

تأثیر تحریکات الکتریکی با فرکانس‌های پایین بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت و تغییرات فراساختاری ناحیه ژيروس دنداندار در موش صحرایی

رضیه روحانی^۱، سید جواد میر نجفی زاده^۲، علی جهانشاهی انور^۳، یوسف صادقی^۴، عباس پیریایی^۵، مریم زراعتی^۶

^۱ کارشناس ارشد آزمایشگاه، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۲ استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۳ دانش آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۴ استاد گروه بیولوژی و علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۵ استاد یار گروه بیولوژی و علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۶ دانش آموخته دکترای فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

نشانی نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، بخش میکروسکوپ الکترونی، رضیه روحانی

E-mail: raziehr@yahoo.com

وصول: ۸۹/۳/۱۰، اصلاح: ۸۹/۴/۱۵، پذیرش: ۸۹/۵/۲

چکیده

زمینه و هدف: اعمال تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (LFS) باعث ایجاد اثرات ضد تشنجی می‌شود. در این تحقیق، تأثیر فرکانس‌های مختلف LFS بر اثر ضد تشنجی آن با بررسی تغییرات رفتاری و فراساختاری در مدل صرعی کیندلینگ، مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، از ۴۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۸۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. برای ایجاد تشنج در حیوانات، الکتروود تحریکی در مسیر پرفورنت و الکتروود ثابت در ژيروس دنداندار قرار گرفت. حیوانات به روش ایجاد کیندلینگ سریع تحریک شدند. در گروه‌های مختلفی از حیوانات، به دنبال تحریکات کیندلینگ، LFS با فرکانس‌های مختلف (۰/۵، ۱ و ۵ هرتز) اعمال شده و اثر آن در روند کیندلینگ (با مطالعه رفتاری و الکتروفیزیولوژیک) بررسی شد. پس از هفت روز تحریک، حیوانات کشته شده و از ناحیه ژيروس دنداندار برای بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی نمونه‌گیری به عمل آمد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های واریانس یک طرفه و دو طرفه، LSD، کروسکال والیس و من ویتنی یو و نرم افزار استاتستیکا نسخه ۲ استفاده شد.

یافته‌ها: اعمال فرکانس‌های مختلف LFS اثرات مهاری بر روند کیندلینگ داشت و مجموع مدت زمان تخلیه‌های متعاقب و همچنین متوسط تعداد تحریکات برای بروز مراحل تشنجی ۴ و ۵ را به صورت معناداری کاهش داد. به علاوه، اعمال فرکانس‌های مختلف LFS مانع از افزایش ضخامت غشای پس سیناپسی و ایجاد سیناپس‌های مقعر شکل می‌گردد اما تفاوتی بین اثر ضد تشنجی LFS در فرکانس‌های مختلف دیده نشد.

نتیجه‌گیری: اعمال LFS می‌تواند با جلوگیری از بروز تغییرات فراساختاری در طی پدیده کیندلینگ، از افزایش تحریک‌پذیری نورون‌ها جلوگیری کرده و باعث ایجاد اثرات ضد تشنجی شود. (مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۷/شماره ۲ / صص ۹۶-۱۰۷).

واژه‌های کلیدی: تشنج؛ تحریک با فرکانس پایین؛ ژيروس دنداندار؛ بررسی فراساختاری.

مقدمه

صرع (Epilepsy) بعد از سکتة مغزی شایع‌ترین اختلال نورولوژیک (با شیوع حدود ۱ درصد در افراد بالغ و ۲ درصد در کودکان) است که حداقل ۵۰ میلیون نفر در دنیا به آن مبتلا هستند (۱). شایع‌ترین نوع صرع در افراد بالغ، صرع لوب گیجگاهی (Temporal Lobe Epilepsy) است (۲). با توجه به شیوع نسبتاً بالای صرع و عدم وجود درمان دارویی قطعی برای آن، تحقیقات زیادی برای دستیابی به روش‌های درمانی دیگر در حال انجام است که از آن جمله می‌توان به الکتروتراپی اشاره کرد. برای بررسی نقش نواحی مختلف مغز در صرع و تشنج از مدل‌های آزمایشگاهی مختلفی از جمله کیندلینگ (Kindling) استفاده می‌شود. یکی از نواحی مهم سیستم لیمبیک که می‌توان با تحریک الکتریکی آن ناحیه، حیوانات را کیندل کرد هیپوکمپ می‌باشد (۳،۴). طی سال‌های اخیر تحریک الکتریکی نواحی خاصی از مغز به عنوان روش درمانی جدید برای بیماران صرعی مقاوم به دارو مورد استفاده قرار گرفته است (۵). تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین (Low-frequency stimulation; LFS) می‌تواند سبب اثرات مهاری و حفاظتی در مقابل روند گسترش فعالیت صرعی شوند (۶). بنابراین، این امکان وجود دارد که با شناخت هر چه بیشتر مکانیسم‌های دخیل در اثرات ضد تشنجی LFS، بتوان آن را به‌عنوان راه حلی برای درمان صرع معرفی نمود.

تاکنون گزارش‌های زیادی در خصوص اثرات درمانی الکتروتراپی در برخی بیماری‌های عصبی، از جمله صرع، منتشر شده است (۷،۸). اگرچه اثرات ضد تشنجی الکتروتراپی به‌طور عمده در فرکانس‌های بالا ایجاد شده است، ولی در فرکانس‌های پایین هم در برخی نواحی مغزی این اثرات مشاهده گردیده است. الکتروتراپی با فرکانس ۱ هرتز و به مدت ۱۵ دقیقه، روند کیندلینگ را به تعویق می‌اندازد (۶)؛ یعنی می‌تواند یک عامل

پیشگیری‌کننده از ایجاد تشنج باشد. الکتروتراپی در قشر مغز انسان نیز با فرکانس ۰/۹ هرتز، شدت‌های ۱ تا ۷ میلی آمپر و مدت پالس ۰/۳ میلی ثانیه به مدت ۱۵ دقیقه سبب کاهش اسپایک‌های بین حمله‌ای و تضعیف فعالیت تشنجی شده است (۷). با وجود تحقیقات زیادی که در این زمینه انجام شده است، رابطه بین کمیت‌های LFS و میزان اثربخشی آن به درستی مشخص نشده است.

علاوه بر این، مکانیسم دقیق اثر ضد تشنجی LFS هنوز به درستی شناخته نشده و تحقیقات زیادی باید برای شناخت این مکانیسم‌ها انجام شود تا تغییراتی که در حین اعمال LFS در مغز ایجاد می‌شود، مورد مطالعه قرار گیرد. از جمله مهم‌ترین تغییراتی که باید مورد بررسی قرار گیرد، می‌توان به تغییرات رفتاری، الکتروفیزیولوژیک و ویژگی‌های فراساختاری اشاره کرد. با توجه به این‌که LFS باعث ایجاد تضعیف طولانی مدت (Long-term depression; LTD) (۹) و تضعیف پس از تقویت (Depotentiation) (۵،۱۰) می‌شود، منطقی به نظر می‌رسد که LFS در تقویت سیناپسی ناشی از کیندلینگ نیز با مکانیسم‌های مشابهی تأثیر داشته باشد.

اما در مورد تأثیر فرکانس‌های مختلف LFS بر روند کیندلینگ پرفورنت و به ویژه در مورد تأثیر LFS بر تغییرات فراساختاری ناشی از تشنج گزارشی وجود ندارد. بنابراین، برای کسب اطلاعات بیشتر از نحوه اثربخشی LFS در درمان تشنج، باید بررسی نمود که آیا این الگوی تحریکی می‌تواند از تغییرات فراساختاری ایجاد شده در طی روند کیندلینگ جلوگیری نماید یا خیر؟ به علاوه، با توجه به این که فرکانس یکی از اصلی‌ترین کمیت‌های LFS می‌باشد و انتظار می‌رود که تغییر آن در شدت پاسخ‌های ضد تشنجی LFS اثر مهمی را به جای بگذارد، مطالعه این موضوع که تغییر در فرکانس LFS چه تأثیری بر اثربخشی آن خواهد داشت و آیا این تغییر می‌تواند روی اثرات احتمالی حفاظتی LFS بر فراساختار بافت مغز مؤثر باشد، می‌تواند در دستیابی به بهترین الگوی LFS در

درمان صرع و تشنج نقش مهمی داشته باشد.

الکتروود دوقطبی از به هم تاباندن طول مناسبی از دو رشته سیم الکتروود (با قطر ۱۲۷ میکرون) از جنس فولاد ضد زنگ (Stainless steel) با پوشش تفلونی تهیه می‌شد. عایق انتهای سیم‌ها به اندازه ۰/۲۵ تا ۰/۵ میلی‌متر برداشته شده و سپس به پین لحیم می‌گردیدند. برای ساخت الکتروودهای تک قطبی به یک انتهای آن‌ها پین سوکت مخابراتی و به انتهای دیگر پیچ لحیم می‌شد (این پیچ‌ها به استخوان جمجمه حیوان متصل می‌گردیدند). دو عدد از این الکتروودها به‌عنوان الکتروودهای Earth و Differential به‌کار می‌رفتند. یک الکتروود تک قطبی نیز بدون اتصال پیچ به انتهای آن برای ثبت از شکنج دندانانه-دار تهیه می‌شد. دو پیچ منفرد هم به عنوان لنگرگاه در اطراف الکتروودها در استخوان جمجمه پیچ می‌شدند.

پس از بستن پیچ‌های لنگرگاه، الکتروودهای تک قطبی، الکتروودهای تحریک و ثبات به‌ترتیب در محل‌های تعیین شده قرار می‌گرفتند. با استفاده از استیمولاتور، تحریک الکتریکی با شدت ۵۰ میکروآمپر تا ۱ میلی‌آمپر از طریق الکتروود تحریک به مسیر پرفورنت اعمال می‌شد. در صورت قرار داشتن الکتروودها در محل مناسب، به دنبال اعمال تحریک با یک تک پالس پتانسیل تحریکی پس سیناپسی تجمعی (fEPSP) ثبت می‌گردید. برای ثبت پتانسیل‌های میدانی مسیر پرفورنت تحریک می‌شد و از سلول‌های گرانولی شکنج دندانانه‌دار ثبت به‌عمل می‌آمد. تحریک مورد استفاده پالس مربعی با فرکانس ۰/۱ هرتز بود که مدت زمان هر پالس ۱۰۰ میکرو ثانیه طول می‌کشید. در غیر این صورت، موقعیت الکتروودهای تحریک و ثبات آن‌قدر تغییر داده می‌شد تا یک fEPSP با حداکثر دامنه (بین ۱۰-۳ میلی‌ولت) ثبت شود. همچنین با اعمال تحریکات زوج پالس با فاصله بین پالس ۷۰ میلی‌ثانیه و مشاهده پدیده تسهیل زوج پالس که مشخصه بارز ناحیه شکنج دندانانه‌دار می‌باشد، محل الکتروود از نظر الکتروفیزیولوژیک نیز مورد تأیید قرار می‌گرفت. سپس با استفاده از سیمان دندانپزشکی، الکتروودها و پیچ‌ها بر روی

مواد و روش‌ها

روش مطالعه و جامعه پژوهش: در این مطالعه تجربی، از ۴۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (Wistar) در محدوده وزنی ۲۸۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات به-صورت تصادفی از میان جمعیت موش‌های صحرایی موجود در انستیتو پاستور تهران انتخاب شدند. نمونه‌ها در پنج گروه قرار گرفتند:

۱- گروه کنترل: حیوانات این گروه پس از جراحی به مدت هفت روز بدون هیچ‌گونه تحریکی در بساط تحقیقاتی قرار گرفتند.

۲- گروه کیندل: حیوانات این گروه پس از جراحی به مدت هفت روز تحریکات کیندلینگ دریافت کردند.

۳- گروه کیندل+LFS 0.5: حیوانات این گروه پس از جراحی به مدت هفت روز تحریکات کیندلینگ و LFS با فرکانس ۰/۵ هرتز دریافت کردند.

۴- گروه کیندل+LFS 1: حیوانات این گروه پس از جراحی به مدت هفت روز تحریکات کیندلینگ و LFS با فرکانس ۱ هرتز دریافت کردند.

۵- گروه کیندل+LFS 5: حیوانات این گروه پس از جراحی به مدت هفت روز تحریکات کیندلینگ و LFS با فرکانس ۵ هرتز دریافت کردند.

جراحی حیوانات: هر حیوان توسط سدیم پنتوباریتال (۵۰ mg/kg، داخل صفاقی) بیهوش می‌گردید و در دستگاه استریوتاکس قرار می‌گرفت. بعد از ثابت کردن سر حیوان موقعیت مسیر پرفورنت در نیمکره راست برای قرار دادن الکتروودهای تحریکی (بر حسب میلی‌متر: ۶/۹-AP=L=۴/۱ نسبت به برگما و ۲/۷ تا V=۲/۴ نسبت به سطح استخوان جمجمه) و همچنین شکنج دندانانه‌دار برای قرار دادن الکتروود ثبات (بر حسب میلی‌متر: AP=-۲/۸، L=۱/۸ و ۵ نسبت به برگما ۳/ تا V=۳/۲ نسبت به سخت شامه) تعیین می‌گردید (۱۱).

جمع‌جمه حیوان ثابت می‌گردیدند. برای بهبودی زخم‌ها و دست‌آموز شدن، ۱۰ روز به حیوان استراحت داده می‌شد.

تحریک حیوانات برای ایجاد کیندلینگ و ثبت داده‌ها:

تحریک حیوانات در محدوده زمانی ۸ صبح الی ۱۲ ظهر صورت می‌گرفت. برای تحریک حیوان از روش کیندلینگ سریع (Rapid kindling) استفاده گردید. ابتدا آستانه ایجاد امواج تخلیه متعاقب (Afterdischarge threshold) برای هر حیوان تعیین شد. برای این کار ابتدا مسیر پرفورنت توسط جریانی به شدت ۳۰ میکروآمپر تحریک می‌گردید. در صورتی که امواج تخلیه متعاقب (حداقل به مدت ۱۰ ثانیه) ثبت می‌شدند، این شدت جریان به‌عنوان شدت جریان آستانه شناخته می‌شد. در غیر این صورت، با فواصل ۵ دقیقه‌ای شدت جریان هر بار ۱۰ میکروآمپر، به تدریج زیادتر می‌گردید تا آستانه تحریک به دست آید. در این روش حیوانات با موج مربعی تک فازی با مشخصات فرکانس ۵۰ هرتز، شدت آستانه تولید امواج تخلیه متعاقب، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و به مدت ۵ ثانیه تحریک می‌شدند. این تحریکات هر روز ۱۲ بار به فاصله هر ۵ دقیقه یک بار به حیوان اعمال گردیده و تا زمان نشان دادن مرحله ۵ تشنج، تحریک‌ها ادامه می‌یافتند (۱۲). برای ایجاد این موج تحریکی از دستگاه استیمولاتور (ساخت شرکت NIHON KOHDEN ژاپن) و ایزولاتور و واحد ثابت‌کننده جریان (مدل SS-202J ساخت شرکت NIHON KOHDEN ژاپن) استفاده گردید.

در گروه‌هایی که می‌بایست LFS اعمال شود، در فواصل ۵ دقیقه‌ای بین تحریکات کیندلینگ، ۲۰۰ پالس مربعی (۰/۱ میلی ثانیه) با فرکانس ۱ هرتز و شدت آستانه تولید امواج تخلیه متعاقب اعمال و اثر آن بر کمیت‌های تشنجی بررسی می‌گردید. تحریکات LFS به فاصله ۶۰ ثانیه بعد از پایان هر تحریک کیندلینگ، تا ۴۰ ثانیه قبل از تحریک بعدی به حیوان اعمال می‌شدند.

پس از اعمال تحریک کیندلینگ، امواج الکتریکی مغزی توسط الکتروود ثبت به آمپلی‌فایر منتقل و پس از

تقویت و فیلتر شدن به نرم‌افزار ویژه‌ای در کامپیوتر منتقل می‌شدند. توسط برنامه کامپیوتری، کمیت‌های تشنجی اندازه‌گیری می‌شدند. این کمیت‌ها عبارت بودند از:

- ۱- مدت زمان امواج تخلیه متعاقب تجمعی (Cumulative afterdischarge duration; cADD) که برای محاسبه آن، مدت زمان تخلیه‌های متعاقب (ADD) از اولین تحریک تا انتهای تحریکات روز هفتم با هم جمع می‌شد،
- ۲- مدت زمان امواج تخلیه متعاقب روزانه (afterdischarge duration; dADD) که عبارت است از مجموع مدت زمان تخلیه‌های متعاقب پس از ۱۲ تحریک کیندلینگ روزانه،
- ۳- بالاترین مرحله تشنج که در هر روز در حیوان بروز می‌کند.

آماده‌سازی نمونه‌ها برای مطالعه با TEM: حیوانات در تمامی گروه‌ها در روز هشتم برای نمونه‌برداری توسط محلول فیکساتیو کارنوفسکی پرفیوژ می‌شدند. نمونه‌های استخراج شده به مدت ۱ روز نیز در محلول گلوتارالدئید ۲/۵ درصد قرار گرفته و پس از برش‌گیری و جدا کردن ناحیه ژيروس دنداندار از هر دو طرف، نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی آماده می‌گردیدند.

حیوانات در تمامی گروه‌ها در روز هشتم توسط اتر به‌طور عمیق بیهوش شده و توسط سالی‌ن نرمال و سپس کارنوفسکی (محلول ۲/۵ درصد گلوتارالدئید و ۴ درصد پارافرمالدئید در بافر فسفات ۰/۱ مولار) پرفیوژ شدند. سپس، مغز موش‌ها از جمع‌جمه خارج گردید و به صورت اسلایس‌هایی با ضخامت ۱ میلی‌متر برش داده شد. برش‌هایی که در فاصله ۲ تا ۴ میلی‌متر از برگما قرار داشتند انتخاب شده و ناحیه ژيروس دنداندار آن‌ها جدا گردید. این نمونه‌ها یک شب در محلول ۲/۵ درصد گلوتارالدئید و سپس به مدت ۲ ساعت در تتروکسید اسمیوم ۱ درصد تثبیت شده، توسط استن آبگیری و در رزین اپوکسی قالب‌گیری شدند. سپس توسط دستگاه

کنترل) نشان داد که اختلاف معناداری در این کمیت‌ها در مدت هفت روز ایجاد نمی‌شود. به کار بردن LFS به تنهایی نیز اثر معناداری بر این کمیت‌ها نداشت (روز هفتم نسبت به روز اول شیب پتانسیل‌های میدانی 0.4 ± 0.2 درصد و دامنه اسپایک‌های تجمعی 0.4 ± 0.3 درصد افزایش نشان داد). آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که شدت پالس آزمون در گروه‌های آزمایشی مختلف تفاوت معناداری ندارند (جدول ۱). به عبارت دیگر، تحریک-پذیری سیناپسی در گروه‌های مختلف در شروع آزمایش‌ها یکسان بود. همچنین آستانه تحریک حیوانات گروه‌های مختلف نیز، تفاوت معناداری با یکدیگر نداشت. این بدان معناست که استعداد ابتلا به حملات تشنجی در تمامی گروه‌ها یکسان بوده است (جدول ۱).

اثر LFS بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت: به کار بردن LFS باعث کند شدن روند کیندلینگ شد. آزمون کروسکال والیس و آزمون متعاقب من ویتنی‌یو نشان داد که مرحله حمله تشنج در روزهای ششم و هفتم به طور معناداری در گروه‌های KLFS 0.5Hz و KLFS 1Hz، $P < 0.05$ و در گروه KLFS 5Hz $P < 0.01$ ، اما گروه‌های مختلف KLFS در مقایسه با یکدیگر تفاوت معناداری را در بروز مراحل رفتاری تشنج در طی هفت روز نشان ندادند. در عین حال، اعمال LFS در متوسط بروز مراحل ۱ تا ۳ تشنج تغییری ایجاد نکرد (نمودار ۱).

آزمون تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه و همچنین آزمون LSD نشان داد که تحریک الکتریکی مسیر

اولترامیکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۷۰ نانومتر تهیه شده و پس از رنگ‌آمیزی با استات یورانیل و سیترات سرب، توسط میکروسکوپ ترانس‌میشن (Zeiss EM900) نمونه‌ها مشاهده و از آن‌ها عکس برداری شد.

در بررسی با میکروسکوپ الکترونی، تأثیر اعمال فرکانس‌های مختلف LFS در جریان کیندلینگ بر تغییرات ایجاد شده در PSD، تغییرات تراکم وزیکول‌های سیناپسی و تغییرات مورفولوژی سیناپس‌ها (تعقر و تحدب غشاهای سیناپسی) در سلول‌های گرانولار ژيروس دنداندار مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش تجزیه و تحلیل آماری: تفاوت آماری در میزان امواج تخلیه متعاقب طی روند صرع‌زایی بین گروه‌های آزمایشی با استفاده از نرم افزار استاتستیکا نسخه ۲ و توسط آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (برای کمیت‌های اندازه-گیری شده در روز اول یا روز آخر آزمایش) و تحلیل واریانس دو طرفه از نوع Repeated Measures و آزمون LSD محاسبه گردید. وقوع مراحل پنج‌گانه تشنجی بین گروه‌های آزمایشی نیز با استفاده از آزمون غیرپارامتریک کروسکال والیس و آزمون متعاقب من ویتنی‌یو مقایسه گردید. داده‌ها به صورت (میانگین \pm انحراف معیار) ارائه شد و مقادیر $P < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنادار بودن در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

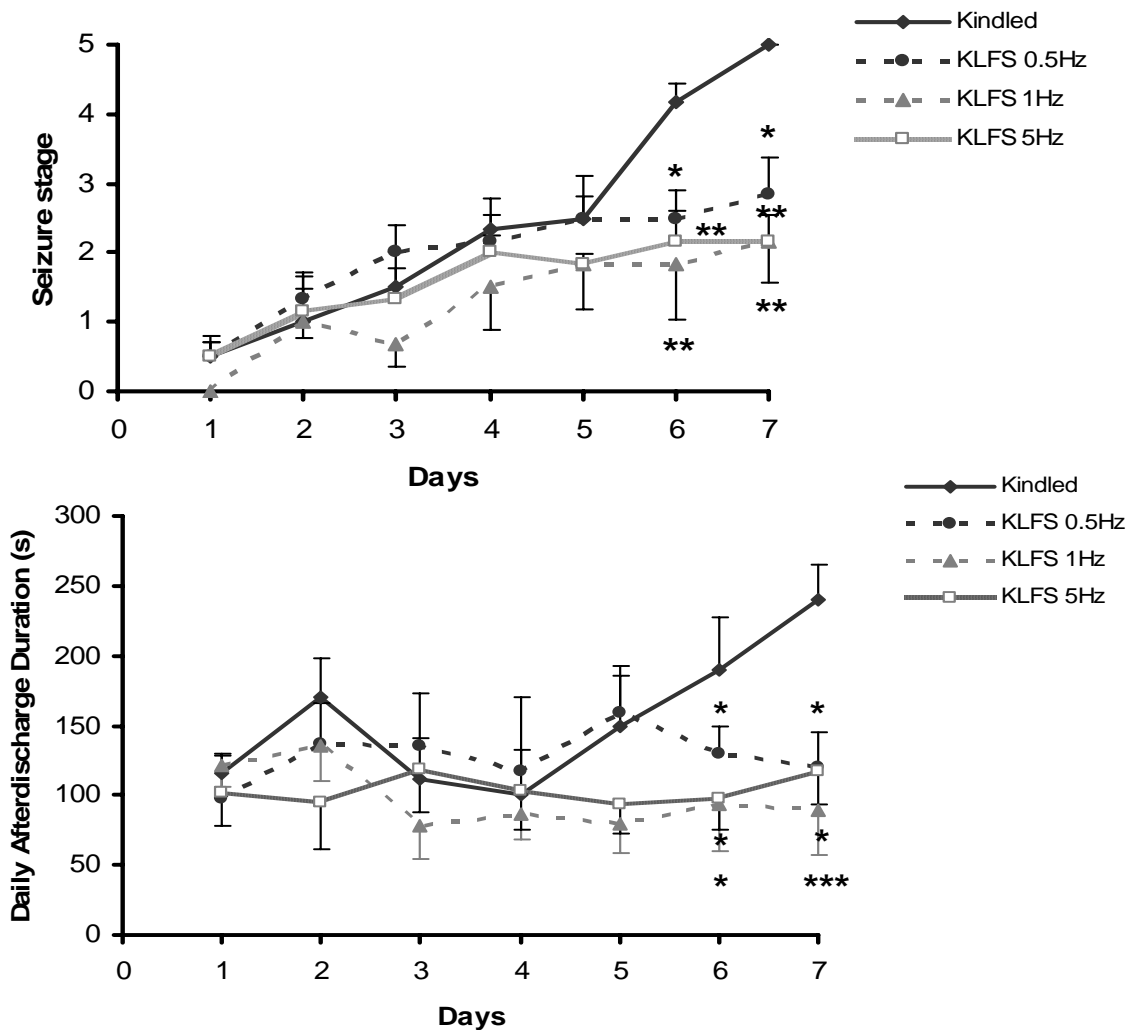
نتایج آزمایش‌های رفتاری و الکتروفیزیولوژیک:

اندازه‌گیری کمیت‌های سیناپسی طی هفت روز در گروهی که تحریک کیندلینگ و یا LFS دریافت نکردند (گروه

جدول ۱: مقادیر شدت آستانه تحریکات کیندلینگ، شدت پالس آزمون و مجموع کل تخلیه‌های متعاقب (cADD) در گروه‌های آزمایشی مختلف

گروه آزمایشی	آستانه تحریک کیندلینگ (μA)	پالس آزمون (μA)	cADD (s)
Kindled	$82/6 \pm 4/1$	30.8 ± 2.4	107.9 ± 25.9
KLFS 0.5Hz	$86/2 \pm 5/6$	31.5 ± 2.0	$89.6 \pm 43.5^{***}$
KLFS 1Hz	$83/8 \pm 4/4$	31.1 ± 2.9	$68.2 \pm 18.6^{***}$
KLFS 5Hz	$85/2 \pm 7/1$	31.8 ± 3.1	$72.8 \pm 28.3^{***}$

*** نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کیندل است

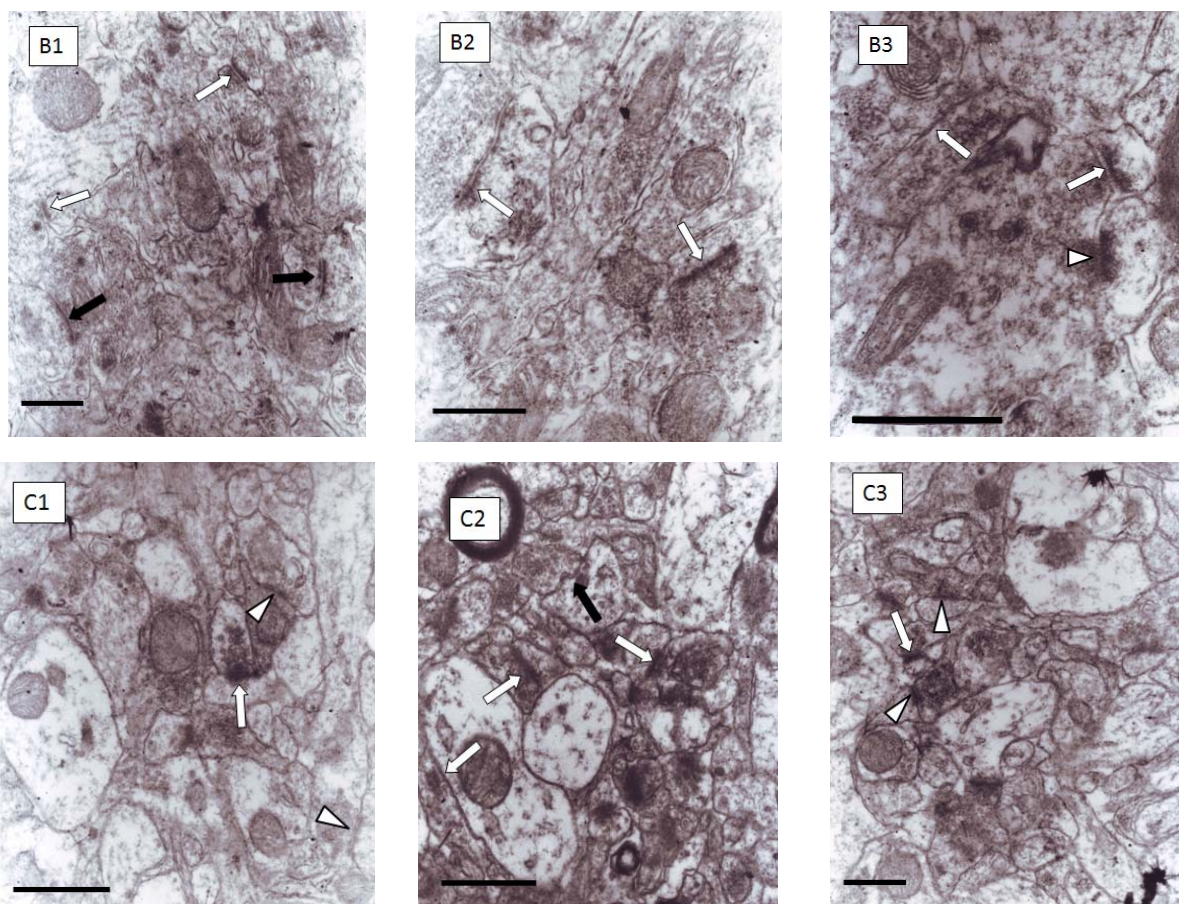


نمودار ۱: تأثیر LFS بر بروز مراحل رفتاری طی روند کیندلینگ مسیر پرفورنت. کاهش معناداری را در متوسط بروز مراحل ۵ و ۶ تشنج و میزان تخلیه‌های متعاقب روزانه در روزهای ششم و هفتم در گروه‌هایی که همراه تحریکات کیندلینگ LFS دریافت می‌کردند (KLFS) نسبت به گروهی که تنها تحریکات کیندلینگ را دریافت می‌کردند، مشاهده شد.

از گروه‌های KLFS مشاهده نشد (نمودار ۱). به علاوه، cADD (مجموع کل تخلیه‌های متعاقب از روز اول تا روز هفتم) در گروه‌های KLFS نسبت به گروه کیندل کاهش معناداری را نشان داد ($P < 0.001$) اما اختلاف معناداری در میزان cADD بین گروه‌های KLFS مشاهده نشد (جدول ۱).

اثر LFS بر تغییرات فراساختاری ژيروس دنداندار در طی روند کیندلینگ مسیر پرفورنت: به کار بردن LFS تا حدی باعث جلوگیری از تغییرات فراساختاری ناشی از

پرفورنت توسط LFS در فواصل بین تحریکات کیندلینگ در گروه‌های KLFS، کاهش معناداری را در مجموع تخلیه‌های متعاقب روزانه مربوط به روزهای ششم و هفتم (dADD) مجموع ADD های به دست آمده پس از ۱۲ تحریک) نسبت به گروه کیندل نشان می‌دهند (در روز ششم در هر سه گروه KLFS، $P < 0.05$ و در روز هفتم برای گروه‌های KLFS 0.5Hz و KLFS 5Hz، $P < 0.05$ و گروه KLFS 1Hz، $P < 0.001$). همچنین تفاوت معناداری در میزان dADD در روزهای ششم و هفتم، بین هیچ یک

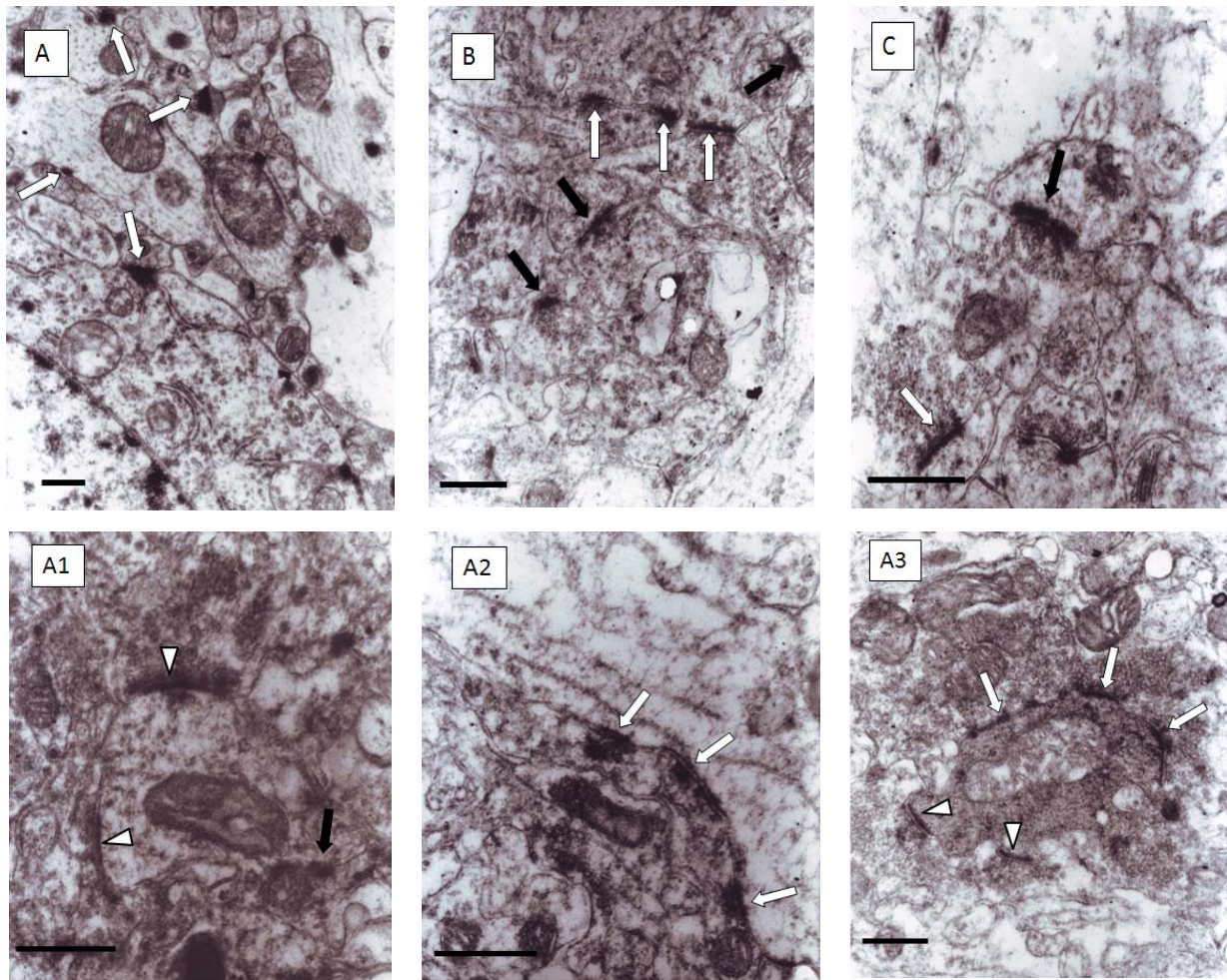


شکل ۲: نمایش ویژگی‌های فراساختاری در سیناپس‌های ناحیه ژيروس دندانسه‌دار در گروه‌های (A) KLFS 0.25Hz، (B) KLFS 1Hz و (B) KLFS 5Hz (C) اعمال LFS به دنبال تحریکات کیندلینگ از تغییرات مورفولوژیک سیناپس تا حد زیادی جلوگیری می‌کند به گونه‌ای که سیناپس‌های مقعر (فلش سیاه) بسیار کم و اکثر سیناپس‌ها مسطح (فلش سفید) و برخی محدب (مثلث سفید) می‌باشند در فراوانی وزیکول‌های سیناپسی تغییر چندانی مشاهده نشد. (بزرگنمایی: Bar=0.5 μ m)

PSD نشان داد که در این گروه‌ها PSD هم به صورت ضخیم (همانند گروه کیندل شده) (شکل ۳A3، ۳B3، ۳C1، ۳C2، ۳C3) و هم به صورت ظریف (شکل ۳A1، ۳A2، ۳B1، ۳B2، ۳C1، ۳C2، ۳C3) مشاهده می‌شود. در حالی که در گروه کیندل شده در اکثر موارد PDS از نوع ضخیم و متراکم بود. بررسی تعداد وزیکول‌های سیناپسی نشان داد که تفاوتی بین گروه‌هایی که LFS دریافت کرده‌اند و گروه کیندل شده وجود ندارد و در هر دو گروه تعداد وزیکول‌های سیناپسی بیشتر از گروه کنترل می‌باشد (شکل ۳A1، ۳A2، ۳B1، ۳B2، ۳C1، ۳C2، ۳C3). در بررسی تغییرات فراساختاری نیز همانند آزمایش‌های رفتاری، تفاوت مشخصی بین گروه‌های مختلفی که LFS دریافت کرده بودند، مشاهده نشد.

کیندلینگ گردید. ایجاد تشنج به روش کیندلینگ سبب افزایش ضخامت دانسیته پس سیناپسی (Post-synaptic density; PDS)، افزایش وسعت سیناپس‌ها، تغییر مورفولوژی سیناپس به فرم سیناپس‌های مقعر و افزایش تعداد وزیکول‌های سیناپسی در مقایسه با حیوانات گروه کنترل می‌گردد (شکل ۲).

اعمال LFS با فرکانس‌های مختلف تا حدی از این تغییرات جلوگیری می‌کند. در حیوانات این گروه‌ها، سیناپس‌ها اکثراً از نوع مسطح و یا محدب بوده و به ندرت می‌توان سیناپس‌هایی از نوع مقعر را مشاهده نمود (شکل ۳A1، ۳C1، ۳C2، ۳C3). اما در این میان، سیناپس‌های مسطح تعداد بیشتری نسبت به بقیه انواع سیناپس‌ها دارند (شکل ۳A1، ۳A2، ۳A3، ۳B2، ۳B3). بررسی ضخامت



شکل ۳: نمایش ویژگی‌های فراساختاری در سیناپس‌های ناحیه ژيروس دنداندار در گروه کنترل (A) و گروه کیندل (B و C). به دنبال ایجاد تشنج‌های کیندلینگ اکثر سیناپس‌ها وسیع، برخی مسطح (فلش سفید) و برخی مقعر (فلش سیاه) و با وزیکول‌های سیناپسی فراوان می‌باشند. بزرگنمایی: Bar=0.5 μm

طی روند ایجاد کیندلینگ می‌شود. اعمال LFS در هر سه فرکانس ۰/۵، ۱ و ۵ هرتز اثرات مشابهی داشت. مطالعات گذشته نیز نشان داده بود که به کار بردن LFS با فرکانس‌های ۱-۳ هرتز (۱۲-۱۵)، ۶-۴ هرتز (۱۶) و همچنین ۰/۱ تا ۱ هرتز (۱۷)، بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ، از تقویت طولانی مدت در انتقال سیناپسی ناشی از کیندلینگ جلوگیری کرده و سبب تأخیر یا حتی مهار روند صرع‌زایی می‌شود. علاوه بر این، اعمال LFS به‌طور مستقیم به کانون صرع در انسان اثرات ضد تشنجی دارد (۷، ۸). یافته‌های مطالعه حاضر نیز نشان داد که اعمال فرکانس‌های مختلف LFS در مسیر پرفورنت بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ موجب مهار

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که اعمال فرکانس‌های مختلف LFS اثرات مهاری بارزی بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت داشته، بروز مراحل رفتاری تشنج‌زا را به تعویق انداخته و از ایجاد برخی تغییرات فراساختاری در سیناپس‌های سلول‌های گرانولار ژيروس دندان‌های جلوگیری کرد. این اثرات ضد تشنجی LFS در هر سه فرکانس به کار رفته مشابه بود.

نتایج آزمایش‌های بخش نخست نشان داد که اعمال فرکانس‌های مختلف LFS در طی روند کیندلینگ باعث کاهش احتمال بروز مراحل مختلف رفتاری تشنج و جلوگیری از افزایش مدت زمان امواج تخلیه متعاقب در

نیز نشان داد که اعمال LFS به تنهایی اثر معناداری بر انتقال سیناپسی نداشت؛ بنابراین، احتمالاً اعمال LFS در این آزمایش‌ها از طریق تضعیف پس از تقویت اثرات ضدتشنجی ایجاد کرده است.

در تحقیق حاضر، اختلاف آماری معناداری در اثرات ضدتشنجی فرکانس‌های ۰/۵، ۱ و ۵ هرتز وجود نداشت. بنابراین، به نظر می‌رسد در مدل به کار رفته در این تحقیق برای ایجاد اثرات مهارى LFS بر روی تشنجات ناشی از کیندلینگ، تغییر در فرکانس LFS اعمال شده فاقد تأثیر قابل توجه است. به عبارت دیگر، صرفاً اعمال تحریکات الکتریکی در محدوده فرکانس‌هایی که به‌عنوان LFS شناخته می‌شوند، کافی است تا باعث اثرات ضدتشنجی آن گردد. هر چند با توجه به مطالعات قبلی در همین آزمایشگاه، تغییر در سایر کمیت‌های LFS نقش اساسی در اعمال اثرات مهارى آن دارد (۲۶). این نکته را نیز نباید از نظر دور داشت که عدم وابستگی اثرات LFS به فرکانس آن ممکن است ناشی از شرایط آزمایشگاه، نژاد حیوانات مورد استفاده و همین‌طور الگوهای تحریکی مورد استفاده ما باشد.

به‌طور کلی، گزارش شده است که در مدل‌های مختلف صرعی تغییرات قابل توجهی در سیناپس‌های مورد بررسی رخ می‌دهد. مثلاً، تغییرات قابل توجهی چون وسیع شدن غشای پس سیناپسی دیده می‌شود که سبب می‌گردد گیرنده‌های بیشتری در معرض میانجی‌های نورونی آزاد شده از پایانه آکسونی قرار بگیرند و کارایی سیناپس را افزایش دهند (۲۷). با توجه به این که به دنبال توسعه کیندلینگ آمیگدال، آسیب و تخریب نورونی در محل تشنج و یا نواحی نزدیک آن رخ نمی‌دهد و حملات راجعه خودبه‌خود حتی در غیاب این گونه آسیب‌ها دیده می‌شوند (۲۸)، می‌توان این احتمال را مطرح کرد که در مطالعه حاضر افزایش شدت تشنج در حیوانات می‌تواند به‌علت تغییرات مشاهده شده در خصوصیات فراساختاری نورون‌ها (و نه آسیب نورونی) باشد. البته باید این نکته را

چشمگیر کمیت‌های تشنجی می‌شود، به‌طوری که مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه و مدت زمان تخلیه‌های متعاقب تجمعی در گروه‌هایی که به همراه تحریکات کیندلینگ، LFS دریافت می‌کردند؛ نسبت به گروهی که فقط تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند؛ کاهش معناداری نشان داد. در عین حال، اعمال LFS کاهش معناداری در متوسط بروز مراحل ۴ و ۵ تشنج ایجاد می‌کند. مراحل پنج‌گانه تشنجات کیندلینگ را می‌توان به دو دوره تقسیم کرد: دوره کانونی شدن تشنجات که شامل مراحل ۱ و ۲ می‌شود و دوره عمومی شدن تشنجات که شامل مرحله ۳ تا ۵ است (۱۸). با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر شاید بتوان گفت که نقش اصلی LFS مهار مرحله گذر از تشنجات کانونی به تشنجات عمومی است.

مطالعات قبلی نیز نشان داده است که اعمال LFS باعث مهار تقویت طولانی مدت (Long-term potentiation; LTP) ایجاد شده در هر دو محیط *in vivo* و *in vitro* می‌شود و پدیده تضعیف پس از تقویت را به وجود می‌آورد. بنابراین، با توجه به اثرات مهارى LFS بر LTP و احتمال وقوع LTP در حین کیندلینگ (۱۹،۲۰)، ممکن است LFS با کاهش پاسخ‌دهی سیناپسی در مدارهای صرعی از طریق مکانیسم‌هایی مثل تضعیف پس از تقویت، سبب مهار روند گسترش فعالیت‌های تشنجی شود. از طرف دیگر، ممکن است مکانیسم اثر مهارى LFS بر تشنج، مشابه حالتی باشد که LTD ایجاد می‌کند (۲۱،۲۲). با در نظر گرفتن این حقیقت که القای تضعیف پس از تقویت در حیوانات بالغ آسان‌تر از القای LTD است، پیشنهاد می‌شود که اعمال LFS بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ مشابه با تضعیف پس از تقویت باشد (۲۲). علاوه بر این، القای LTD در ژيروس دندانیه دار چندان موفقیت‌آمیز نبوده است (۲۳،۲۴) و نوع تحریکات LFS در آزمایش‌های مطالعه حاضر مشابه تحریکاتی بوده است که LTD قادر نبود در ژيروس دندانیه دار ایجاد کند (۲۵). همچنین آزمایش‌های تکمیلی

نیز در نظر داشت که در برخی تحقیقات تخریب نورونی هم مشاهده شده است (۲۹-۳۱).

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که تحریکات اعمال شده به حیوانات در حین ایجاد کیندلینگ باعث تغییراتی در فراساختار ناحیه هیپوکمپ نیز می‌گردد که همگی در جهت افزایش تحریک پذیری بافت عصبی است؛ از جمله افزایش ضخامت PSD، افزایش وسعت سیناپس‌ها، تغییر مورفولوژی سیناپس به فرم سیناپس‌های مقعر و افزایش تعداد وزیکول‌های سیناپسی. این تغییرات باعث افزایش تحریک پذیری در ژيروس دنداندار شده و در نتیجه با افزایش تعداد تحریکات الکتریکی وارد شده به حیوانات، به تدریج شدت تشنج افزایش یافت. این افزایش شدت با زیاد شدن تدریجی مراحل حمله تشنجی و زیاد شدن مدت زمان امواج تخلیه متعاقب قابل مشاهده است.

به‌کار بردن LFS تا حدی باعث جلوگیری از تغییرات فراساختاری ناشی از کیندلینگ گردید. در حیواناتی که بعد از تحریکات کیندلینگ LFS به آن‌ها اعمال شد، سیناپس‌ها اکثراً از نوع مسطح و یا محدب بود و به‌ندرت سیناپس‌های مقعر در آن‌ها مشاهده شد. با توجه به این که سیناپس‌های محدب از نوع مهاری و سیناپس‌های مقعر از نوع تحریکی می‌باشند (۳۲)، نتایج حاصل نشان‌دهنده اثر مهاری LFS در جلوگیری از تشکیل سیناپس‌های تحریکی و حتی القای تشکیل سیناپس‌های مهاری می‌باشد.

در عین حال، اعمال LFS پس از تحریکات کیندلینگ نمی‌تواند از همه تغییرات ایجاد شده در طول کیندل شدن حیوانات و ایجاد حالت تشنجی جلوگیری کند. بررسی ضخامت PSD نشان داد که در گروه‌های دریافت کننده LFS در بسیاری از سیناپس‌ها تغییری در

PSD مشاهده نشده و PSD به‌صورت ضخیم (همانند گروه کیندل شده) مشاهده می‌شود. اما در بعضی نمونه‌ها، PSD به‌صورت ظریف دیده می‌شود؛ در حالی که در گروه کیندل شده در اکثر موارد PDS از نوع ضخیم و متراکم بود. علاوه بر این، بررسی تراکم یا میزان وزیکول‌های سیناپسی نشان داد که تفاوتی بین گروه‌های دریافت کننده LFS و گروه کیندل شده وجود ندارد و در هر دو گروه، تراکم یا میزان وزیکول‌های سیناپسی بیشتر از گروه کنترل می‌باشد. در بررسی تغییرات فراساختاری نیز همانند آزمایش‌های رفتاری تفاوت مشخصی بین گروه‌های مختلفی که LFS دریافت کرده بودند، مشاهده نشد.

به‌طور کلی، اعمال LFS به‌دنبال تحریکات کیندلینگ روند ایجاد تشنج در حیوانات آزمایشگاهی را کند می‌نماید به‌طوری که شدت تشنج و مراحل رفتاری بروز تشنج نسبت به حیواناتی که LFS دریافت نکرده‌اند، کمتر می‌شود و برای مشاهده هر یک از مراحل رفتاری تشنج باید تعداد تحریکات کیندل‌کننده بیشتری را به حیوان اعمال نمود. علاوه بر این، اعمال LFS از تغییرات فراساختاری که به‌دنبال ایجاد تشنج‌های ناشی از کیندلینگ در ناحیه ژيروس دنداندار رخ می‌دهد (از قبیل افزایش ضخامت PSD، افزایش وسعت سیناپس‌ها، تغییر مورفولوژی سیناپس به فرم سیناپس‌های مقعر) جلوگیری می‌نماید. این یافته‌ها نشان می‌دهد که اثر ضد تشنجی LFS تا حدی به دلیل جلوگیری از پلاستیسیته در سطح فراساختاری بافت تحریک شده می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی-مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که حمایت مالی این پروژه را به‌عهده گرفتند، تشکر به‌عمل می‌آید.

References

1. Kasperaviciūte D, Sisodiya SM. Epilepsy pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*. 2009;10:817-36.

2. Sloviter RS. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *C R Biol.* 2005; 328: 143-53.
3. Bertram EH. Temporal lobe epilepsy: where do the seizures really begin? *Epilepsy Behav.* 2009;14 Suppl 1:32-7.
4. McIntyre DC, Poulter MO, Gilby K. Kindling: some old and some new. *Epilepsy Res.* 2002; 50: 79-92.
5. Huang CC, Liang YC, Hsu KS. A role for extracellular adenosine in time-dependent reversal of long-term potentiation by low-frequency stimulation at hippocampal CA1 synapses. *J Neurosci.* 1999; 19: 9728-38.
6. 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: 2171-76.
7. 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: 787-91.
8. 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: 491-95.
9. Manahan-Vaughan D. Long-term depression in freely moving rats is dependent upon strain variation, induction protocol and behavioral state. *Cereb Cortex.* 2000; 10: 482-7.
10. Straube T, Frey JU. Time-dependent depotentiation in the dentate gyrus of freely moving rats by repeated brief 7 Hz stimulation. *Neurosci Lett.* 2003; 339: 82-4.
11. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press; 1986.
12. 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 Res.* 2007; 75: 154-61.
13. Kulla A, Reymann KG, Manahan-Vaughan D. Time-dependent induction of depotentiation in the dentate gyrus of freely moving rats: involvement of group 2 metabotropic glutamate receptors. *Eur J Neurosci.* 1999; 11: 3864-72.
14. Gaito J. The effect of variable duration one hertz interference on kindling. *Can J Neurol Sci.* 1980; 7: 59-64.
15. Gaito J, Nobrega JN, Gaito ST. Interference effect of 3 Hz brain stimulation on kindling behavior induced by 60 Hz stimulation. *Epilepsia.* 1980; 21:73-84.
16. D'Arcangelo G, Panuccio G, Tancredi V, Avoli M. Repetitive low-frequency stimulation reduces epileptiform synchronization in limbic neuronal networks. *Neurobiol Dis.* 2005; 19: 119-28.
17. Jobst B. Brain stimulation for surgical epilepsy. *Epilepsy Res.* 2010; 89:154-61.
18. Lopez-Meraz ML, Neri-Bazan L, Rocha L. Low frequency stimulation modifies receptor binding in rat brain. *Epilepsy Res.* 2004; 59: 95-105.
19. Wasterlain CG, Mazarati AM, Shirasaka Y, Thompson KW, Penix L, Liu H, et al. Seizure-induced hippocampal damage and chronic epilepsy: a hebbian theory of epileptogenesis. *Adv Neurol.* 1999; 79: 829-43.
20. 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.
21. Lüscher C, Huber KM. Group 1 mGluR-dependent synaptic long-term depression: mechanisms and implications for circuitry and disease. *Neuron.* 2010; 65:445-59.
22. Velisek L, Veliskova J, Stanton PK. Low-frequency stimulation of the kindling focus delays basolateral amygdala kindling in immature rats. *Neurosci Lett.* 2002; 326: 61-3.
23. Heynen AJ, Abraham WC, Bear MF. Bidirectional modification of CA1 synapses in the adult hippocampus in vivo. *Nature.* 1996; 38: 163-6.
24. Bramham CR, Srebro B. Induction of long-term depression and potentiation by low- and high-frequency stimulation in the dentate area of the anesthetized rat: magnitude, time course and EEG. *Brain Res.* 1987; 405:100-7.
25. Abraham WC, Mason-Parker SE, Logan B. Low-frequency stimulation does not readily cause long-term depression or depotentiation in the dentate gyrus of awake rats. *Brain Res.* 1996; 722: 217-21.

26. Ghorbani P, Mohammad-Zadeh M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y. Effect of different patterns of low-frequency stimulation on piriform cortex kindled seizures. *Neurosci Lett* 2007;425:162-6.
27. Lu CH. A light and electron-microscopic study of epileptogenic discharge focus in temporal lobe epilepsy. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 199; 20: 198-200.
28. Brandt C, Ebert U, Loscher W. Epilepsy induced by extended amygdala-kindling in rats: lack of clear association between development of spontaneous seizures and neuronal damage. *Epilepsy Res*. 2004; 62: 135-56.
29. Cavazos JE, Das I, Sutula TP. Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *J Neurosci*. 1994; 14:3106-21.
30. Sloviter RS, Dean E, Sollas AL, Goodman JH. Apoptosis and necrosis induced in different hippocampal neuron populations by repetitive perforant path stimulation in the rat. *J Comp Neurol*. 1996; 11:516-33.
31. Bengzon J, Kokaia Z, Elmér E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;16:10432-7.
32. Kandel ER, Siegelbaum SA, Synaptic integration, In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (Eds), *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill; 2000; pp.207-28.