدمه بیماری صرع یکی از شایعترین بیماریهاری سیستم عصبی به شمار می رود. نورونهای تیره (Dark cells) به عنوان یکی از بارزترین شاخصهای آسیب نورونی در انواع بیماریهای سیستم عصبی مثل ایسکمی و صرع دیده می شوند. در این پژوهش، میزان آسیب نورونها در آمیگدال به دنبال تشنجات القا شده با پنتیلن تترازول (Pentylenetetrazol) بررسی گردیده است. مواد و روش‌ها در این تحقیق موشهای صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) به سه گروه تقسیم شدند. ۱- گروه کنترل: مغز حیوانات این گروه بدون هیچ مداخله ایی به منظور مطالعات بافت شناسی خارج گردید. ۲- گروه شاهد: در این حیوانات ثبت امواج مغزی به مدت ۳۰ دقیقه پس از تزریق سرم فیزیولوژی در داخل صفاق صورت پذیرفت و در انتها مغز آنها خارج گردید.۳- گروه تشنجی: (PTZ) در این گروه ثبت امواج مغزی قبل و بعد از القا تشنج توسط تزریق داخل صفاقی پنتیلن تترازول انجام شد و سپس مغز آنها خارج گردید. از تمام گروهها برشهای بافتی تهیه شده و تعداد نورونهای تیره در آمیگدال شمارش و با یکدیگر مقایسه شدند. یافته‌ها بررسی ها نشان دادند که تعداد نورونهای تیره در آمیگدال در گروه تشنجی تفاوت قابل ملاحظه ایی با گروه کنترل و شاهد نداشت. نتیجه گیری این مطالعه نشان داد که تشنجات حاد ناشی از PTZ نمی تواند سبب آسیب نورونها در آمیگدال گردد.

Article info:
Received:17 Sept. 2012
Accepted: 24 Oct. 2012

Key words:
Neurons,
Seizures,
Amygdala,
Pentylenetetrazol.

ABSTRACT

Introduction Epilepsy is the most common neurological disorder. It has been suggested that recurrent seizure attacks may damage brain tissue. Dark neurons are known as unhealthy cells and obserevd in neurosurgical biopsies, experimental ischemia, hypoglycemia and epilepsy. This study was aimed to investigate probable neuronal damage in the amygdala after acute seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) in rat. Materials & Methods Male Wistar rats were divided into control, sham and PTZ groups. EEG recordings were performed before and after the PTZ injection. The number of dark neurons in the amygdala was measured and analysed in all different groups. Results There was no significant difference in the number of dark neurons in the amygdala between PTZ, control and sham groups. Conclusion The result of present study showed that acute seizure may not damage neurons in the amygdala nuclei.

• نویسنده مسئول:
فریبا کریم زاده
آدرس الکترونیکی: Fariba_karimzade@yahoo.com

* Corresponding Author:
Fariba Karimzadeh
E-mail: Fariba_ karimzade@yahoo.com

مقدمه

بیماری صرع یکی از شایعترین بیماریهای سیستم عصبی به شمار می رود. آمارها نشان می دهد که بیش از پنجاه میلیون نفر در دنیا به این بیماری مبتلا هستند (۲ ،۱). تشنجات می توانند سبب آسیبها و تغییرات متفاوتی در بافت مغزی گردند. نورونهای تیره که در بسیاری از نمونه های بافتهای عصبی مشاهده می شوند، به سبب فشارهای مکانیکی در هنگام نمونه برداری ایجاد می گردند (۳ -۱). در بسیاری از مطالعات حضور نورونهای تیره در شرایط هایپو گلیسمی، ایسکمی و صرع گزارش گردیده است (۵-۳). بسیاری از محققان بر این باورند که صرع می تواند نورونهای تیره متعددی را حتی در شرایط ایده آل تهیه و استخراج بافت مغزی ایجاد نماید (۶ ،۵).

این نورونهای آسیب دیده یا همان نورونهای تیره در انواع مدلهای صرع مثل صرع لوب گیجگاهی، صرعهای نسبی و تشنجات بدنبال تب دیده می شوند (۱۱-۸). همچنین گزارشاتی مبنی بر آسیب پذیری و حساسیت نورونهای آمیگدال در شرایط بیمارگونه مثل صرع ارائه شده است (۱۵ -۱۲ ،۹ ،۸).

بر خلاف این گزارشات، مطالعه ایی در سال ۲۰۰۰ نشان داد که تعداد نورونهای آمیگدال به دنبال تشنجات پی در پی در مدل کیندلینگ آمیگدال کاهش نیافته است (۱۶). این مطالعه سعی دارد تا با بررسی های بافت شناسی میزان آسیب پذیری نورونهای آمیگدال را به دنبال تشنجات حاد ناشی از تزریق داخل صفاقی پنتیلن تترازول (PTZ; Pentylenetetrazol) تعیین نماید.

مواد و روش ها

در این مطالعه از موشهای صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم (تهیه شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا) استفاده شد. حیوانات تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای ۳ ± ۲۳ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در طی مدت نگهداری، حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذای کافی داشتند. پنتیلن تترازول بکار رفته در این مطالعه از شرکت دارویی سیگما خریداری گردید. حیوانات مورد مطالعه، به سه گروه به شرح زیر تقسیم گردیدند:

۱) **گروه کنترل:** مغز حیوانات این گروه بدون هیچ مداخله ایی به منظور مطالعات بافت شناسی خارج گردید.

۲) **گروه شاهد:** در این حیوانات ابتدا سرم فیزیولوژی تزریق و سپس امواج مغزی به مدت ۳۰ دقیقه ثبت گردید.

۳) **گروه تشنجی (PTZ):** در این گروه ثبت امواج مغزی قبل و بعد از القا تشنج توسط تزریق داخل صفاقی پنتیلن تترازول انجام شد و سپس مغز آنها خارج گردید. لازم به ذکر است که حیوانات موجود در هر گروه ۶ عدد بودند.

القا تشنج و ثبت امواج مغزی

به منظور ثبت امواج مغزی، ابتدا حیوان تحت بیهوشی با یورتان (۱/۲g/kg) قرار گرفت (۱۷). سپس دو الکترود ثبات با روکش نقره در ناحیه قشر حسی مغز بر روی سخت شامه کاشته شد. یک الکترود هم به عنوان الکترود مرجع بر روی پیاز بویایی قرار داده شد. تمام الکترودها با سیمان دندانپزشکی روی استخوان جمجمه ثابت شدند. در گروهای شاهد و تشنجی ابتدا امواج مغزی به مدت ۱۰دقیقه ثبت شدند. سپس سرم فیزیولوژی در گروه شاهد (۱ml/kg) و پنتیلن تترازول (۱۲۰mg/kg) درگروه تشنجی به صورت داخل صفاقی تزریق شد (۱۸). ثبت امواج مغزی در گروه تشنجی و شاهد تا یک ساعت پس از تزریق ادامه یافت.

مطالعات بافتی

پس از اتمام ثبت امواج مغزی، حیوانات تحت بیهوشی عمیق با یورتان قرار گرفتند. محلول سرم فیزیولوژیک با اسیدیته ۷/۴ به میزان ۵۰۰ سی‌سی از طریق سیستم قلبی عروقی تزریق گردید. به دنبال آن محلول فیکساتیو پارافرمالدئید ۴ درصد به میزان ۵۰۰ سی‌سی وارد سیستم قلبی عروقی گردید (۲۰ ،۱۹).

سپس سر حیوانات جدا شده و مغز آنها خارج گردید و در داخل محلول فیکساتیو به مدت ۵ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. مغز ها به منظور آبگیری از داخل الکل های با درجه های ۷۰ ،۸۰ ،۹۰ ،۱۰۰ عبور داده شدند. پس از عبور از گزیلول و پارافین، از نمونه‌ها قالب‌گیری شده برش های بافتی به صورت پشت سر هم (سریال) با ضخامت ۱۰ میکرومتر در فاصله ۲/۲ تا ۳/۳ میلی متر عقب تر از برگما (Bregma) تهیه شد. لامها به فواصل هر ۵۰ میکرو متر یک لام، به صورت انتخابی انتخاب شده و توسط هماتوکسیلین و ائوزین، کریزل ویولت و تولوئیدن بلو رنگ آمیزی شدند (۲). لامهای رنگ آمیزی شده با میکروسکوپ نوری بررسی شده و تصاویری با بزرگ نمایی ۴۰× از منطقه آمیگدال در هر دو نیمکره تهیه گردید. تعداد نورونهای تیره توسط نرم افزار Image tools شمارش شده و میانگین آنها با یکدیگر مقایسه گردیدند (۱۹).

تجزیه و تحلیل آماری

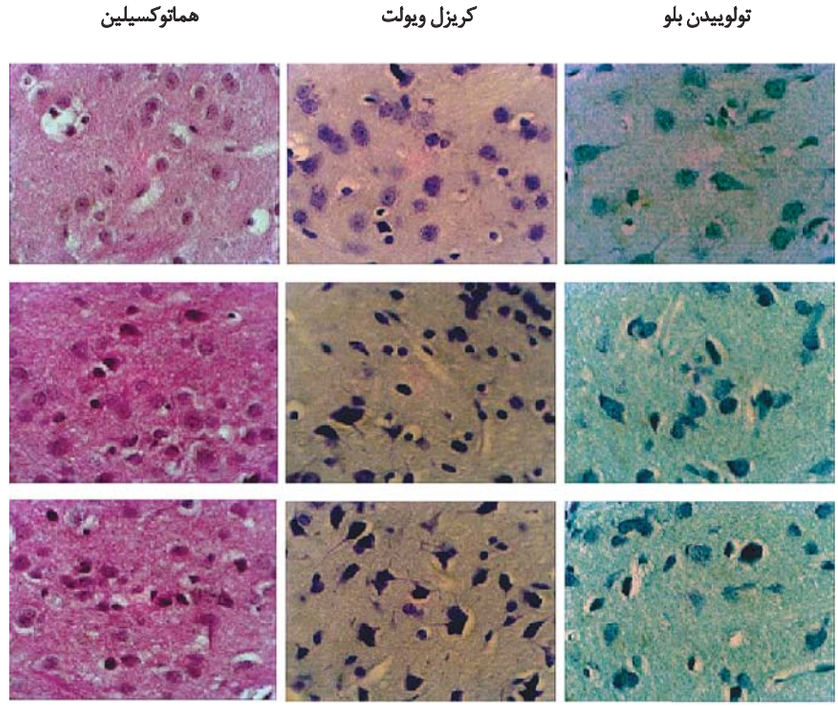
تجزیه و تحلیل داده‌های این مطالعه به کمک نرم‌افزار SPSS انجام گردید. به منظور تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) و جهت مقایسه میانگین گروه‌ها با یکدیگر از تست تعقیبی Tukey در سطح معنی‌داری $P<0/05$ استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت Mean ± SEM می‌باشند.

یافته ها

تزریق PTZ به صورت داخل صفاقی منجر به بروز تشنج در همه حیوانات گروه تشنجی گردید. این تشنجات معمولا با دست و پا زدن همراه است. ابتدا اندامهای عقبی، سپس اندامهای پیشین شروع به تکانهای شدید می کند و این در حالی است که حیوان هوشیاری خود را از دست داده و به زمین می افتد. همچنین تشنج حاد ناشی از تزریق PTZ منجر به ایجاد نورونهای تیره در هسته آمیگدال گردید.

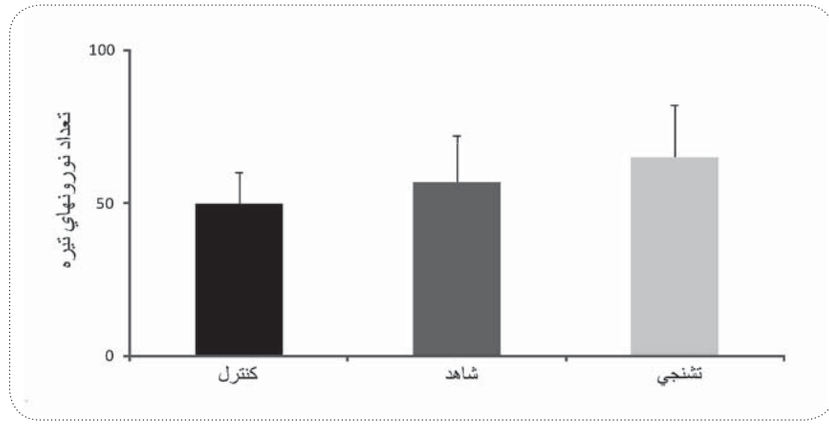
این نورونها تمایزات بارزی از جمله ظاهر چروکیده، سیتوپلاسمی بسیار بازوفیل و هسته از هم پاشیده دارند.

میانگین تعداد نورونهای تیـــره در گروه کنترل برابر با ۱۰/۰۲ ± ۵۰، در گروه شـــاهد ۱۵/۳۲ ± ۵۷ و در گروه PTZ ۱۷/۱۲ ± ۶۵ بود. در مقایسه میانگین تعداد این نورونها در گروه تشنجی با گروه کنترل و شاهد تفاوت معنی داری دیده نشد (تصویر ۱).



شفای خاتم

تصویر ۱. الف) مقایسه میانگین تعداد نورونهای تیره بین گروههای تشنجی، شاهد و کنترل در آمیگدال.



شفای خاتم

ب) نمودار میانگین تعداد نورونهای تیره بین گروههای تشنجی، شاهد وکنترل در آمیگدال. تعداد نورونهای تیره در گروه تشنجی تفاوت معنی داری با گروههای شاهد و کنترل نداشته است.

بحث و نتیجه گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که تعداد نورون‌های تیره در آمیگدال در گروه تشنجی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد و کنترل نداشت. تاکنون مطالعات فراوانی در زمینه آسیب بافت عصبی در شرایط پاتولوژیک مثل ایسکمی، هایپوگلیسمی و صرع انجام شده است. مطالعات انسانی و حیوانی یافته‌های فراوانی دال بر آسیب نورونی به دنبال تشنجات گزارش نموده‌اند (۲۴ -۲۲، ۲۱، ۱۱). از طرفی آسیب‌های دائمی و پیشرونده در آمیگدال و همچنین اختلالات حافظه به دنبال تشنجات به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۷-۲۵). تشنجات می‌توانند سبب تغیرات ریختی مانند نورونهای تیره در بافت عصبی گردند (۲۸، ۲). نورون های تیره، در نمونه های بافتی به وفور یافت می‌شوند. به همین دلیل گمان می‌شد که آنها آرتیفکت هستند ولی بعدها دیده شد که حتی در شرایط ایده‌آل تهیه بافت و پرهیز از فشارهای مکانیکی در نمونه‌های عصبی دیده می‌شوند (۱۸،۳). این نورون‌ها بازوفیل هستند و سیتوپلاسمی چروکیده دارند و تحت شرایط پاتولوژیک مثل ایسکیمی، استرس، هایپوگلیسمی و یا صرع ایجاد می‌شوند (۳۰، ۲۹، ۵، ۴، ۳). مطالعات فراوانی نشان داده است که صرع می تواند نورونهای تیره فراوانی را ایجاد نماید (۳۱، ۶، ۵). رنگ آمیزیهای متعددی از جمله هماتوکسیلین، کریزل ویولت، تولوئیدن بلو و نقره می‌توانند این نورون‌ها را به تصویر بکشند (۲۹، ۲). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که تشنجات می‌توانند سبب آسیبهای نورونی در منطقه هیپوکامپ و آمیگدال گردد (۸، ۹، ۱۱).

البته میزان این آسیبها به سن مبتلایان در هنگام بروز تشنجات، وسعت آسیبهای بافت عصبی، موقعیت کانون تشنجات، طول مدت زمان هر تشنج، تعداد تشنجات و برخی عوامل محیطی بستگی دارد (۳۲). با توجه به اینکه میزان آسیب نورونی در آمیگدال در مطالعات متعدد با یافته های متنوعی گزارش شده گمان میرود که آسیب نورونهای آمیگدال وابستگی فراوانی به مدل تشنج ایجاد شده، تعداد تشنجات و مدت زمان طول کشیده در هر تشنج دارد. در مطالعه حاضر تعداد نورونهای تیره در گروه تشنجی نسبت به گروههای کنترل و شاهد تفاوت چندانی نداشت. لذا می توان گفت که تشنجات حاد و غیر تکرار شونده نمی تواند به طور چشمگیری سبب آسیب نورونی در آمیگدال گردد. مطالعه بر روی بافت آمیگدال خارج شده در جریان اعمال جراحی بیماران مبتلا به صرع، می تواند به این سوال پاسخ قطعی بدهد که آیا حملات متعدد تشنجی می تواند سبب آسیب نورونهای آمیگدال گردد یا نه؟

منابع

1. Cammermeyer J. Is the solitary dark neuron a manifestation of postmortem trauma to the brain inadequately fixed by perfusion? Histochemistry. 1978; 56(2): 97-115.

2. Ooigawa H, Nawashiro H, Fukui S, Otani N, Osumi A, Toyooka T, Shima K. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. Acta Neuropathol. 2006; 112: 471-481.

3. Kherani ZS, Auer RN. Pharmacologic analysis of the mechanism of dark neuron production in cerebral cortex. Acta Neuropathol. 2008; 116(4): 447-52.

4. Auer RN, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö BK. The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. Light- and electron-microscopic findings in the rat cerebral cortex. Acta Neuropathol. 1985; 67(1-2): 13-24.

5. Baracskay P, Szepesi Z, Orbán G, Juhász G, Czurkó A. Generalization of seizures parallels the formation of «dark» neurons in the hippocampus and pontine reticular formation after focal-cortical application of 4-aminopyridine (4-AP) in the rat. Brain Res. 2008; 1228: 217-28.

6. Gallyas F, Kiglics V, Baracskay P, Juhász G, Czurkó A. The mode of death of epilepsy-induced “dark” neurons is neither necrosis nor apoptosis: An electronmicroscopic study. Brain Res. 2008; [Epub ahead of print].

7. Kälviäinen R, Salmenperä T, Partanen K, Vainio P, Riekkinen P Sr, Pitkänen A. MRI volumetry and T2 relaxometry of the amygdala in newly diagnosed and chronic temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res. 1997; 28(1): 39-50.

8. Pitkanen A, Tuunanen J, Kalviainen R, Partanen K, Salmenpera T. Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res. 1998; 32: 233-253.

9. Bernasconi N, Bernasconi A, Caramanos Z, Antel SB, Andermann F, Arnold DL. Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: a volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region. Brain. 2003; 126(2): 462-9.

10. Salmenperä T, Kälviäinen R, Partanen K, Pitkänen A. Hippocampal and amygdaloid damage in partial epilepsy: a cross-sectional MRI study of 241 patients.Epilepsy Res. 2001; 46(1): 69-82.

11. Toth Z, Yan XX, Haftoglou S, Ribak CE, Baram TZ. Seizure-induced euronal injury: vulnerability to febrile seizures in an immature rat model. Neurosci. 1998; 18(11): 4285-94.

12. Meyer A, Beck E, Shepherd M. Unusually severe lesions in the brain following status epilepticus. Neurol. Neurosurg Psychiatry. 1955; 18: 24-33.

13. Meldrum BS, Brierley JB. Prolonged epileptic seizures in primates.Ischemic cell change and its relation to ictal physiological events. Arch Neurol. 1973; 28: 10-17.

14. Wasterlain C, Baldwin R, Itabashi H. Status epilepticus induceswidespread neuronal injury in newborn marmosets. Epilepsia. 1996; 37: 141.

15. Park JH, Cho H, Kim H, Kim K. Repeated brief epileptic seizures bypentylenetetrazole cause neurodegeneration and promote neurogenesis in discretebrain regions of freely moving adult rats. Neurosci. 2006; 140(2): 673-84.

16. Tuunanen J, Pitkänen A. Do seizures cause neuronal damage in ratamygdala kindling? Epilepsy Res. 2000; 39(2): 171-6.

17. Wu G, Luo F, Li Z, Zhao X, Li SJ. Transient relationships among BOLD,CBV, and CBF changes in rat brain as detected by functional MRI. Magn Reson Med. 2002; 48(6): 987-93.

18. File, SE. Tolerance to the anti-pentylenetetrazole effectsof diazepam inthe mouse. Psychopharmacol. 1983; 79(2-3): 284-6.

19. Bayat M, Hasanzadeh GR, BarzroodIpour M, Javadi M. The effect of lowprotein diet on thalamic projections of hippocampus in rat. Neuroanatomy. 2005; 4: 43–48.

20. Gost JI, Insausti R, Gonzalo LM. Production an d characterization of amonoclonal antibody that selectively marks the astrocyte population in the centralnervous system. Rev Med Univ Navarra. 1993; 38(2): 9-20.

21. Holmes GL. Seizure-induced neuronal injury: animal data. Neurology. 2002; 59: 3-6.

22. Sankar R, Shin DH, Liu H, Mazarati A, Pereira de Vasconcelos A,Wasterlain CG. Patterns of status epilepticusinduced neuronal injury duringdevelopment and long-term consequences. Neurosci. 1998; 18(20): 82-93.

23. Karimzadeh F, Hosseini M, Mangeng D, Alavi H, Hassanzadeh GR, Bayat M, Jafaryan M, Kazemi H, Gorji A. Anticonvulsant and neuroprotective effects of Pimpinella anisum in rat brain. BMC Complement Altern Med. 2012; 18; 12(1): 76.

24. Jafarian M, Rahimi S, Behnam F, Hosseini M, Haghir H, Sadeghzadeh B, Gorji A. The effect of repetitive spreading depression on neuronal damage in juvenile rat brain. Neurosci. 2011; 169(1): 388-94.

25. Weniger G, Boucsein K, Irle E. Impaired associative memory in temporal lobe epilepsy subjects after lesions of hippocampus, parahippocampal gyrus, andamygdala. Hippocampus. 2004; 14(6): 785-96.

26. Zeman A. When a patient with epilepsy complains about poor memory? Pract Neurol. 2009; 9(2): 85-9.

27. Carreño M, Donaire A, Sánchez-Carpintero R. Cognitive disorders associated with epilepsy: diagnosis and treatment. Neurologist. 2008; 14: 26-34.

28. Jortner BS. The return of the dark neuron. A histological artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation. Neurotoxicology. 2006; 27(4): 628-34.

29. Ishida K, Shimizu H, Hida H, Urakawa S, Ida K, Nishino H. Argyrophilic dark neurons represent various states of neuronal damage in brain insults: some come to die and others survive. Neurosci. 2004; 125(3): 633-44.

30. Czurkó A, Nishino H. 'Collapsed' (argyrophilic, dark) neurons in rat model of transient focal cerebral ischemia. Neurosci Lett. 1993; 162(1-2): 71-4.

31. Söderfeldt B, Kalimo H, Olsson Y, Siesjö BK. Bicucullineinduced epileptic brain injury. Transient and persistent cell changes in rat cerebral cortex in the early recovery period. Acta Neuropathol. 1983; 62: 87-95.

32. Majak K, Pitkänen A. Do seizures cause irreversible cognitive damage? Evidence from animal studies. Epilepsy Behav. 2004; 5: 35-44.