

بررسی اثر تحریک الکتریکی با فرکانس پایین بر تشنجات ناشی از کیندلینگ آمیگدال در موش‌های صحرائی

سید مهدی بهشتی نصر^۱، محمد محمدزاده^۲، مهدی زارعی^۳

^۱ مربی گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
^۲ استادیار گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
^۳ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

نشانی نویسنده مسؤول: دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، دکتر محمد محمدزاده
 mohamad1353@gmail.com

وصول: ۹۱/۱/۱۷، اصلاح: ۹۱/۲/۲۵، پذیرش: ۹۱/۳/۲۷

چکیده

مقدمه و هدف: تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (LFS: Low Frequency Stimulation) (کم‌تر از ۵ هرتز) به عنوان یک راهکار درمانی مناسب برای معالجه صرع و تشنجات ناشی از آن؛ محسوب می‌شود. هر یک از الگوهای LFS اثرات متفاوتی بر تشنجات صرعی دارد. با توجه به این که الگوی از LFS که بتواند کاملاً این گونه تشنجات را مهار و سرکوب کند ارائه نشده است؛ در این تحقیق بر آن شدیم تا اثر ۶۰ دقیقه اعمال LFS را بر تشنجات ناشی از کیندلینگ آمیگدال بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی دو گروه موش صحرائی (۱۴ سر) پس از جراحی استرئوتاکسیک و یک هفته دوره بهبودی، تحریکات کیندلینگ (۲ بار در روز) دریافت می‌کردند. حیوانات پس از کیندل شدن؛ در گروه ۱ (n=6)، (۴ بار و یک مرتبه در روز) تنها تحریکات کیندلینگ را دریافت می‌کردند. اما در گروه دوم (n=8)، چهار بار (در فواصل زمانی ۲۴ ساعت) و به مدت ۶۰ دقیقه LFS (فرکانس ۱ هرتز، مدت زمان پالس ۰/۱ میلی ثانیه و شدت تحریک برابر با ۱/۲ آستانه ایجاد امواج تخلیه متعاقب) داده شده و بلافاصله تحریکات کیندلینگ انجام می‌شد. مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (ADD: Afterdischarge Duration)، مدت زمان تأخیری تا شروع مرحله ۲ تشنج (S2L: Stage 2 Latency)، مدت زمان تأخیری تا شروع مرحله ۴ تشنج (S4L: Stage 4 Latency) و مدت زمان مرحله ۵ تشنج (Stage 5 Duration; S5D) روز تحریک LFS با روز قبل (که تنها تحریکات کیندلینگ را دریافت کرده بودند) مقایسه شد.

یافته‌ها: اولین الگوی LFS به کار گرفته شده مدت زمان لازم برای شروع مرحله ۲ و ۴ تشنج را به ترتیب ۹۱/۵ درصد ($P < 0/05$) و ۷۹/۵ درصد ($P < 0/01$) نسبت به گروه کنترل به طور معناداری افزایش داد. اعمال ۴ بار LFS مدت زمان مرحله ۵ تشنج را نیز به طور معناداری کاهش داد؛ به طوری که اولین الگوی LFS این پارامتر را ۱۰۰ درصد کاهش داد. مدت زمان امواج تخلیه متعاقب تحت تأثیر ۴ روز LFS تنها در ۲ روز اول به ترتیب ۶/۹ درصد و ۴/۴ درصد به طور معناداری ($P < 0/05$) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که اعمال LFS بلافاصله قبل از شروع تشنجات صرعی موجب کاهش شدت حملات تشنجی گردید. (مجله دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۱۹/ شماره ۳/ صص ۲۲۷-۲۱۷).

واژه‌های کلیدی: صرع، تشنج، تحریک الکتریکی با فرکانس پایین، موش‌های صحرائی.

مقدمه

صرع از جمله اختلالات رایج عصبی است که دانسته‌های فعلی در مورد مکانیسم‌های ایجاد و درمان قطعی آن ناکامل است. مطابق با آمارهای انجام شده، شیوع صرع در جمعیت انسانی حدود ۱ درصد است (۱). با استفاده از مدل‌های آزمایشگاهی ایجاد تشنج، مطالعات فراوانی به منظور درمان صرع در حال انجام است. یکی از مدل‌های رایج تشنج، کیندلینگ است که در آن با تحریک مکرر ناحیه خاصی از مغز در حیوانات آزمایشگاهی تشنج ایجاد می‌شود. روش‌های درمانی رایج به‌طور کامل در درمان تعداد زیادی از اختلالات مربوط به صرع موفق نبودند چنان‌که داروهای ضد صرع موجود فقط در ۴۰ درصد موارد، تشنج را از بین می‌برند؛ و در بقیه موارد فقط فراوانی وقوع تشنج‌ها را کم می‌کنند (۲). از این رو نیاز به دستیابی به روش‌های درمانی جدید و مؤثر ضروری به نظر می‌رسد.

موفقیت‌های اخیر روش تحریکی مغزی در درمان اختلالات حرکتی (۳) محققین را بر این داشته است که از روش تحریک درمانی به‌عنوان یک روش جدید، جایگزین روش دارویی برای معالجه برخی از اختلالات مغزی از جمله صرع استفاده نمایند (۴). تحریک عمیق مغزی ممکن است در کاهش شدت تشنج ناشی از مدل‌های تشنجی مختلف مانند کیندلینگ مؤثر باشد (۵). اگر چه برخی از مطالعات اثرات تحریک الکتریکی با فرکانس بالا (HFS: High Frequency Stimulation) را مورد بررسی قرار داده‌اند (۶-۸) اما آزمایشات جدید (۵،۹،۱۰) و بالینی (۱۱-۱۳)، مدارکی را ارائه کرده‌اند که نشان می‌دهد تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (LFS: Low Frequency Stimulation) روی تشنج اثر مهارتی بیشتری دارد.

نشان داده شده است که (فرکانس ۱-۳ هرتز) LFS موجب تضعیف (Depression) (۱۴) و تقویت‌زدایی (Depotentiation) (۱۵) طولانی مدت شده و از طریق

افزایش آستانه امواج تخلیه متعاقب و تشنج باعث ایجاد تأثیرات حفاظتی نیرومند و پایداری روی فعالیت صرعی می‌شود (۱۶-۱۸). به‌طور بالینی، LFS یک تأثیر مهارتی روی اسپایک‌های صرعی دارد و گزارش شده که می‌تواند موجب کاهش اسپایک‌های زمان حمله در بیماران با صرع لوب گیجگاهی شود (۱۳). همچنین LFS می‌تواند تأثیرات بازدارندگی روی فعالیت صرعی در حیوانات بالغ و نابالغ داشته باشد (۱۰،۱۳،۱۹).

برخی از مطالعات پیشین سعی کرده‌اند تا بهترین الگوی LFS را جهت مهار و سرکوب تشنجات صرعی بررسی کنند؛ که از جمله می‌توان به مطالعه قربانی و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۲۰) و جهانشاهی و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۲۱) اشاره کرد.

مطالعات دیگری نیز وجود دارد که سعی کرده‌اند اثرات الگوی خاصی از LFS را روی پارامترهای رفتاری و الکتریکی جهت بهبود صرع بررسی کنند (۱۰،۲۲). با توجه به این‌که هر یک از الگوهای LFS اثرات متفاوتی بر تشنجات صرعی داشته و الگویی از LFS که بتواند کاملاً این گونه تشنجات را مهار و سرکوب کند ارائه نشده است. در مطالعه حاضر سعی شده است با در نظر گرفتن مطالعات پیشین از بهترین الگوی به‌کار برده شده در آن تحقیقات به منظور طراحی یک الگوی جدید و مؤثر استفاده شود. از این رو ۶۰ دقیقه الگوی LFS (فرکانس ۱ هرتز، مدت زمان پالس ۰/۱ میلی ثانیه و شدت تحریک برابر با $\frac{1}{4}$ آستانه ایجاد امواج تخلیه متعاقب) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی موش‌های صحرایی نر (۱۴ سر) در محدوده وزنی ۲۸۰ تا ۳۲۰ گرم در ۲ گروه تجربی به صورت تصادفی تقسیم شدند. موش‌ها پس از جراحی استرئوتاکسیک و یک هفته دوره بهبودی، تحریکات کیندلینگ (۲ بار در روز) را دریافت می‌-

به فواصل ۵ دقیقه افزایش داده می‌شد تا وقتی که امواج تخلیه متعاقب ثبت گردد. سپس حیوانات با این شدت جریان آستانه روزانه دو بار (با فاصله زمانی ۶ ساعت) تحریک می‌شدند، تا مراحل مختلف تشنج را نشان داده و کیندل شوند (۲۶).

با ادامه تحریکات به تدریج هم‌زمان با ثبت امواج تخلیه متعاقب، علائم رفتاری مشاهده شده بر اساس روش ریسین (Racine, 1972) به پنج مرحله تقسیم و ثبت می‌گردید (۲۷).

مرحله یک: حرکات دهان و صورت؛ مرحله دو: تکان دادن سر به طرف بالا و پایین؛ مرحله سه: کلونوس یک اندام جلویی که در سمت مخالف ناحیه تحریک شده می‌باشد؛ مرحله چهار: ایستادن روی دو پای عقب همراه با کلونوس دو اندام جلویی؛ مرحله پنجم: ایستادن روی دو پا، از دست دادن تعادل و به زمین خوردن کمیت‌های تشنجی مورد ثبت پس از هر بار تحریک حیوان به شرح زیر می‌باشند:

- ۱- مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (ADD: Afterdischarge duration)
- ۲- مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۱ تشنج (S1L: Stage 1 Latency)
- ۳- مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۲ تشنج (S2L: Stage 2 Latency)
- ۴- مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۳ تشنج (S3L: Stage 3 Latency)
- ۵- مدت زمان تأخیری بین تحریک الکتریکی تا شروع مرحله ۴ تشنج (S4L: Stage 4 Latency)
- ۶- مدت زمان مرحله ۵ تشنج (S5D: Stage 5 Duration)

مراحل آزمایش

بررسی اثر تحریک الکتریکی با فرکانس پایین در موش‌های کیندل شده: مراحل انجام کار در گروه‌های مورد استفاده در این آزمایش به شرح زیر بود:

کردند (۲۳). حیوانات پس از کیندل شدن؛ در گروه ۱ ($n=6$)، (۴ بار و یک مرتبه در روز) تنها تحریکات کیندلینگ را دریافت می‌کردند. اما در گروه دوم ($n=8$)، چهار بار (در فواصل زمانی ۲۴ ساعت) و به مدت ۶۰ دقیقه LFS (فرکانس ۱ هرتز، مدت زمان پالس ۰/۱ میلی ثانیه و شدت تحریک برابر با $\frac{1}{4}$ آستانه ایجاد امواج تخلیه متعاقب) داده شده و بلافاصله تحریکات کیندلینگ انجام می‌شد.

برای بیهوش کردن حیوان از کتامین (mg/kg) ۱۰۰ و رامپون ($20 mg/kg$) به صورت داخل صفاقی استفاده شد (۲۴). پس از بیهوش کردن و کوتاه کردن موهای سر، حیوان در دستگاه استریوتاکسی قرار می‌گرفت. با استفاده از تیغ جراحی شکافی در پوست سر ایجاد و بر اساس اطلس پاکسینوس (۲۵)، مختصات محل کارگذاری الکتروود در هسته‌های قاعده‌ای جانبی آمیگدال مشخص می‌گردید. مختصات آمیگدال در سطح حجمه نسبت به برگما (بر حسب میلی‌متر: $AP = -2/5$ ، $L = +4/8$ و $V = 7/5$ نسبت به سخت شامه) می‌باشد.

پس از تعیین دقیق نقطه فوق و ایجاد سوراخ در حجمه الکتروود سه قطبی در محل مخصوص به خود قرار داده شده و توسط سیمان دندانپزشکی محکم می‌گردید. دو الکتروود تک قطبی نیز توسط پیچ‌های متصل به آنها به سطح حجمه محکم می‌شدند. پس از قرار دادن الکتروودها، پین‌های متصل به آنها در داخل مادگی سوکت مخابراتی قرار داده می‌شد و سوکت توسط سیمان دندانپزشکی بر روی سر حیوان متصل می‌گردید.

حداقل یک هفته بعد از جراحی، از شدت آستانه به منظور تحریک الکتریکی استفاده می‌شد. برای به دست آوردن شدت آستانه، ابتدا حیوان مورد نظر توسط جریانی به شدت ۱۰ میکروآمپر تحریک می‌گردید. اگر امواج تخلیه متعاقب (حداقل به مدت ۵ ثانیه) ثبت می‌شدند، این شدت جریان به عنوان شدت جریان آستانه شناخته می‌شد. در غیر این صورت، هر بار شدت جریان ۱۰ میکروآمپر

گروه اول: در این گروه (n=6)، تحریک حیوانات (۲ بار در روز) تا کیندل شدن انجام می‌گرفت. پس از کیندل شدن تحریکات ادامه می‌یافت تا کمیت‌های تشنجی تثبیت شوند. سپس چهار بار (در فواصل زمانی ۲۴ ساعت) در باکس محل تحریک قرار گرفته و پس از ۶۰ دقیقه تحریکات کیندلینگ را دریافت می‌کردند.

در گروه دوم (n=8)، تمامی مراحل کار مشابه گروه اول می‌باشد به استثنای این‌که چهار بار به مدت ۶۰ دقیقه LFS (فرکانس ۱ هرتز، مدت زمان پالس ۰/۱ میلی ثانیه و شدت تحریک برابر با $\frac{1}{2}$ آستانه ایجاد امواج تخلیه متعاقب) داده شده و بلافاصله تحریکات کیندلینگ انجام می‌شد سپس روز تحریک LFS با روز قبل (که تنها تحریکات کیندلینگ را دریافت کرده بودند) مقایسه شد.

تأیید بافت‌شناسی

پس از پایان هر آزمایش جهت اطمینان از قرار داشتن الکتروود در محل مورد نظر، مغز حیوان* خارج و در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. بعد از یک هفته از محل الکتروود برش‌گیری به عمل آمده تا محل الکتروود مشخص گردد.

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار Statistica استفاده شد. برای مقایسه کمیت‌های تشنج بین دو گروه از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس از نوع Repeated measure و پس از آزمون توکی استفاده شد. جهت نمایش اختلاف بین داده‌ها، با استفاده از آزمون تی زوج‌ها هر یک از کمیت‌های با کنترل مربوط، استفاده گردید. $P < 0/05$ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین شدت تحریکات آستانه برای شروع امواج تخلیه‌های متعاقب در گروه اول $4 \pm 8/5$ و گروه دوم 15 ± 71 بود که تفاوت معناداری با هم نداشت. این بدان معناست که استعداد ابتلا به حملات تشنجی در هر دو

گروه یکسان می‌باشد.

پس از کیندل شدن و تثبیت کمیت‌های تشنجی به هر دو گروه تحریکات کیندلینگ (چهار بار در فواصل زمانی ۲۴ ساعت) اعمال می‌شد؛ اما گروه دوم LFS به مدت ۶۰ دقیقه قبل از تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند. در نهایت کمیت‌های تشنجی اندازه‌گیری و ثبت می‌گردید.

الف) اثر LFS بر مدت زمان تأخیری تا مرحله ۲ تشنج (S2L)

اعمال اولین LFS با الگوی ارائه شده S2L را از $10 \pm 57/5$ به 30 ± 149 درصد نسبت به گروه کنترل افزایش داد. در تحریکات بعدی نیز این افزایش ادامه داشت به طوری که در تحریک دوم این پارامتر از $9 \pm 57/5$ به 28 ± 128 درصد و در تحریک سوم از 9 ± 55 به 25 ± 110 درصد و در تحریک چهارم از 10 ± 55 به 20 ± 97 درصد رسید (نمودار ۱)؛ اما آزمون تجزیه و تحلیل واریانس از نوع Repeated measure نشان‌دهنده معنادار بودن اعمال LFS تنها در اولین تحریک بود $(F_{(3,33)} = 3/4, P < 0/05)$.

ب) اثر LFS بر مدت زمان تأخیری تا مرحله ۴ تشنج (S4L)

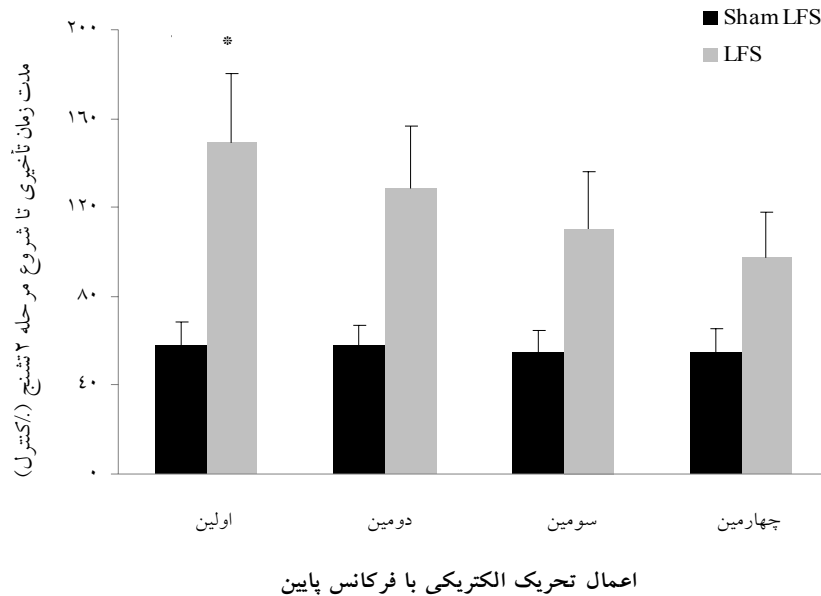
اعمال اولین LFS با الگوی ارائه شده S4L را از $3 \pm 67/2$ به $18 \pm 146/7$ درصد نسبت به گروه کنترل افزایش داد. این افزایش در تحریکات بعدی نیز ادامه داشت به طوری که در تحریک دوم این پارامتر از $3 \pm 67/2$ به 18 ± 129 درصد و در تحریک سوم از $4 \pm 63/7$ به $9 \pm 116/17$ درصد و تحریک چهارم از $5 \pm 63/7$ به $3 \pm 108/17$ درصد رسید؛ اما این افزایش‌ها از نظر آماری تنها در سه تحریک نخست معنادار بودند $(P < 0/01)$ (نمودار ۲).

ج) اثر LFS بر مدت زمان مرحله ۵ تشنج (S5D)

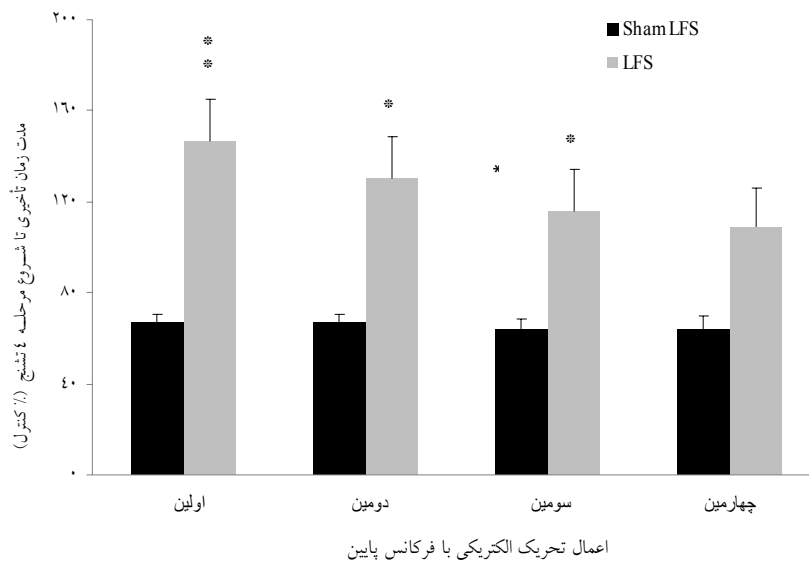
اعمال اولین LFS با الگوی ارائه شده S5D را از 8 ± 100 درصد به صفر نسبت به گروه کنترل کاهش داد. این کاهش در تحریکات بعدی نیز ادامه داشت به طوری

د) اثر LFS بر مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (ADD) اعمال اولین LFS با الگوی ارائه شده ADD را از $110/3 \pm 8$ به $63/4 \pm 10$ درصد نسبت به گروه کنترل کاهش داد. این کاهش در تحریکات بعدی نیز ادامه داشت؛ به طوری که در تحریک دوم این پارامتر از

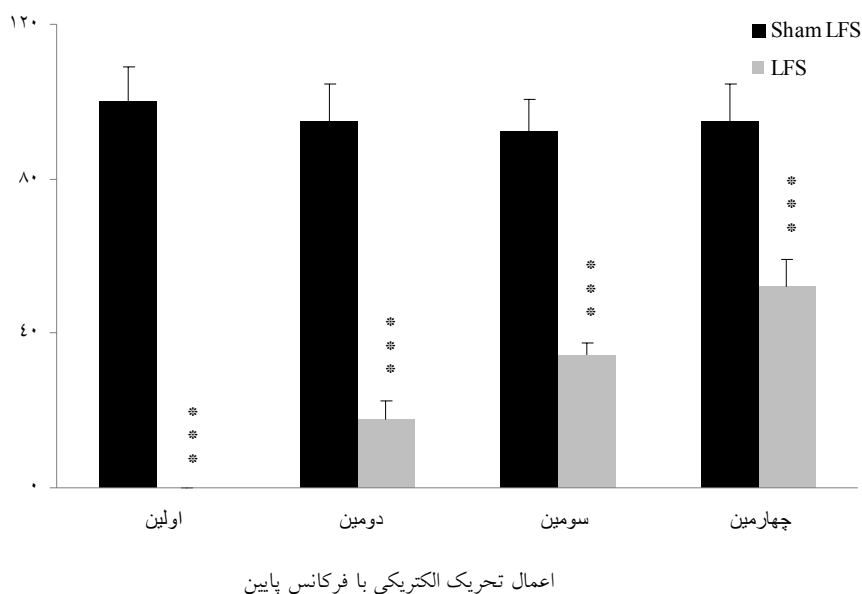
که در تحریک دوم این پارامتر از $94/7 \pm 9$ به $17/7 \pm 4$ درصد و در تحریک سوم از $92/1 \pm 8$ به $34/3 \pm 2$ درصد و تحریک چهارم از $94/7 \pm 9$ به 52 ± 7 درصد رسید. این کاهش‌ها در هر چهار تحریک از نظر آماری معنادار بودند ($F_{(3,33)}=21/6, P<0/001$) (نمودار ۳).



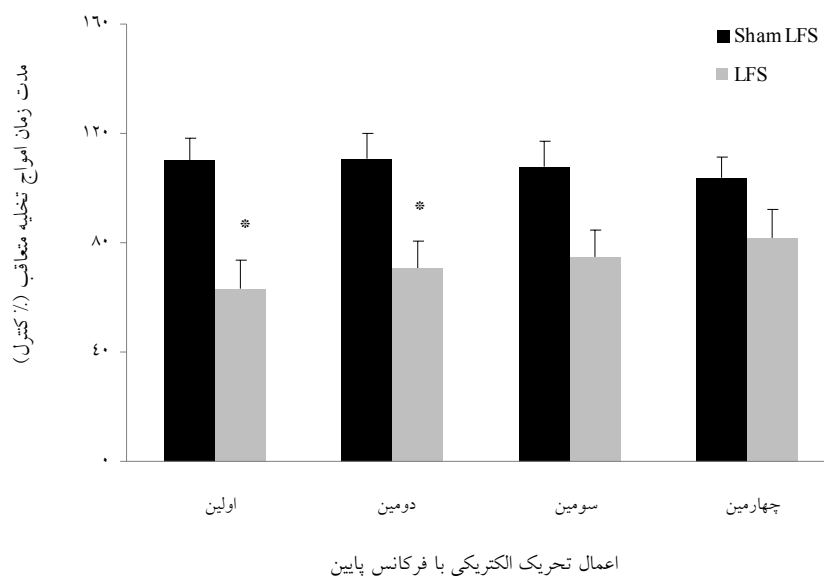
نمودار ۱: اثر LFS بر مدت زمان تأخیری تا شروع مرحله ۲. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار میانگین نشان داده شده‌اند (نتایج به صورت درصد کنترل نشان داده شده است) * نشان‌دهنده $P < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.



نمودار ۲: اثر LFS بر مدت زمان تأخیری تا شروع مرحله ۴. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار میانگین نشان داده شده‌اند (نتایج به صورت درصد کنترل نشان داده شده است). * نشان‌دهنده $P < 0/05$ ، ** نشان‌دهنده $P < 0/01$ در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.



نمودار ۳: اثر LFS بر مدت زمان مرحله ۵ تشنج. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار میانگین نشان داده شده‌اند (نتایج به صورت درصد کنترل نشان داده شده است). ** نشان‌دهنده $P < 0.01$ ، *** نشان‌دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.



نمودار ۴: اثر LFS بر مدت زمان امواج تخلیه متعاقب. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار میانگین نشان داده شده‌اند (نتایج به صورت درصد کنترل نشان داده شده است). * نشان‌دهنده $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد اعمال ۴ بار تحریک LFS (به فواصل زمانی ۲۴ ساعت) در موش‌های کیندل شده کاهش معنادار کمیت‌های رفتاری (S5D) و الکتروفیز-یولوژیک (ADD) را به همراه داشت. چنان‌که الگوی

۱۱۰/۸±۸ به ۷۰/۴±۱۰ درصد و در تحریک سوم از ۱۰۷/۸±۹ به ۷۴/۵±۱۰ درصد و تحریک چهارم از ۱۰۳/۸±۷ به ۸۱/۵۹±۱۰ درصد رسید. اما این کاهش‌ها از نظر آماری فقط در ۲ تحریک اول معنادار بودند ($F_{(3,33)}=41, P<0.001$) (نمودار ۴).

مورد استفاده روی مرحله ۱ و ۳ تشنج تأثیر معناداری نداشت؛ اما موجب به تأخیر انداختن معنی دار مرحله ۲ و ۴ تشنج گردید. مراحل ۵ گانه تشنجات کیندلینگ را می توان به دو دوره تقسیم کرد: دوره کانونی شدن تشنجات که شامل مراحل ۱ تا ۳ می شود و دوره عمومی شدن تشنجات که شامل مراحل ۴ و ۵ است (۲۸). با توجه به تأثیرات ضد تشنجی این الگوی LFS روی S4L شاید بتوان گفت که نقش اصلی LFS مهار مرحله گذر از تشنجات کانونی به تشنجات عمومی است که این نتایج در راستای کار جهانشاهی و همکاران می باشد (۲۹). مدت زمان مرحله پنجم تشنج (S5D) در این مطالعه به طور معناداری کاهش یافت. چنان که تأثیرات الگوی ارائه شده در کاهش S5D نسبت به تحقیقات گذشته (۱۰،۲۰،۲۲)، چشمگیرتر بود. به طوری که حتی این پارامتر تشنجی در اعمال اولین LFS مشاهده نشد. همچنین مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (ADD) فقط در اولین تحریک های LFS به طور معناداری کاهش یافت که مشابه با یافته های گیلبرت می باشد (۳۰،۳۱). این عدم ارتباط بین مراحل تشنج و مدت ADD پیشنهاد می کند که ممکن است مکانیسم های مستقلی شاخصه ای رفتاری و الکتروگرافیک کیندلینگ را کنترل کند (۳۰،۳۱). در این تحقیق مشاهده شد با تکرار تحریکات LFS اثرات مهاری آن روی پارامترهای تشنج رفته رفته کاهش پیدا می کند؛ که به نظر می رسد مربوط به سازگاری نوروها به الگوی LFS اعمالی است.

مطالعات نشان داده اند که یک ارتباط پیچیده بین الگوی LFS و تأثیرات آن روی کیندلینگ وجود دارد. تأثیرات بازدارندگی LFS به پارامترهایی مثل فرکانس، مدت پالس، شدت پالس، مدت زمان اعمال LFS و تعداد تحریکات LFS بستگی دارد. قربانی و همکاران ۲۰۰۷ (۲۰)، چندین الگوی متفاوت از LFS را در موش های کاملاً کیندل شده مورد بررسی قرار دادند و از تحریک LFS به صورت موج مربعی تک فاز با فرکانس ۱ هرتز

استفاده کردند. آنها در مرحله اول برای مدت ۱ دقیقه از مدت پالس متفاوت (۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی ثانیه) و شدت آستانه متفاوت (ADT، ۳ADT، ADT و ۱/۴ ADT) استفاده کردند. تنها الگوی ۱ دقیقه، مدت پالس ۱۰ میلی ثانیه و شدت آستانه برابر با ADT به طور معناداری مدت زمان مرحله پنجم تشنج (S5D) را کاهش داد. در مرحله دوم برای مدت ۱۵ دقیقه از مدت پالس متفاوت (۰/۱، ۰/۰۵ و ۱ میلی ثانیه) و شدت آستانه متفاوت (ADT، ۳ADT و ۱/۴ ADT) برای ۷ روز استفاده کردند. در این مرحله دو الگوی (۰/۱ میلی ثانیه و ADT) و (۱ ms و ۱/۴ ADT) به طور معناداری S5D را کاهش داد که اثرات ضد تشنجی LFS در الگوی (۰/۱ میلی ثانیه و ADT) مشهودتر بود.

در مطالعه قربانی و همکاران (۲۰)، زمانی که از الگوی LFS یک بار به مدت ۱ دقیقه استفاده شد تأثیرات مهاری معناداری مشاهده نشد. اما گدمن و همکاران (۱۰)، اگر چه از مدت زمان LFS ۳۰ ثانیه ای استفاده کردند؛ اما با افزایش تعداد دفعات اعمال LFS به ۲۰ تحریک (۲۰ روز) کاهش معناداری در پارامترهای تشنجی مشاهده کردند. قربانی و همکاران (۲۰) نیز مدت زمان اعمال LFS را به ۱۵ دقیقه و برای ۷ روز (یک بار در روز) افزایش دادند که نتایج معناداری را مشاهده نمودند. از آنجایی که مدت ارائه LFS یک پارامتر مهم در اعمال تأثیرات بازدارندگی در مراحل تشنجی است (۲۰)، از این رو به نظر می رسد یک تعامل بین مدت زمان و تعداد دفعات ارائه LFS وجود داشته باشد. بنابراین، در مطالعه حاضر از الگوی LFS به مدت ۶۰ دقیقه به تعداد ۴ بار (یک بار در روز) استفاده شد.

با توجه به یافته های هیستولوژی مطالعه قربانی و همکاران (۲۰)، اثرات ضد تشنجی الگوی (۱۰ ms و ADT) ناشی از آسیب بافتی بوده، از این رو این مدت پالس در طراحی الگوی LFS توصیه نمی شود. به طوری که آنها مدت پالس ۱۲۵ ms استفاده شده در LFS توسط همکاران را (۳۲) مورد انتقاد قرار داده و اثرات ضد

تشنجی مشاهده شده در مطالعه آن‌ها را ناشی از تخریب بافتی عنوان کردند. با توجه به این یافته‌ها و همچنین مطالعات انجام شده توسط نویسندگان مقاله حاضر (۵,۳۳) و لپز و همکاران ۲۰۰۴ (۲۲) سعی شد بهترین مدت زمان پالس به کار گرفته شده در LFS که دارای بیشترین اثرات ضد تشنجی می‌باشد انتخاب شود، از این-رو مدت پالس ۰/۱ برای مطالعه حاضر انتخاب شد.

در ارتباط با شدت پالس استفاده شده در الگوی مطالعه حاضر باید گفت که اکثر مطالعات از شدت‌های متفاوتی در دامنه ADD ۳- ۱/۸ استفاده نموده‌اند که یافته‌های متفاوتی گزارش کرده‌اند (۵,۱۰,۲۰,۲۲,۳۳). با این حال قربانی و همکاران (۲۰)، اشاره کرده‌اند که ممکن است بین شدت پالس و مدت پالس ارتباط معکوسی باشد، اما این یافته با نتایج مشاهده شده در برخی از مطالعات متفاوت می‌باشد. از این‌رو با توجه به نتایج مطالعات قربانی و گودمن (۱۰,۲۰) در این مطالعه از شدت پالس ۱/۲ADT استفاده شد.

برخی از مطالعات گزارش کرده‌اند که بهترین فرکانس برای الگوی LFS ۱ تا ۳ هرتز است (۹,۱۶). جهانشاهی و همکاران (۲۹)، نیز با بررسی سه فرکانس (۰/۵، ۱ و ۵ هرتز) در الگوی LFS مشاهده کردند که فرکانس ۱ هرتز بیشترین تأثیر بازدارندگی روی پارامترهای تشنجی دارد. به علاوه قربانی و همکاران (۲۰) و گدمن و همکاران (۱۰) نیز در فرکانس ۱ هرتز بیشترین تأثیر را مشاهده کردند. از این‌رو در مطالعه حاضر نیز از فرکانس ۱ هرتز استفاده شد. در نهایت الگوی ۶۰ دقیقه تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (۱ هرتز، مدت زمان پالس ۰/۱ میلی ثانیه و شدت تحریک برابر با ۱/۲ آستانه ایجاد امواج تخلیه متعاقب) برای ۴ مرتبه (فاصله‌های زمانی ۲۴ ساعته) در این مطالعه استفاده شد.

هر چند مکانیسم‌هایی که LFS از طریق آنها اثرات ضد تشنجی خود را اعمال می‌کند هنوز روشن نشده است، به کار بردن تحریکات کیندلینگ سبب افزایش دائمی

تحریک‌پذیری نورون‌ها در مدارهای نورونی مسؤوَل گسترش فعالیت تشنجی می‌شود و این افزایش تحریک‌پذیری موجب پیشرفت روند صرع‌زایی ناشی از کیندلینگ می‌شود (۳۴,۳۵). یکی از مکانیسم‌های احتمالی که ممکن است در پیشرفت روند صرع نقش داشته باشد ایجاد تقویت طولانی مدت (LTP) است؛ در واقع LTP شباهت‌های آناتومیکی و فیزیولوژیک زیادی را با صرع نشان می‌دهد که پیشنهاد می‌کند LTP یکی از مکانیسم‌های دخیل در روند صرع‌زایی است (۳۶)؛ از طرفی مطالعات قبلی نشان می‌دهد که LFS باعث مهار LTP ایجاد شدن در هردو محیط زنده و آزمایشگاهی می‌شود. بنابراین، با توجه به اثرات مهار LFS بر LTP و احتمال وقوع LTP در حین کیندلینگ، ممکن است LFS با کاهش پاسخ‌دهی سیناپسی در مدارهای صرعی از طریق مکانیسم‌هایی مثل تضعیف طولانی مدت (LTDP: Long term depression) و تضعیف پس از تقویت، سبب مهار روند گسترش فعالیت‌های تشنجی شود. برخی مطالعات پیشنهاد می‌کنند که LFS از طریق القای LTD+LTP ایجاد شده طی کیندلینگ را معکوس کرده و سبب مهار روند صرع‌زایی می‌شود (۱۸,۱۹).

با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد که اعمال ۶۰ دقیقه تحریک الکتریکی با فرکانس پایین ۱ هرتز، مدت زمان پالس ۰/۱ میلی ثانیه و شدت تحریک برابر با ۱/۲ آستانه ایجاد امواج تخلیه متعاقب بلافاصله قبل از شروع تشنج‌های صرعی راهکار مناسبی برای کاهش شدت حملات تشنجی باشد و توجه متخصصین و محققین این زمینه را بیش از پیش به LFS جلب می‌نماید.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقاتی سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار به جهت تأمین منابع مالی این طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. McNamara JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *NATURE-LONDON*. 1999;15-22.
2. Jasper HH. *Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 1969.
3. Benabid AL, Koudsie A, Benazzouz A, Piallat B, Krack P, Limousin-Dowsey P, et al. Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Advances in neurology*. 2001;86:405.
4. Luders H. *Deep Brain Stimulation and Epilepsy*. 2003.
5. Mohammad-Zadeh M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Javan M, Ghorbani P, Sadegh M, et al. Effect of low frequency stimulation of perforant path on kindling rate and synaptic transmission in the dentate gyrus during kindling acquisition in rats. *Epilepsy research*. 2007;75(2-3):154-61.
6. Boon P, De Herdt V, Vonck K, Van Roost D. Clinical experience with vagus nerve stimulation and deep brain stimulation in epilepsy. *Acta neurochirurgica*. 2007;97(Pt 2):273-80.
7. Boon P, Vonck K, De Herdt V, Van Dycke A, Goethals M, Goossens L, et al. Deep brain stimulation in patients with refractory temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2007;48(8):1600-05.
8. Van Roost D, Boon P, Vonck K, Caemaert J. Neurosurgical aspects of temporal deep brain stimulation for epilepsy. *Acta neurochirurgica*. 2007;97(Pt 2):333-6.
9. Gaito J, Gaito ST. The effect of several intertrial intervals on the 1 Hz interference effect. *The Canadian journal of neurological sciences*. 1981;8(1):61-5.
10. Goodman JH, Berger RE, Tchong TK. Preemptive low-frequency stimulation decreases the incidence of amygdala-kindled seizures. *Epilepsia*. 2005;46(1):1-7.
11. Kinoshita M, Ikeda A, Matsumoto R, Begum T, Usui K, Yamamoto J, et al. Electric stimulation on human cortex suppresses fast cortical activity and epileptic spikes. *Epilepsia*. 2004;45(7):787-91.
12. Yamamoto J, Ikeda A, Kinoshita M, Matsumoto R, Satow T, Takeshita K, et al. Low-frequency electric cortical stimulation decreases interictal and ictal activity in human epilepsy. *Seizure*. 2006;15(7):520-7.
13. Yamamoto J, Ikeda A, Satow T, Takeshita K, Takayama M, Matsushashi M, et al. Low-frequency electric cortical stimulation has an inhibitory effect on epileptic focus in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2002;43(5):491-5.
14. Fujii S, Saito K, Miyakawa H, Ito K, Kato H. Reversal of long-term potentiation (depotential) induced by tetanus stimulation of the input to CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Brain research*. 1991;555(1):112-22.
15. Kulla A, Reymann KG, Manahan-Vaughan D. Time-dependent induction of depotential in the dentate gyrus of freely moving rats: involvement of group 2 metabotropic glutamate receptors. *The European journal of neuroscience*. 1999;11(11):3864-72.
16. Gaito J, Nobrega JN, Gaito ST. Interference effect of 3 Hz brain stimulation on kindling behavior induced by 60 Hz stimulation. *Epilepsia*. 1980;21(1):73-84.
17. Weiss SR, Eidsath A, Li XL, Heynen T, Post RM. Quenching revisited: low level direct current inhibits amygdala-kindled seizures. *Experimental neurology*. 1998;154(1):185-92.
18. Weiss SR, Li XL, Rosen JB, Li H, Heynen T, Post RM. Quenching: inhibition of development and expression of amygdala kindled seizures with low frequency stimulation. *Neuroreport*. 1995;6(16):2171-6.
19. Velisek L, Veliskova J, Stanton PK. Low-frequency stimulation of the kindling focus delays basolateral amygdala kindling in immature rats. *Neuroscience letters*. 2002;326(1):61-3.
20. Ghorbani P, Mohammad-Zadeh M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y. Effect of different patterns of low-frequency stimulation on piriform cortex kindled seizures. *Neuroscience letters*. 2007;425(3):162-6.
21. Jahanshahi A, Mirnajafi-Zadeh J, Javan M, Mohammad-Zadeh M, Rohani R. The antiepileptogenic effect of electrical stimulation at different low frequencies is accompanied with change in adenosine receptors gene expression in rats. *Epilepsia*. 2009;50(7):1768-79.
22. Lopez-Meraz ML, Neri-Bazan L, Rocha L. Low frequency stimulation modifies receptor binding in rat brain. *Epilepsy research*. 2004;59(2-3):95-105.
23. Beheshti Nasr SM, Mohammad-Zadeh M, Moghimi A. The Role of Minocycline on Amygdala-Kindled Seizures in Rat. *Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2012;19(1):14-25.
24. Gurbanova AA, Aker RG, Sirvanci S, Demiralp T, Onat FY. Intra-amygdaloid injection of kainic acid in rats

- with genetic absence epilepsy: the relationship of typical absence epilepsy and temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2008;28(31):7828-36.
25. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*: Academic press 2007.
 26. Shindo A, Nakamura T, Matsumoto Y, Kawai N, Okano H, Nagao S, et al. Seizure suppression in amygdala-kindled mice by transplantation of neural stem/progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells. *Neurologia medico-chirurgica*. 2010;50(2):98-105; discussion -6.
 27. Carlson NR, Braun J. *Emotion*, In: *Foundations of physiological psychology*: Allyn and Bacon Boston 1995.
 28. Sato M, Racine RJ, McIntyre DC. Kindling: basic mechanisms and clinical validity. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1990;76(5):459-72
 29. Jahanshahi A, Mirnajafi-Zadeh J, Javan M, Mohammad-Zadeh M, Rohani R. Effect of Low-Frequency Stimulation on Adenosine A1 and A2A Receptors Gene Expression in Dentate Gyrus of Perforant Path Kindled Rats. 2008;10:87-92.
 30. Gilbert ME. Potentiation of inhibition with perforant path kindling: an NMDA-receptor dependent process. *Brain research*. 1991;564(1):109-16.
 31. Gilbert ME. The NMDA antagonist MK-801 suppresses behavioral seizures, augments afterdischarges, but does not block development of perforant path kindling. *Epilepsy research*. 1994;17(2):145-56.
 32. Ullal GR, Ninchoji T, Uemura K. Low frequency stimulation induces an increase in after-discharge thresholds in hippocampal and amygdaloid kindling. *Epilepsy research*. 1989;3(3):232. ۵-
 33. Mohammad-Zadeh M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Javan M, Jahanshahi A, Noorbakhsh SM, et al. The role of adenosine A(1) receptors in mediating the inhibitory effects of low frequency stimulation of perforant path on kindling acquisition in rats. *Neuroscience*. 2009;158(4):1632-43.
 34. Mazarati A, Wasterlain CG. Anticonvulsant effects of four neuropeptides in the rat hippocampus during self-sustaining status epilepticus. *Neuroscience letters*. 2002;331(2):123-7.
 35. McIntyre DC, Wong RK. Cellular and synaptic properties of amygdala-kindled pyriform cortex in vitro. *Journal of neurophysiology*. 1986;55(6):1295-307.
 36. Wasterlain CG, Mazarati AM, Naylor D, Niquet J, Liu H, Suchomelova L, et al. Short-term plasticity of hippocampal neuropeptides and neuronal circuitry in experimental status epilepticus. *Epilepsia*. 2002;43 Suppl 5:20-9.

The effect of low-frequency electrical stimulation on amygdala-kindled seizures in rat

Beheshti Nasr SM., MSc

Instructor of Physiology, Cellular and Molecular Biology Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.

Mohammad-Zadeh M., Ph.D

Assistant Professor of Physiology, Cellular and Molecular Biology Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.

Zarei M., MSc

PhD Student, Exercise Physiology, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.

Received:05/04/2012, Revised:04/05/2012, Accepted:16/06/2012

Corresponding author:

Dr. Mohammad Mohammad-Zadeh, Cellular and Molecular Biology Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.
E-mail: mohamad1353@gmail.com

Abstract

Background: Low-frequency stimulation (LFS) (<5 Hz) is a suitable approach for treating seizures caused by epilepsy. Different patterns of LFS have different effects on epileptic seizures. Since no LFS pattern has so far been determined to have the best efficacy in seizure quenching, this study investigated the effect of 60-min application of LFS on amygdala-kindled seizures in rat.

Materials and Methods: In this experimental study, two groups of animals (14 rats) received twice-daily kindling stimulations after stereotactic surgery and a 1-week recovery period. In group 1 (n=6), fully kindled animals received daily kindling stimulations for four days, while in group 2 (n=8), kindled animals received LFS (1 Hz, 0.1 ms pulse duration, 1/2 afterdischarge threshold intensity) four times (in 24-hour intervals) exactly before kindling stimulations. Afterdischarge duration (ADD), stage 2 latency (S2L), stage 4 latency (S4L), and stage 5 duration (S5D) were recorded and compared with related control groups (the same animals that had received only kindling stimulation). Data was analyzed using repeated-measures ANOVA and post-hoc Tukey's test for within-group comparisons and Student's t-test for between-group comparisons.

Results: The first LFS application resulted in a significant increase of S2L and S4L by 91.5% (p<0.05) and 79.5% (p<0.01) compared with control group, respectively. Four-day consecutive LFS applications decreased S5D significantly, so that the first LFS application decreased S5D by 100% (p<0.001). In the first 2 days of LFS application, ADD decreased significantly by 46.9% and 40.4% (p<0.05), respectively, relative to control.

Conclusion: The results suggest that LFS application immediately before seizure initiation has anticonvulsant effects. (Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, Volume 19, Number 3, pp.217-227).

Keywords: Epilepsy, Seizure, Low-frequency stimulation, Rats