مقاله اصیل

بررسی اثر کیندلینگ پنتیلین‌تترازول و غیرفعالسازی هیپوتالاموس جانبی بر روند کیندلینگ و جمعیت نورونی هیپوکامپ

نصیبه اکبری[۱]، محمود اله‌دادی سلمانی[۲]*، تقی لشکربلوکی[۳]، مهدی گودرزوند[۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

[۲] استادیار فیزیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

[۳] استادیار بیوشیمی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

[٤] استادیار فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

* نشانی نویسنده مسئول: دامغان، جاده چشمه علی، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی، محمود اله‌دادی سلمانی،
E-mail: elahdadi@du.ac.ir

وصول: ۹۴/۴/۲۰، اصلاح: ۹۴/۶/۱۲، پذیرش: ۹۴/۸/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: صرع یک اختلال عصبی ناشی از تغییرات سیناپسی است که منجر به افزایش تحریک‌پذیری و تغییرات ساختاری بافت مغزی می‌گردد. کیندلینگ یک مدل حیوانی صرع است که طی تحریک های مکرر الکتریکی یا شیمیایی زیرآستانه‌ای منجر به تغییرات سیناپسی و مداری در مغز می شود. هیپوتالاموس جانبی به عنوان کانون اصلی نورون های اورکسینرژیک در خواب و بیداری و نیز تحریک‌پذیری مغزی دخیل است و گیرنده های زیادی در هیپوکامپ دارد. بنابراین، در این مطالعه به بررسی اثر کیندلینگ و غیرفعالسازی هیپوتالاموس جانبی بر تغییرات بافتی هیپوکامپ‌پرداخته شد.

مواد و روش ها: به منظور ایجاد کیندلینگ شیمیایی، داروی پنتیلن تترازول به میزان ٤٥ میلیگرم / کیلوگرم، هر ٤٨ ساعت از طریق داخل صفاقی تا ۱۳ روز به حیوان تزریق گردید. سه مرحله متوالی ٤ یا ٥، به عنوان تایید کیندلینگ در نظر گرفته شد. لیدوکایین ۲٪ با کمک دستگاه استریوتاکسی به هیپوتالاموس جانبی سمت راست، نیم ساعت قبل از هر تزریق پنتیلن تترازول تجویز گردید. رنگ‌آمیزی **Nissl** جهت مشاهده جمعیت نورونی نواحی **CA3** و هیلوس (**Hilus**) هیپوکامپ استفاده گردید.

یافته ها: غیرفعالسازی هیپوتالاموس جانبی از نمو کیندلینگ پنتیلن تترازول (دوز ٤٥ میلی گرم) پیشگیری نمود. پراکندگی سلولی در ناحیه ژیروس دندانه‌ای و ناحیه **CA3** هیپوکامپ در اثر کیندلینگ پنتیلن‌تترازول افزایش یافت. در حالی که، غیرفعالسازی هیپوتالاموس جانبی نتوانست از این پراکندگی پیشگیری نماید. از طرفی، کیندلینگ اثر قابل مشاهده بر جمعیت نورونی نواحی **CA3** و هیلوس هیپوکامپ نداشت.

نتیجه گیری: تحلیل نتایج نشان داد که کیندلینگ پنتیلن تترازول در ایجاد پراکندگی نورونی هیپوکامپ نقش دارد و غیرفعالسازی هیپوتالاموس جانبی اگر چه از نمو کیندلینگ ممانعت می نماید، قادر به پیشگیری از پراکندگی نورونی نیست.

واژگان کلیدی: *صرع، کیندلینگ، پنتیلن‌تترازول، هیپوتالاموس جانبی*

مقدمه

صرع یک اختلال عصبی شایع است که با تشنجات خودبخودی راجعه در جمعیت زیادی از انسان ها شناخته می شود (۱). دانش ما از فرایند صرع زایی تا حد زیادی برآمده از مطالعات حیوانی(۲) مانند کیندلینگ الکتریکی و شیمیایی می باشد (۳). کیندلینگ به عنوان یک مدل حیوانی به طور تدریجی استعداد صرع‌زایی را تکوین می‌دهد (٤). کیندلینگ در اثر محرک های مختلف الکتریکی یا شیمیایی ایجاد شده و پنتیلن‌تترازول به عنوان یک محرک شیمیایی قادر به تشدید تشنجات به دنبال تجویز تکراری می باشد (۵, ٦). ابعاد سلولی مختلفی از شبکه های اعصاب از جمله کانال های یونی و تراکم گیرنده ای اثر در مدل های حیوانی دچار تغییر گشته و باعث افزایش تحریک‌پذیری نورونی و شبکه نورونی می-گردد (۲, ٦–۸).

هیپوکامپ محل اصلی تغییرات سیناپسی طی یادگیری و حافظه بوده و همزمان مستعد تشنج و صرع نیز می باشد. ناحیه CA3 هیپوکامپ بیشترین حساسیت را به آسیب ناشی از صرع دارد و فعالیت صرعی از این ناحیه به ناحیه CA1 گسترش می یابد (۹). صرع و تشنجات صرعی تغییراتی در هیپوکامپ اعمال می نمایند که شامل طیفی از تغییرات پلاستیک مدارها تا ایجاد اسکلروز هیپوکامپی می باشد(۱۰). به موازات این ضایعه، تغییراتی در ژیروس دندانه ای و دیگر نواحی هیپوکامپ مانند هیلوس و CA3 اتفاق می افتد که بطور عمده شامل افزایش فیبرهای خزه ای و سیناپس های تحریکی است و منجر به افزایش تحریک پذیری و تشدید حملات صرعی می گردند. بنابراین، پیشگیری یا درمان این تغییرات بافتی شاید بتواند از حملات تشنجی یا شدت آن ها بکاهد.

هیپوتالاموس جانبی دارای نورون های اورکسینرژیک است و آکسون های زیادی را به هیپوکامپ و نیز ساقه مغز ارسال می نماید. اورکسین اثرات کنترلی خود را بر هیپوکامپ، احتمالا از طریق مسیرهای مستقیم یا غیر مستقیم چند سیناپسی مانند مسیر سپتومی- هیپوکامپی اعمال می نماید (۱۱). بیشترین اثر مطالعه شده ی اورکسین در رابطه با خواب و بیداری است (۱۲, ۱۳). البته اثراتی بر عملکردهای دیگر از جمله کنترل درد نیز گزارش شده است (١٤). با توجه به سطح بالای بیان گیرنده های اورکسینی در هیپوکامپ (۱۵, ١٦)، به نظر می رسد که در عملکردهای مرتبط با هیپوکامپ مانند یادگیری، استرس و صرع و تشنج نیز دارای نقش باشد. در همین راستا، گودرزی و همکاران نشان دادند که مهار گیرنده های اورکسینی هیپوکامپ منجر به کاهش شدت و مدت تشنجات حاد ناشی از پنتیلن تترازول می گردد (۱۷).

بنابراین، هدف این تحقیق بررسی اثر غیرفعال-سازی هیپوتالاموس جانبی بر تغییرات نورونی نواحی هیلوس و CA3 هیپوکامپ بدنبال کیندلینگ پنتیلن‌تترازول می باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات:

موش های سفید بزرگ آزمایشگاهی نر از نژاد ویستار در محدوده وزنی ۱۵۰–۱۷۰ گرم در ابتدای کیندلینگ مورد استفاده قرار گرفتند. کلیه آزمایش‌ها بر اساس قوانین اخلاقی حمایت و استفاده از حیوانات دانشگاه دامغان انجام گردید. حیوانات در گروه های ۵ تایی در هر قفس با چرخه ۱۲ ساعته نور- تاریکی قرار داشتند و نور در ساعت ۷ صبح هر روز آغاز می گشت. حیوانات دسترسی کامل به آب و غذا داشتند.

گروه‌های آزمایشی:

حیوانات مورد آزمایش به سه گروه آزمایشی به صورت کاملا تصادفی تقسیم شدند. ۱. گروه کیندلینگ (n=14): حیوانات این گروه به صورت یک روز در میان پنتیلن تترازول دریافت می کردند. ۲. گروه لیدوکایین- کیندلینگ (لیدوکایین) (n=14): حیوانات این گروه نیم

ساعت قبل از تزریقات روزانه، لیدوکایین دریافت می نمودند. ۳. گروه کنترل (n=5): این گروه برای مقایسه تغییرات بافتی بین گروه های کیندلینگ با آن است.

کیندلینگ:

پنتیلن‌تترازول (٤٥ میلی‌گرم/ کیلوگرم) را در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و به حیوانات گروه کیندلینگ تزریق میگردید. هر حیوان دریافت کننده پنتیلن‌تترازول به مدت ۲۰ دقیقه تحت مشاهده قرار میگرفت و در موارد لازم، مدت مشاهده افزایش می یافت. هر موش تعداد ۱۳ تزریق طی ۲٦ روز به صورت هر ٤٨ ساعت یکبار دریافت می کرد و پس از سه بار تشنج مرحله ٤ یا ۵، کیندل شده تلقی میشد. تشنجات بر اساس معیار زیر طبقه‌بندی می شدند؛ ۱. تکانه در گوش و صورت ۲. انتشار موج تشنجی به سرتاسر بدن ۳. پرش‌های میوکلونیک ٤. تشنجات تونیک- کلونیک، ایستادن ۵. تشنجات عمومی تونیک- کلونیک، از دست دادن کنترل و افتادن به پهلو (٤, ۵).

جراحی حیوانات:

حیوانات توسط مخلوطی از کتامین (۹۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) و زایلازین (٦ میلی‌گرم/ کیلوگرم) از راه داخل صفاقی بیهوش شده و در دستگاه استریوتاکسی قرار داده می شدند. دمای بدن حیوانات توسط یک پتو در زیر و روی بدن حفظ میگردید. کانول راهنما از جنس استیل زنگ‌نزن (شماره ۲۳) در هیپوتالاموس جانبی به صورت یک‌طرفه (شکل ۱) قرار داده می شد (AP= -2.8 mm caudal to bregma, Lat.= +1.2 mm and DV= -8.6 mm ventral from skull surface) و سپس کانول تزریق (شماره ۳۰) با طول یک میلیمتر بلندتر در همان محل برای تزریق استفاده می گردید. کانول راهنما در سطح جمجمه توسط پیچ‌های عینک و سیمان دندانپزشکی محکم می شدند. برای پیشگیری از انسداد کانول راهنما، یک کانول جایگزین برای کانول تزریق در زمان‌های غیر از تزریق استفاده می گردید. پماد تتراساکلین به عنوان آنتی‌بیوتیک موضعی برای پیشگیری از عفونت بکار می‌رفت.

به منظور تزریق لیدوکائین ۲٪، از سرنگ هامیلتون ۵ میکرولیتری متصل به لوله پلی‌اتیلن (PE-20) و کانول تزریق برای تزریق ۰/۵ میکرولیتر دارو با سرعت ۰/۵ میکرولیتر در دقیقه در هیپوتالاموس جانبی استفاده می‌شد. داروها به صورت تازه و در روز تزریق تهیه می‌گردید و توسط پمپ تزریق می‌شد. کانول تزریق پس از پایان تزریق به مدت ۲-۳ دقیقه برای انتشار کامل دارو در محل باقی می‌ماند. همه حیوانات پس از پایان مشاهده رفتاری برای برش‌های بافتی قربانی شده و همزمان اطمینان از جایگاه کانول تزریق در هیپوتالاموس جانبی نیز همزمان حاصل میگردید.

رنگ‌آمیزی Nissl:

بلافاصله پس از پایان مشاهدات رفتاری، تعداد ۵ حیوان از هر گروه تحت بیهوشی کامل، با ۵۰ میلی لیتر نرمال سالین و سپس فرمالین ۱۰٪ از طریق قلب پرفیوز شدند تا زمانی که مغز سفت و روشن حاصل گردد. سپس مغز از جمجمه خارج شده و به مدت ٢٤-٤٨ ساعت در فرمالین قرار داده شد. مقاطع مغزی با ضخامت ۱۰ میکرومتر از هیپوکامپ و نیز هیپوتالاموس جانبی با دستگاه میکروتوم (ساخت شرکت Microteck) تهیه گردید. رنگ آمیزی نیسل به منظور مشاهده سلول های ناحیه با رنگ کرزیل ویوله (Sigma) انجام گردید. تغییرات بافتی و سلولی هر ناحیه در زیر میکروسکپ مشاهده گردید.

داروها:

لیدوکائین ۲٪ (۱۸)، هر ٤٨ ساعت و ۳۰ دقیقه قبل از هر تزریق پنتیلن‌تترازول استفاده می گردید. داروی PTZ (sigma, P6500) به منظور کیندلینگ بکار می‌رفت.

آنالیز آماری:

با توجه به اینکه متغیر در بخش رفتار تشنجی از

نوع رتبه ای می باشد، لذامیانگین کل زمان کیندلینگ بین دو گروه کیندلینگ و لیدوکائین توسط تست غیر پارامتریکMann Whitney مقایسه گردید. همه تست‌های آماری توسط نرم‌افزار SPSS v.16 انجام شد. حداقل سطح معنی‌داری $P<0.05$ می‌باشد. از آن‌جا که داده‌های تغییرات بافتی به صورت کیفی بوده است، مقایسه نیز به صورت کیفی صورت گرفت.

یافته ها

غیرفعالسازی هیپوتالاموس جانبی از نمو کیندلینگ جلوگیری می‌کند.

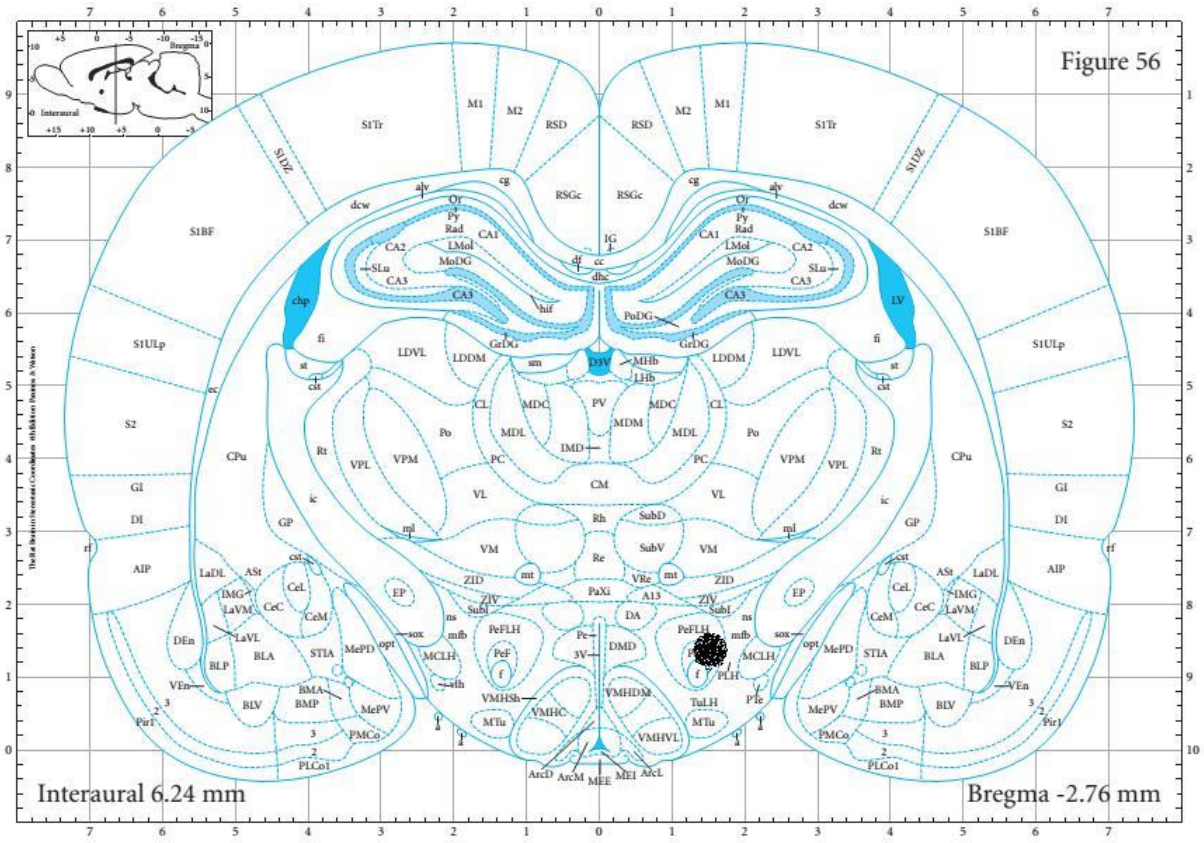
از لیدوکائین جهت غیرفعالسازی موقت هیپوتالاموس جانبی(Fig. 1)، ۳۰ دقیقه قبل از هر تزریق پنتیلن‌تترازول استفاده گردید. هر تزریق انفرادی پنتیلن-تترازول منجر به تشنج های ضعیف‌تر در روند کیندلینگ در گروه لیدوکائین نسبت به گروه کیندلینگ شد. در این راستا، مقایسه آماری میانگین زمانی کل روند کیندلینگ بین دو گروه کیندلینگ و لیدوکائین، کاهش معنی داری در مراحل تشنجی در گروه لیدوکایین نشان داد (Mann Whitney U test, U=11.500, P<0.001, n=14). بنابراین، تیمار لیدوکائین از نمو کیندلینگ جلوگیری می‌نماید (Fig. 2).

کیندلینگ پنتیلن‌تترازول باعث پراکندگی سلولی در هیپوکامپ می‌گردد.

اعمال یکروز در میان پنتیلن تترازول از یک طرف به نمو کیندلینگ می انجامد و باعث پراکندگی و کاهش تراکم ظاهری سلولی در نواحیCA3 (Fig. 3-A) و هیلوس (Fig. 4-A) هیپوکامپ نسبت به بافت کنترل (Fig 3-C and 4-C) گردیده است. لازم به ذکر است که جمعیت و تراکم سلولی در هیپوتالاموس جانبی تغییری نکرده است.

تیمار لیدوکائین بر تغییرات بافتی ناشی از کیندلینگ بی‌اثر است.

تزریق داخل هسته‌ای لیدوکائین و در نتیجه

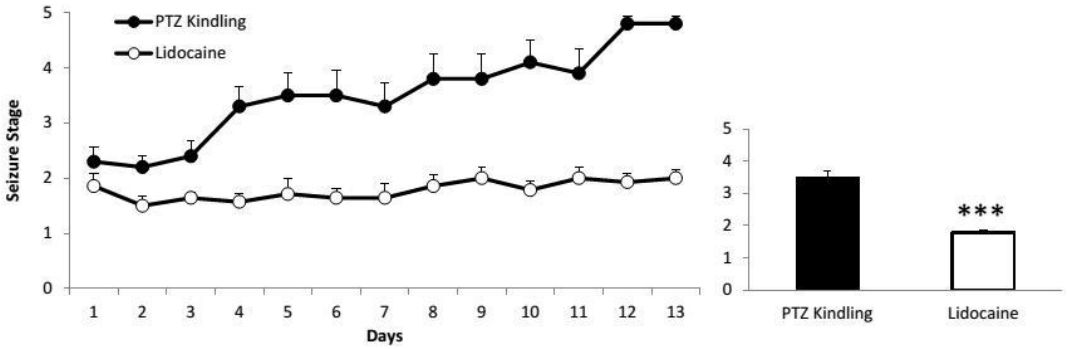


شکل ۱: محل تزریق لیدوکایین در هیپوتالاموس جانبی. محل تزریق به صورت یک دایره سیاه در شکل اطلس پاکسینوس مشخص شده است.

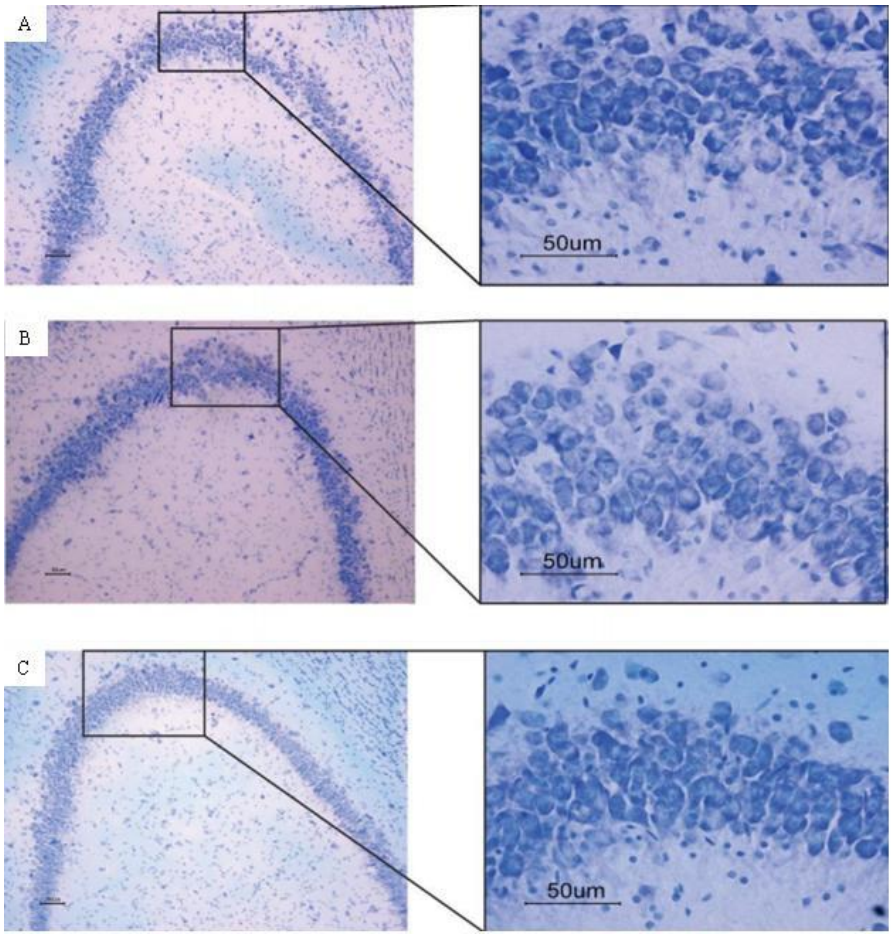
غیرفعالسازی هیپوتالاموس جانبی، علیرغم متوقف کردن روند کیندلینگ، از پراکندگی سلولی در نواحی CA3 (Fig. 3-B) و هیلوس (Fig. 4-B) هیپوکامپ پیشگیری نمی‌کند. حتی به نظر می‌رسد که روند پراکندگی سلولی تشدید شده است.

بحث

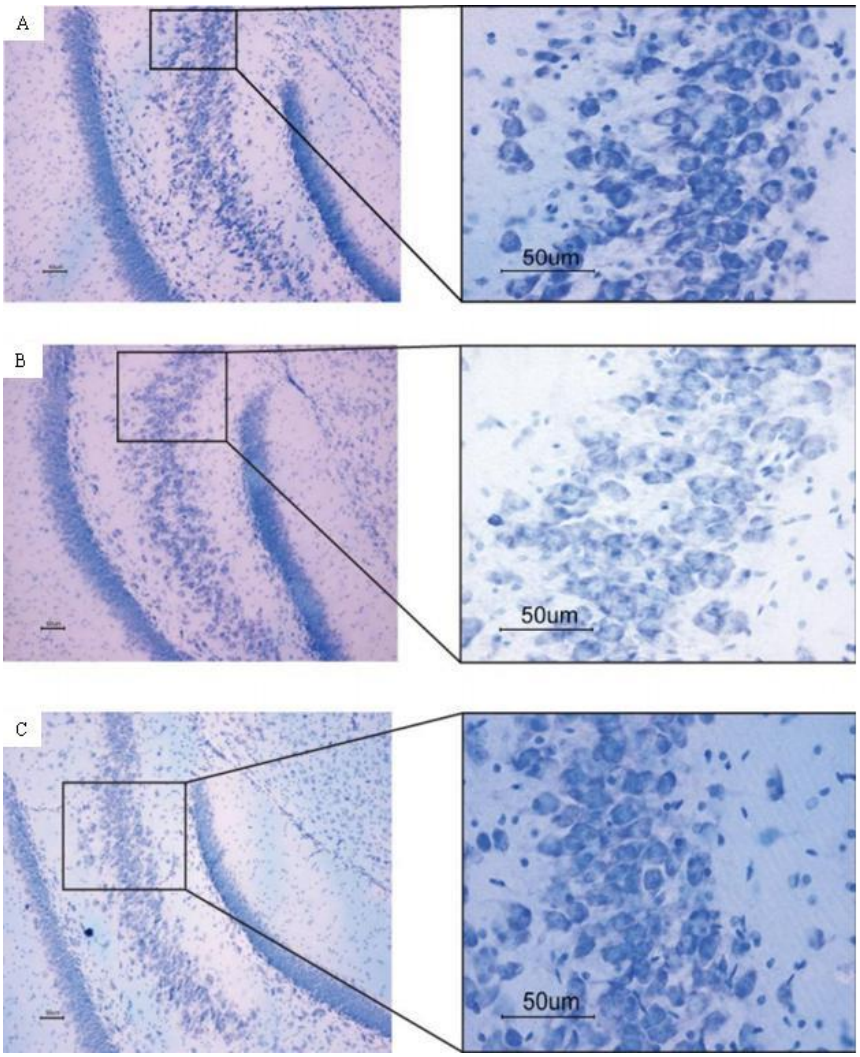
در مطالعه حاضر، اثر کیندلینگ پنتیلن‌تترازول و غیرفعالسازی هیپوتالاموس جانبی بر تغییرات بافتی هیپوکامپ بررسی شده است. کیندلینگ پنتیلن‌تترازول باعث افزایش پراکندگی نورونی در ناحیه ژیروس دندانه-ای و CA3 هیپوکامپ گردید، حال آنکه تیمار لیدوکائین



شکل ۲: غیرفعالسازی هیپوتالاموس جانبی از نمو کیندلینگ پیشگیری می کند. تزریق لیدوکائین نیم ساعت قبل از هر تزریق PTZ از شدت حملات تشنجی به صورت کاهش مراحل تشنجی کاسته و فرایند کیندلینگ را کند می کند. نمودار ستونی نشان دهنده ی میانگین کل روزهای کیندلینگ است. *** P<0.001



شکل ۳: تصویر میکروسکپی ناحیه CA3 هیپوکامپ طبق رنگ آمیزی Nissl در گروه های کیندلینگ PTZ (A)، لیدوکائین (B) و کنترل (C). پراکندگی نورونی در A قابل تشخیص است که در B و نیز در اثر اعمال لیدوکائین جبران نشده است. در C، نورون ها در کنار هم و با تراکم طبیعی دیده می شوند.



شکل ۴: تصویر میکروسکپی ناحیه هیلوس (Hilus) هیپوکامپ طبق رنگ آمیزی Nissl در گروه های کیندلینگ PTZ (A)، لیدوکائین (B) و کنترل (C). پراکندگی نورونی در A قابل تشخیص است که بدنبال اعمال لیدوکائین جبران نشده است. در C نورون ها در کنار هم و با تراکم طبیعی دیده می شوند.

قادر به پیشگیری از این اثر نبوده است.

نتایج نشان داد که غیرفعالسازی موقت هیپوتالاموس جانبی پیش از هر تزریق پنتیلن‌تترازول از روند کیندلینگ جلوگیری می نماید. این نتیجه با حذف اثر تحریکی سیستم اورکسینی به عنوان عامل لازم در کیندلینگ شرح داده می شود. این کاهش فعالیت به صورت کاهش دایمی تعداد نورون های اورکسینرژیک در بیماران اختلال خواب نیز مشاهده میگردد (۱۹, ۲۰). در این بیماران، میزان اورکسین مایع مغزی نخاعی نیز کاهش میابد و در نتیجه اثرگذاری اورکسین بر مراکز خواب و بیداری کاهش میابد و بیماران دچار حملات دوره‌ای خواب و خمودگی (drowsiness) می‌گردند (۱۲, ۲۱).

گیرنده‌های اورکسینی در قسمتهای مختلف مغز یافت می شوند و تحریک آن‌ها باعث برانگیختگی و بیداری می شوند (۱۳, ۲۲, ۲۳). کاهش اثر تحریکی هیپوتالاموس جانبی و در نتیجه سیستم اورکسینرژیک، احتمالا ناشی از فعال شدن گیرنده های دوپامینیD2 است که دارای اثرات ضد تشنجی از طریق مسیر انتقال سیگنال GSK هستند (۲٤, ۲۵).

در این پژوهش با استفاده از رنگ آمیزی Nissl به بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌ها در ناحیه CA3 و هیلوس هیپوکامپ و هیپوتالاموس جانبی پرداخته شد. در موش‌های تیمار شده با PTZ و لیدوکائین، به نظر می‌رسد تراکم کل سلول‌ها تغییر نکرده است اما سلول‌های هرمی

ناحیه CA3 و سلول‌های ناحیه هیلوس هیپوکامپ در گروه کیندلینگ ظاهرا به صورت پراکنده‌تری نسبت به گروه کنترل قرار گرفته‌اند. این یافته نشان می‌دهد که بقای نورونی حفظ شده است و احتمالا ساختار ماتریکس دچار تغییر شده و سلول‌ها را پراکنده تر ساخته است. از طرفی شواهد بیان می کنند که درجات مناسب پروتئین ریلین برای مهاجرت نورونی صحیح و لایه بندی مناسب نورون ها ضروری می باشد (۲۶). کمبود ریلین را با سمیت تحریکی سلولهای Cajal-Retzius در ارتباط می دانند (۲۷).عدم برگشت تراکم ظاهری سلول‌ها در نواحی CA3و هیلوس نشان می‌دهد که احتمالا اثرات مخرب PTZبر بافت مغزی از اثرات تشنج‌زای آن تا حدی مستقل است. این اثرات می‌تواند ناشی از افزایش گلوتامات در تزریقات حاد PTZ و کاهش تدریجی آن در کیندلینگ باشد. اندازه‌گیری گلوتامات در مطالعه قبلی آزمایشگاه ما نشان داد که لیدوکائین یا به تعبیری کاهش اثرات سیستم اورکسینی نمی‌تواند تغییری در محتوای گلوتاماتی هیپوکامپی ناشی از کیندلینگ بدهد (۲۸). بنابراین عدم حضور احتمالی اورکسین قادر است تشنجات ناشی از PTZ را تخفیف دهد ولی قادر به پیشگیری از اثرات بافتی آن نمی‌باشد. ازطرفی، در بررسی بافتی سلول‌های ناحیه هیپوتالاموس جانبی نیزتغییری دربین گروه‌ها مشاهده نشد که خود نشانگر حفظ سلامت و بقای سلولی ناحیه هیپوتالاموس جانبی است.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان میدهد که کیندلینگ پنتیلن‌تترازول باعث تغییرات بافتی در هیپوکامپ به شکل افزایش پراکندگی سلولی و تغییر در بافت بین سلولی می گردد. اگر چه غیرفعال کردن هیپوتالاموس جانبی قادر به جلوگیری از کیندلینگ پنتیلن‌تترازول میگردد، لیکن نمی تواند از تغییرات بافتی همراه کیندلینگ در هیپوکامپ پیشگیری نماید. از طرفی، با توجه به اینکه کیندلینگ PTZ نتوانسته است باعث کاهش بقا و شمارش نورونی گردد، بهتر است در مطالعه بعدی مدل صرعی دارای اثرات بافتی مورد نظر مانند مدل پیلوکارپین استفاده گردد تا اثرات احتمالی غیرفعالسازی هیپوتالاموس بر بقای نورونی قابل مشاهده باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه دامغان انجام شده است. این مقاله حاوی نتایج پیشنهاد پژوهشی ثبت شده در وبگاه ایرانداک به شماره ۱۰۲٤۵۰۸ می باشد.

References

1. Blumcke I, Beck H, Lie AA, Wiestler OD. Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsy Res. 1999 Sep;36(2-3):205-23. PubMed PMID: 10515166. Epub 1999/10/09. eng.
2. Jacobs MP, Leblanc GG, Brooks-Kayal A, Jensen FE, Lowenstein DH, Noebels JL, et al. Curing epilepsy: progress and future directions. Epilepsy Behav. 2009 Mar;14(3):438-45. PubMed PMID: 19341977. Pubmed Central PMCID: 2822433. Epub 2009/04/04. eng.
3. Pitkanen A, Lukasiuk K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. Epilepsy Behav. 2009 Jan;14 Suppl 1:16-25. PubMed PMID: 18835369. Epub 2008/10/07. eng.
4. Goddard GV. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. Nature. 1967 Jun 3;214(5092):1020-1. PubMed PMID: 6055396. Epub 1967/06/03. eng.
5. Corda MG, Giorgi O, Longoni B, Orlandi M, Biggio G. Decrease in the function of the gamma-aminobutyric acid-coupled chloride channel produced by the repeated administration of pentylenetetrazol to rats. J Neurochem. 1990 Oct;55(4):1216-21. PubMed PMID: 1697889. Epub 1990/10/01. eng.
6. Ruethrich H, Grecksch G, Becker A, Krug M. Potentiation effects in the dentate gyrus of pentylenetetrazol-kindled rats. Physiol Behav. 1996 Aug;60(2):455-62. PubMed PMID: 8840906. Epub 1996/08/01. eng.
7. Gupta A, Elgammal FS, Proddutur A, Shah S, Santhakumar V. Decrease in tonic inhibition contributes to increase in dentate semilunar granule cell excitability after brain injury. J Neurosci. 2012 Feb 15;32(7):2523-37. PubMed PMID: 22396425. Epub 2012/03/08. eng.

8. Stringer JL. Alterations in both excitation and inhibition occur before the onset of seizure activity in the hippocampus. Epilepsy Res. 1993 Oct;16(2):99-109. PubMed PMID: 8269916. Epub 1993/10/01. eng.
9. Sendrowski K, Sobaniec W. Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. Pharmacological reports : PR. 2013;65(3):555-65. PubMed PMID: 23950578.
10. Chatzikonstantinou A. Epilepsy and the hippocampus. Frontiers of neurology and neuroscience. 2014;34:121-42. PubMed PMID: 24777136.
11. Stanley EM, Fadel JR. Aging-related alterations in orexin/hypocretin modulation of septo-hippocampal amino acid neurotransmission. Neuroscience. 2011 Nov 10;195:70-9. PubMed PMID: 21884758. Pubmed Central PMCID: 3189344. Epub 2011/09/03. eng.
12. Baier PC, Hallschmid M, Seeck-Hirschner M, Weinhold SL, Burkert S, Diessner N, et al. Effects of intranasal hypocretin-1 (orexin A) on sleep in narcolepsy with cataplexy. Sleep Med. 2011 Dec;12(10):941-6. PubMed PMID: 22036605. Epub 2011/11/01. eng.
13. de Lecea L. A decade of hypocretins: past, present and future of the neurobiology of arousal. Acta Physiol (Oxf). 2010 Mar;198(3):203-8. PubMed PMID: 19473132. Epub 2009/05/29. eng.
14. Azhdari-Zarmehri H, Semnanian S, Fathollahi Y. Orexin-A microinjection into the rostral ventromedial medulla causes antinociception on formalin test. Pharmacol Biochem Behav. 2014 Jul;122:286-90. PubMed PMID: 24685412.
15. Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. FEBS letters. 1998 Oct 30;438(1-2):71-5. PubMed PMID: 9821961.
16. Ch'ng SS, Lawrence AJ. Distribution of the orexin-1 receptor (OX1R) in the mouse forebrain and rostral brainstem: A characterisation of OX1R-eGFP mice. Journal of chemical neuroanatomy. 2015 Jul-Sep;66-67:1-9. PubMed PMID: 25841630.
17. Goudarzi E, Elahdadi Salmani M, Lashkarbolouki T, Goudarzi I. Hippocampal orexin receptors inactivation reduces PTZ induced seizures of male rats. Pharmacol Biochem Behav. 2015 Mar;130:77-83. PubMed PMID: 25600753.
18. Acheson A, Waraczynski M, Perkins M. Lesions and inactivation implicate dorsolateral hindbrain in MFB self-stimulation. Physiol Behav. 2000 Oct 1-15;71(1-2):159-71. PubMed PMID: 11134698. Epub 2001/01/03. eng.
19. Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, et al. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. Neuron. 2000 Sep;27(3):469-74. PubMed PMID: 11055430. Epub 2000/10/31. eng.
20. Thannickal TC, Nienhuis R, Siegel JM. Localized loss of hypocretin (orexin) cells in narcolepsy without cataplexy. Sleep. 2009 Aug;32(8):993-8. PubMed PMID: 19725250. Pubmed Central PMCID: 2717206. Epub 2009/09/04. eng.
21. Diniz Behn CG, Klerman EB, Mochizuki T, Lin SC, Scammell TE. Abnormal sleep/wake dynamics in orexin knockout mice. Sleep. 2010 Mar;33(3):297-306. PubMed PMID: 20337187. Pubmed Central PMCID: 2831423. Epub 2010/03/27. eng.
22. Boutrel B, Cannella N, de Lecea L. The role of hypocretin in driving arousal and goal-oriented behaviors. Brain Res. 2010 Feb 16;1314:103-11. PubMed PMID: 19948148. Epub 2009/12/02. eng.
23. Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. Nat Rev Neurosci. 2007 Mar;8(3):171-81. PubMed PMID: 17299454. Epub 2007/02/15. eng.
24. Bozzi Y, Dunleavy M, Henshall DC. Cell signaling underlying epileptic behavior. Front Behav Neurosci. 2011;5:45. PubMed PMID: 21852968. Pubmed Central PMCID: 3151612. Epub 2011/08/20. eng.
25. Tripathi PP, Santorufo G, Brilli E, Borrelli E, Bozzi Y. Kainic acid-induced seizures activate GSK-3beta in the hippocampus of D2R-/- mice. Neuroreport. 2010 Aug 23;21(12):846-50. PubMed PMID: 20625330. Epub 2010/07/14. eng.
26. Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira CM, Rossi D, et al. Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. J Neurosci. 2010 Mar 31;30(13):4636-49. PubMed PMID: 20357114.
27. Del Rio JA, Heimrich B, Borrell V, Forster E, Drakew A, Alcantara S, et al. A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. Nature. 1997 Jan 2;385(6611):70-4. PubMed PMID: 8985248.
28. Akbari N, Salmani ME, Goudarzvand M, LashkarBoluki T, Goudarzi I, Abrari K. Unilateral Hypothalamus Inactivation Prevents PTZ Kindling Development through Hippocampal Orexin Receptor 1 Modulation. Basic and clinical neuroscience. 2014 Winter;5(1):66-73. PubMed PMID: 25436086. Pubmed Central PMCID: 4202604.

Original Article

Evaluation of PTZ kindling and lateral hypothalamus inactivation on kindling and hippocampal neuronal survival

Nasibe Akbari
MSc student of Physiology, School of Biology, Damghan University, Damghan, IRAN

****Mahmoud Elahdadi Salmani***
Assistant Professor of Physiology, School of Biology, Damghan University, Damghan, IRAN

Taghi LashkarBolouki
Assistant Professor of Biochemistry, School of Biology, Damghan University, Damghan, IRAN

Mahdi Goudarzvand
Assistant Professor of Physiology, Faculty of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, IRAN

Received:11/07/2015**, Revised:**03/09/2015**, Accepted:**12/11/2015

Correspondence author:
Mahmoud Elahdadi Salmani, PhD; Damghan University
School of Biology, Damghan University, Cheshme Ali Road, Damghan, IRAN
E-mail: elahdadi@du.ac.ir

Abstract

Purpose: Epilepsy, as a plastic change lead to hyperexcitability and structural change. Kindling is the process of repetitive subconvulsive electrical or chemical stimulation induced synaptic and circuit alterations. Lateral hypothalamus (LH) contains the main constellation of orexinergic neurons involved in sleep and waking and even excitability with high numbers of receptors in hippocampus. Thus, we investigate the effect of LH inactivation on kindling development and kindling induced hippocampal neuronal population.

Method: Pentylenetetrazol (PTZ; 45 mg/kg) was used to induce chemical kindling every 48 h up to 13 injections, intraperitoneally. Three consecutive 4 or 5 seizure stages were criteria for kindling. Lidocaine (2%) was injected stereotaxically into right LH, 0.5 h prior to PTZ administration. Nissl staining was used to demonstrate neuronal population survival in CA3 and hilar regions of hippocampus.

Results: LH inactivation prevented PTZ kindling development. Although kindling increased neuronal dispersion in CA3 and hilar regions, LH inactivation was unable to reduce the dispersion. Moreover, kindling did not affect neuronal survival in CA3 and hilus, qualitatively.

Conclusion: It is concluded that kindling induced structural changes is to some extent independent of kindling development and it is not prevented by kindling inhibition through LH inactivation.

Keywords: *Epilepsy; kindling development; Pentylenetetrazol; Lateral hypothalamus;*