مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۳، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۷
صفحات: ۹۴-۸۳

اهمیت گیرنده‌های نوع ۲ گالانین طی اثرات مهاری تحریک با فرکانس پایین بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت در موش صحرایی

مهدی صادق M.Sc، سید جواد میر نجفی زاده Ph.D*، محمد جوان Ph.D*،
یعقوب فتح اللهی Ph.D*، علی جهانشاهی M.Sc*

چکیده

هدف: در این تحقیق اهمیت گیرنده‌های نوع ۲ گالانین طی اثرات مهاری LFS بر بروز تشنجهای ناشی از کیندلینگ الکتریکی مسیر پرفورنت مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها: حیوانات با تحریک مسیر پرفورنت و با استفاده از پروتکل کیندلینگ سریع (۶ تحریک روزانه) تحریک می‌شدند. LFS (۶۰۰ پالس ۰/۱ میلی ثانیه با فرکانس ۱ و شدت ۵۰-۱۵۰ میکروآمپر) بلافاصله پس از قطع تحریکات کیندلینگ اعمال می‌گردید. M871 (۱ میکرومولار در موضع) آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های نوع ۲ گالانین، هر روز قبل از شروع پروتکل تحریک به داخل ژیروس دندانه دار تزریق می‌شد و مراحل رفتاری تشنج و مدت زمان تخلیه متعاقب ثبت می‌گردید. همچنین تغییرات بیان ژن گیرنده ۲ گالانین در ناحیه ژیروس دندانه دار با استفاده از تکنیک Semi-quantitative RT-PCR در گروههای مختلف از حیوانات مورد بررسی قرار می‌گرفت.

یافته‌ها: تزریق M871 به داخل ژیروس دندانه دار اثرات مهاری LFS بر روند کیندلینگ را به طور معنی داری کاهش داد. نتایج semi-quantitative RT-PCR نشان داد که میزان mRNA گیرنده نوع ۲ گالانین در ژیروس دندانه دار بعد از اکتساب کیندلینگ به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد در حالیکه اعمال LFS جلوی این کاهش را می‌گیرد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که فعال شدن گیرنده‌های گالانین بوسیله گالانین درونزاد نقش مهمی به عنوان واسطه بخشی از اثرات مهاری LFS بر تشنجات ناشی از کیندلینگ مسیر پرفورنت دارد. این نقش طی تشنجات کانونی عمدتا از طریق GalR1 و طی تشنجات عمومی از طریق GalR2 اعمال می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تحریک الکتریکی با فرکانس پایین، Semi-Quantitative RT-PCR، تشنج، گالانین، ژیروس دندانه‌دار

دریافت مقاله: ۸۷/۴/۱ پذیرش مقاله: ۸۷/۶/۵

نویسنده مسئول، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان msadegh1360@yahoo.com
* گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بـا وجود همه پیشـرفتهای صورت گرفته در زمینـه درمان و کنترل بیماری صرع هنوز حـدود ۳۰٪ تا ۴۰٪ بیماران صرعی به داروهای ضد صرع موجود مقاوم هسـتند. تحقیقات زیادی برای یافتن روش درمانی موثری برای این گروه از بیماران در حال انجام است (۱). طی سـالهای اخیر اعمال تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین (Low-frequency Stimulation ؛ ۳-۱ Hz)، نظیـر آنچـه باعـث ایجاد تضعیـف طولانی مدت (LTD) و تقویت زدایی (Depotentiation) در محیط in vitro می‌شـود) در نواحی خاص از مغز به عنوان روش درمانی جدید برای این گروه از بیماران مورد اسـتفاده آزمایشگاهی و کلینیکی قرار گرفته است (۴-۲).

هر چند مکانیسـم‌هایی که LFS از طریق آنها اثرات ضد تشـنجی خود را اعمال می‌کند هنوز روشـن نشده اسـت، اما شواهدی وجود دارد که بیان می‌کند LFS از طریق افزایش رهایش ترانسـمیترهای مهـاری و نورومودولاتورها (مثـل GABA، آدنوزین، دوپامین و...) اثرات مهاری خود را اعمال می‌کند (۷-۵)

گالانین نوروپپتدی متشـکل از ۲۹ اسـید آمینه (در انسان ۳۰ اسید آمینه) است که دارای توزیع گسترده ای در سیستم عصبی مرکزی و محیطی می‌باشد (۹و۸). این نوروپپتید به صورت کوترانسمیتر همراه با نوروترانسمیترهای اصلی (مثل گلوتامات و GABA) در پایانه‌های سیناپسـی رها می‌شـود و نقش مهمی در تنظیم بسـیاری از اعمال فیزیولوژیـک و پاتولوژیک از جمله صرع ایفا می‌کند (۱۰). مطالعات نشـان داده اسـت که گالانین یک نوروپپتید بسیار القاء پذیر است و به دنبال آسـیبهای عصبی و بیماریهای نورودژنراتیو مزمن بیان آن سریعا افزایش می‌یابد (۱۲و۱۱).

هیپوکامپ، به عنوان یک سـاختار مهم در ایجاد و گسـترش صرع لوب گیجگاهی، دارای ورودیهای گالانینرژیک فراوانی اسـت که از سپتوم میانی و لوکوس سرولئوس منشأ می‌گیرند (۱۶-۱۳). فراوانی این نوروپپتید مهاری و گیرنده‌هایش در هیپوکامپ بیانگر این اسـت کـه گالانین در تعدیـل فعالیت و تحریک پذیری ایـن ناحیه نقش مهمـی ایفا می‌کند. حاصـل این اثرات مهاری بـه صورت تضعیف حافظـه، یادگیری و LTP و همچنیـن کاهش حملات صرعی بروز می‌کنـد (۱۸و ۱۷و۱۰). گالانین اثراتش را از طریق حداقل سـه نوع گیرنده G- پروتیینـی ایفا می‌کند که عبارتند از:GalR2،GalR1 و GalR3 (۱۹). GalR1 و GalR3 از طریـق مهار آدنیلیل سـیکلاز و باز کردن کانالهای پتاسـیمی سـبب بروز اثرات مهاری می‌شود در حالیکه GalR2 از طریق افزایش کلسیم داخل سلولی و فعال کردن PLC عمـل می‌کند (۲۰). گزارشـهای زیادی مبنی بر نقش مهاری گالانین در صرع وجود دارد (۲۴-۲۱)

در مطالعه قبلی ما نقش گیرنده‌های گالانین، با اسـتفاده از M35 به عنوان آنتاگونیسـت غیر اختصاصی این گیرنده‌ها، به عنوان واسـطه اثرات مهاری LFS بر روند صرع زایی مشـخص شـده بود (۲۵). در این مطالعه میزان اهمیت گیرنده نوع ۲، با اسـتفاده از آنتاگونیسـت اختصاصـی گیرنده‌های نـوع ۲ گالانیـن (M871)، را بر این اثرات مهاری در مدل کیندلینگ مسیر پرفورنت مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

جراحی وکیندل کردن حیوانات

در ایـن تحقیق از موش صحرایی نر نژاد Wistar با وزن ۳۰۰-۲۷۰ گرم (خریداری شـده از انیستیتو پاسـتور کرج) استفاده شد. بیهوشی توسط تزریق داخل صفاقی سـدیم پنتوباربیتال (۶۰ mg/kg) انجام می‌شـد. پس از بیهوش کردن، حیوان درون دسـتگاه استریوتاکسی قـرار می‌گرفت و با اسـتفاده از اطلـس Paxinos و Watson (۲۶) موقعیت مسـیر پرفورنت (برحسـب میلـی متـر: ۶/۹ عقبتر و ۴/۱ به سـمت راست نسـبت به برگما و ۳/۳ به سـمت پایین نسبت به سـطح اسـتخوان جمجمه) و ژیروس دندانه دار (برحسب میلی متر: ۳/۸ عقبتر و۲/۰ به سـمت راسـت نسـبت به برگما و ۳/۲ به سمت پایین نسـبت به سطح استخوان جمجمه) در سطح جمجمه علامت گذاری می‌شـد. سپس با استفاده از مته دندانپزشکی، جمجمه در آن نقطه سـوراخ شـده، یک الکترود دو قطبی در مسیر پرفورنت و یک الکتـرود تک قطبی به همراه یک کانـول (G23) در ژیروس دندانه دار قرار داده می‌شـد. دو الکترود تـک قطبی نیز به عنوان Earth و Differential توسـط پیچ بر روی جمجمـه قرار می‌گرفت. پس از بسـتن پیچ‌های لنگرگاه، حیوان برای ثبت به قفسـه فارادی انتقال

Archive of SID

www.SID.ir

می‌یافت. با استفاده از استیمولاتور، تحریک الکتریکی با شدت ۴۰۰ تا ۸۰۰ میکروآمپر از طریق الکترود تحریک به مسیر پرفورنت اعمال می‌گردید. در صورت قرار داشتن الکترودهای ثبت و تحریک در محل مناسب، پتانسیل تحریکی پس سیناپسی تجمعی (pEPSP) توسط نرم افزار ثبت می‌گردید. در غیر این صورت الکترودهای تحریک و ثبت آنقدر تغییر داد می‌شد تا pEPSP با حداکثر دامنه ثبت شود. سپس با سیمان دندانپزشکی الکترودها و پیچ روی جمجمه حیوان ثابت می‌شدند. پس از پایان کارگذاری الکترودها و کانولها، پین‌های متصل به الکترودها وارد مادگی سوکت مخابراتی می‌شد و سوکت بوسیله سیمان دندانپزشکی روی سطح جمجمه متصل می‌گردید. در پایان جراحی یک سر سوزن G30 به طول مناسب بریده می‌شد و در داخل کانول قرار می‌گرفت تا از انسداد آن جلوگیری کند.

حداقل ده روز پس از جراحی، از شدت آستانه برای تحریک حیوانات استفاده می‌شد. برای به دست آوردن شدت آستانه، ابتدا حیوان توسط جریانی به شدت ۳۰ میکروآمپر تحریک می‌گردید. در صورتیکه امواج تخلیه متعاقب (حداقل به مدت۱۰ ثانیه) ثبت می‌شدند، این شدت جریان به عنوان شدت جریان آستانه شناخته می‌شد (۲۷) در غیر این صورت، با فواصل ۵ دقیقه‌ای شدت جریان هر بار ۱۰ میکروآمپر بیشتر می‌شد تا آستانه تحریک بدست آید. سپس حیوانات با شدت جریان آستانه تحریک می‌شدند تا مراحل مختلف تشنج را نشان دهند. این مراحل عبارت بودند از (۲۸): مرحله ۱، حرکات دهان و صورت؛ مرحله ۲، حرکت سر به بالا و پایین؛ مرحله ۳، کلونوس اندام جلویی طرف مقابل نسبت به محل تحریک؛ مرحله ۴، کلونوس اندام‌های جلویی دو طرف و ایستادن روی هر دو پا و مرحله ۵، ایستادن روی هر دو پا و افتادن حیوان.

برای تحریک حیوان از روش کیندلینگ سریع (Rapid kindling) استفاده می‌شد (۲۹). در این روش حیوانات با امواج الکتریکی با فرکانس بالا و امواج مربعی تک فازی با فرکانس ۵۰ هرتز، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و به مدت ۵ ثانیه و با شدت آستانه، تحریک می‌شدند. هر حیوان در هر روز ۶ بار (با فواصل ۱۰ دقیقه) توسط این امواج تحریک می‌شد. در گروهی از حیوانات که تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین (LFS) دریافت می‌کردند بلا فاصله بعد از اتمام تحریکات کیندلینگ LFS به مدت ۵۹۵ ثانیه در تمام فواصل بین تحریکات کیندلینگ به حیوان اعمال می‌شد و اثر آن بر کمیت‌های تشنجی بررسی می‌گردید. مشخصات LFS به صورت امواج مربعی تک فازی با فرکانس ۱ هرتز، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و به مدت ۲۰۰ ثانیه با شدت آستانه بود. در گروههایی که LFS دریافت نمی‌کردند در تمام فواصل بین تحریکات سوکت روی سر حیوان قرار داشت.

کمیت‌های تشنجی اندازه گیری شده عبارت بودند از: ۱- مدت زمان تخلیه‌های متعاقب (Cumulative ADD): مجموع زمانهای تخلیه‌های متعاقب از شروع تحریکات تا کیندل شدن حیوان؛ ۲- مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه (Daily ADD) و۳- تعداد روزهای لازم برای رسیدن به هر یک از مراحل پنجگانه تشنجی

اندازه گیری میزان بیان GalR1 و GalR2 در ناحیه ژیروس دندانه دار هیپوکامپ.

۱- استخراج ژیروس دندانه دار: ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از آخرین تحریک، حیوانات برای استخراج ژیروس دندانه دار مورد استفاده قرار می‌گرفتند. بدین ترتیب که پس از بیهوشی خفیف با گاز دی اکسید کربن سر حیوان قطع می‌شد و پس از باز کردن پوست سر حیوان از ناحیه پشت، استخوان جمجمه شکسته و مغز حیوان استخراج می‌گردید سپس توسط برش ساژیتال نیمکره راست جدا می‌شود و بعد از تشخیص ناحیه هیپوکامپ، ناحیه ژیروس دندانه دار از آن جدا می‌شد و به یک میکروتیوپ استریل انتقال می‌یافت. نمونه‌ها پس از استخراج سریعا به نیتروژن مایع (۱۷۰°C-) انتقال داده می‌شدند و تا زمان استخراج RNA در این دما نگهداری می‌شدند.

۲- استخراج RNA: کل RNA موجود در بافت ژیروس دندانه‌دار با کمک محلول استخراج +RNX (شرکت سیناژن) و بر اساس پروتکل کلروفرم- الکل استخراج می‌گردید. تمامی روند استخراج RNA بجز مواردی که نیاز به انکوبه کردن در دمای آزمایشگاه بود روی یخ انجام می‌گرفت. عمل سانتریفوژ همواره در دمای ۴°C+ انجام می‌شد. پس از حل کردن رسوب پایانی حاصل از استخراج RNA، ۲ میکرولیتر آن برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده، روی ژل آگارز ۱٪ مورد استفاده قرار می‌گرفت همچنین ۱ میکرولیتر

Archive of SID
www.SID.ir

آن برای بررسی کمی استخراج، به کمک اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار می‌گرفت، بقیه RNA استخراج شده بعد از افزودن ۱ میکرولیتر RNasinhibitor در دمای ۷۰°C- نگهداری می‌گردید.

۳- سنتز cDNA: در این مرحله از روی تمام mRNAهای موجود در نمونه استخراج شده، cDNA سنتز می‌شد. سنتز DNA، با کمک آنزیم نسخه برداری معکوس و پرایمر Oligo-dt انجام می‌شد. برای مهار آنزیم مداخله گر RNase، به واکنش RNasin (مهارگر RNase) اضافه می‌شد.

۴- واکنش PCR: به منظور تکثیر قطعه ای از cDNA مربوط به ژنهای GalR2، GalR1 و b-اکتین از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) استفاده می‌شد. فرآیند PCR با کمک آنزیم پلیمراز Taq و پرایمرهای اختصاصی پیشرو و معکوس برای هر ژن انجام می‌گرفت. برای هر قطعه مورد نظر، یک واکنش PCR جداگانه در حجم ۵۰ µl استفاده می‌گردید. برای هر نمونه، واکنشهای PCR با کمک Master mix تهیه می‌شد و در هر واکنش پرایمرهای مربوط به یکی از ژنهای b-اکتین، GalR1 یا GalR2 استفاده می‌گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای هر ژن در جدول ۳-۱ آورده شده است.

۵- بهینه سازی شرایط واکنش PCR: برای بهینه سازی شرایط واکنش PCR، از تعداد سیکل مناسب استفاده می‌شد تا سیگنال مربوط به تراکم باند محصول PCR اولا قابل رؤیت بوده و ثانیا وارد فاز اشباع منحنی تکثیر محصول PCR نگردد. میزان غلظتهای مناسب cDNA، dNTP، Mg++ و پرایمرهای R و F جهت انجام بهینه واکنش PCR هر کدام توسط آزمایشهای جداگانه تنظیم می‌شد.

۶- الکتروفورز نمونه‌ها: ۱۰ میکرو لیتر از محصول هر واکنش پس از مخلوط شدن با ۲ میکرولیتر بافر مخصوص (Loading buffer) به چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد اضافه می‌شدند. در دو طرف نمونه‌ها، دو نمونه از DNA Ladder با فواصل تفکیک ۱۰۰ bp اضافه می‌شدند. الکتروفورز به مدت ۵۰ دقیقه با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت و در دمای آزمایشگاه انجام می‌شد. ژل مورد استفاده در هنگام ساخت به اتیدیوم بروماید آغشته می‌گردید. پس از پایان الکتروفورز، ژل در دستگاه Gel documentation قرار می‌گرفت و تحت نور UV با زمان acquisition برابر ۰/۲ ثانیه از آن تصویر برداری می‌شد و تصویر بدست آمده ذخیره و دانسیته باندهای مورد نظر روی آن توسط نرم افزار Lab works اندازه گیری می‌گردید. برای هر نمونه تراکم باند مربوط به GalR2 نسبت به تراکم باند مربوط به β-Actin محاسبه می‌شد.

تزریق دارو

در این تحقیق از M871 (هدیه شده از طرف Dr. Ulla Sollenberg آزمایشگاه Professor U. langel، گروه نوروشیمی دانشگاه استکهلم) به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های گالانین نوع ۲ (GalR2) استفاده شد. M871 با دوز ۱ میکرو مولار بکار برده شد (۳۰). از محلول نرمال سالین بعنوان حلال هر دو دارو استفاده گردید و pH محلول با استفاده از pH متر و HCl یک نرمال، بین ۷/۳ تا ۷/۴ تنظیم می‌شد. همچنین از محلول نرمال سالین که pH آن تنظیم شده بود، به عنوان محلول شاهد استفاده می‌شد.

برای تزریق دارو به داخل ژیروس دندانه دار، از لوله پلی اتیلنی PE-20 (شرکت Stoelting، امریکا (که یک سر آن به سرسوزن ۳۰ G و سر دیگر آن به سرنگ‌هامیلتون ۱۰ میکرو لیتر متصل بود، استفاده گردید. قبل از تزریق دارو، لوله و سرسوزن با نرمال سالین استریل شستشو داده می‌شدند. سپس سرنگ‌هامیلتون در محل مخصوص روی پمپ تزریقPump (Microsyring شرکت Stoelting، امریکا) قرار می‌گرفت و دارو با سرعت ۰/۵ µl /۵ min به حیوان تزریق می‌شد، سپس حیوان برای اجرای پروتکل تحریک به قفس فارادی انتقال می‌یافت.

گروههای آزمایشی

در آزمایش اول برای بررسی تاثیر LFS بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت سه گروه آزمایشی مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه اول حیوانات فقط تحریکات با فرکانس ۱ Hz دریافت می‌کردند. در گروه دوم حیوانات فقط تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند و در گروه سوم حیوانات در فواصل بین تحریکات کیندلینگ، تحریکات با فرکانس۱ Hz دریافت می‌کردند.

در آزمایش دوم برای بررسی اثرات LFS بر میزان بیان ژن گیرنده‌های

Archive of SID

www.SID.ir

نوع ۱ و ۲ گالانین گروههای ۱ تا ۳ آزمایش اول بصورت مجدد تکرار می‌شـد. حیوانات ۲۰ تا ۲۴ ساعت پس از دریافت آخرین تحریک با گاز CO_2 بیهـوش، مغز آنها با دقـت خارج و ژیروس دندانه‌دار برای بررسی بیان ژن گیرنده‌های نوع ۱ و ۲ گالانین استخراج شد. بعلاوه یـک گـروه حیوان که جراحی شـده اند و الکتـرود و کانول گذاری شـده اند (بدون دریافت تحریک الکتریکی) بعنوان گروه شـاهد به ایـن آزمایش اضافه شـد. از آنجا که تعداد روزهـای تحریکی لازم برای کیندل شـدن (رسـیدن به مرحله ۵ تشنج) در گروه Kindled (آزمایش اول) برابر با ۱±۹ بـود بنابراین نمونه‌های بافتی مورد نیاز برای این آزمایش پس از روز نهم تحریک تهیه می‌شدند.

در آزمایش سوم برای بررسی نقش گیرنده نوع ۲ گالانین طی اثرات مهاری LFS برروند کیندلینگ مسـیر پرفورنت، چهارگروه آزمایشی مـورد بررسـی قرار گرفتند. در گـروه اول به حیوانات هـر روز ابتدا نرمال سـالین تزریق می‌شد و سپس در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می‌گرفتند. در گروه دوم به حیوانات هر روز ابتدا نرمال سـالین تزریق می‌شـد و سـپس این حیوانات تحریکات کیندلینگ به همراه LFS دریافت می‌کردند. در حیوانات گروه سـوم هر روز ابتدا M871 (با دوز ۱ mM) به داخل ژیروس دندانه دار تزریق می‌شـد و سـپس آنهـا در معرض تحریـکات کیندلینگ قرار می‌گرفتنـد. به حیوانات گـروه چهارم هر روز ابتدا M871 (با دوز ۱ mM) تزریق می‌شـد و سـپس تحریکات کیندلینگ به همراه LFS دریافت می‌کردند. تعداد حیوانات در هر گروه حداقل ۶ بود.

تأیید بافت شناسی

پـس از پایان هـر آزمایش جهت اطمینان از قرار داشـتن الکترود و کانـول در جـایگاه صحیح، بـه محـل الکتـرود ثبت و کانول رنگ Blue Methylene (۰/۵ µl/min) تزریق و محل الکترود تحریک نیـز بـا جریان الکتریکی مسـتقیم با شـدت ۱ mA و مدت ۵ ثانیه تخریب می‌گردید. سـپس مغز حیوانات خـارج و در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده می‌شـد. آنگاه از محل الکترود و کانول برش‌گیری به عمل می‌آمد تا محل الکترود و کانول مشخص شود. علاوه بر این با انجام رنگ‌آمیزی نیسـل، میزان تخریب نورونی در محل ثبت مورد بررسـی قرار می‌گرفت. در همه آزمایشها، فقط موشهایی که جایگاه الکترود و کانول درست بود، مورد ارزیابی نهایی قرار می‌گرفتند.

روش تجزیه و تحلیل آماری

تفاوت آمـاری در میزان امواج تخلیه متعاقـب طی روند صرع زایی بین گروههای آزمایشـی توسـط آزمون تجزیه وتحلیل واریانس از نوع Repeated Measures و آزمون LSD محاسـبه گردید. برای مقایسـه وقوع مراحل ۵ گانه تشنجی بین گروههای آزمایشی نیز از آزمون غیرپارامتریک Kruskal-Wallis اسـتفاده شد. برای بررسی تغییرات سـطح mRNA مربوط به GalR2 بین گروههای آزمایشی میانگین نسـبت تراکم باندهای GalR2 به β-Actin برای هر گروه محاسـبه شـد و توسـط آزمون تجزیه وتحلیل واریانس یکطرفه و آزمون LSD مقایسـه صورت می‌گرفت. داده‌ها به صورت (میانگین ± خطای معیار میانگین) ارائه شده اند و P< ۰/۰۵ به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

نتایج

آزمونهـای بافت شناسـی نشـان داد که محل الکتـرود و کانول در ژیروس دندانه دار می‌باشد. همچنین با استفاده از رنگ آمیزی نیسل مشـاهده شـد که اعمال تحریکات کیندلینگ و LFS سبب تخریب ساختاری در محل تحریک و یا تزریق نمی شود.

میانگین ADD پس از اولین تحریک در گروه اول (که فقط تحریکات کیندلینـگ دریافت می‌کردنـد) ۱۵/۳۳±۰/۸۴ ثانیه و در گروه دوم (کـه حیوانـات در فواصل بیـن تحریکات کیندلینـگ، تحریکات با فرکانـس پایین نیز دریافت می‌کردنـد) ۱۶/۳۳±۰/۴۹ ثانیه بود که از نظر آماری تفاوت معنی داری نداشتند (P< ۰/۱). بعلاوه، میانگین شدت تحریکات آستانه برای شروع تخلیه‌های متعاقب در گروههای مختلف نیز تفاوت معناداری را با هم نشان نداد (P< ۰/۱) و این بدان معناسـت که در حیوانات دو گروه تفاوت معنی داری در استعداد ابتلا به تشنج وجود نداشت.

تاثیر LFS بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت

آزمون تجزیه و تحلیل واریانس و آزمون LSD نشان داد که تحریک

Archive of SID
www.SID.ir

الکتریکی مسیر پرفورنت توسط LFS در فواصل بین تحریکات کیندلینگ کاهش معنی داری در مجموع تخلیه‌های متعاقب روزانه نسبت به گروه اول نشان می‌دهد (P< ۰/۰۰۱) (شکل ۱– الف؛ برای محاسبه مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه ADDهای بدست آمده پس از ۶ تحریک روزانه با هم جمع می‌شد). بعلاوه، مجموع کل تخلیه‌های متعاقب از روز اول تا روز نهم در گروه دریافت کننده LFS نسبت به گروه اول کاهش معنی داری را نشان داد و از ۱۶۹۸/۶۰±۴۶/۶۰ ثانیه به ۱۳۶۷/۴۰±۵۲/۰۰ ثانیه رسید (P<۰/۰۰۱).

استفاده از آزمونMann-Withney کاهش معنی داری را در بروز مراحل رفتاری ۴ و ۵ تشنجی در گروه LFS نسبت به گروه اول نشان داد. بعلاوه تعداد روزهای تحریکی لازم برای رسیدن به این مراحل را افزایش داد (P< ۰/۰۰۱) (شکل ۱– ب)؛ در حالیکه در تعداد روزهای تحریکی لازم برای رسیدن به مراحل ۱ تا ۳ تغییر معناداری ایجاد نکرد.

نتایج تزریق M871 به داخل ژیروس دندانه دار

تزریق M871 با دوز ۱ میکرومولار تغییرات معنی داری در کمیتهای تشنجی گروه "Kindled+M871" (که هر روز به دنبال تزریق دارو در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می‌گرفتند) نسبت به گروه "سالین+Kindled" (که ابتدا سالین دریافت می‌کردند و سپس در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می‌گرفتند) ایجاد نکرد. اما تزریق آن در گروهی که تحریکات کیندلینگ و LFS دریافت می‌کردند "Kindled+LFS+M871" از کاهش کمیتهای تشنجی توسط LFS جلوگیری کرد. در گروه "Kindled+LFS+M871" تزریق دوز ۱ میکرومولار M871 افزایش معنی داری در مجموع تخلیه‌های متعاقب روزانه نسبت به گروه "سالین+Kindled+LFS" ایجاد کرد (P< ۰/۰۰۱) (شکل ۱–الف). همچنین مجموع تخلیه‌های متعاقب (cADD) از روز اول تا روز پانزدهم در این دو گروه تغییرات معناداری را نشان داد (P< ۰/۰۰۱). با این وجود cADD در این دو گروه از روز اول تا روز نهم تفاوت معناداری را نشان نداد. به عبارتی از روز دهم به بعد M871 توانست جلوی اثرات مهاری LFS بر پیشرفت کیندلینگ را بگیرد و تفاوت معنادار مربوط به روزهای دهم تا پانزدهم بود (P< ۰/۰۱).

تزریق M871 در گروه "Kindled+LFS+M871" اثرات کاهشی LFS بر تعداد روزهای لازم برای رسیدن به مراحل ۳ تا ۵ رفتاری تشنج را نسبت به گروه "سالین+Kindled+LFS" به طور معنی داری کاهش داد (P< ۰/۰۰۱) (شکل ۱–ب).

نتایج بررسی اثرات LFS بر میزان بیان ژن گیرنده‌های نوع ۱ و ۲ گالانین

کیفیت RNA استخراج شده با قرار دادن نمونه ۲ میکرولیتری از محصول استخراج بر روی ژل آگاروز ۱٪ تایید می‌شد. تشکیل دو باند RNA ریبوزومیS۱۸ و S۲۸ در روی ژل نشان دهنده عدم ایجاد شکستگی و آسیب در ساختار RNA می‌باشد. بعلاوه در آزمایش غلظت سنجی RNA، نسبت به دست آمده برای طول موجهای A/۲۸۰ A ۲۶۰ در محدوده ۱/۸ تا ۲ بود که نشان دهنده درجه خلوص قابل قبول RNA بود.

بهینه سازی تعداد واکنش PCR: بررسی نمونه‌های حاصل از واکنش PCR در سیکلهای ۲۸، ۳۰، ۳۲، ۳۴ و ۳۶ روی ژل آگاروز ۱٪ نشان داد که سیکل ۳۴ مناسب ترین سیکل جهت بررسی تغییرات میزان mRNA گیرنده‌های نوع ۲ گالانین است بطوریکه باندها به خوبی قابل رویت بودند. بعلاوه واکنش به مرحله اشباع وارد نمی شد. همچنین استفاده از مقادیر ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میکرولیتر cDNA ورودی در واکنش PCR نشان داد که مقدار ۳ میکرولیتر cDNA ورودی برای بررسی تغییرات سطح mRNA مناسب می‌باشد.

تغیرات بیان ژن گیرنده نوع ۲ گالانین: اندازه گیری میزان mRNA گیرنده نوع ۲ گالانین در ژیروس دندانه دار سمت راست، با استفاده از تکنیک Semi-quantitative RT-PCR کاهش معناداری را در میزان mRNA گیرنده نوع ۲ گالانین در ژیروس دندانه دار حیوانات گروه Kindled (که تنها تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند) نسبت به گروه کنترل (حیواناتی که فقط جراحی شده و الکترود و کانول در مسیر پرفورنت و ژیروس دندانه دار قرار می‌گرفت اما هیچگونه تحریکی دریافت نمی کردند) نشان داد (P< ۰/۰۵). بعلاوه نتایج نشان داد که اعمال تحریکات LFS بدنبال تحریکات کیندلینگ (گروه "Kindled+LFS") از کاهش میزان mRNA

Archive of SID

www.SID.ir

گیرنـده نوع ۲ گالانین جلوگیری می‌کند و سـطح mRNA در این گـروه تغییرات معناداری با گروه کنترل نشـان نـداد. بعلاوه اعمال تحریکات LFS به تنهایی و بدون اعمال تحریکات کیندلینگ (گروه LFS) تغییر معنـاداری را در میزان mRNA گیرنده نوع ۲ گالانین ایجاد نکرد (شکل ۲).

نتایج این تحقیق نشـان داد که گیرنده نـوع ۱ گالانین، در ژیروس دندانه دار، درسـطح قابل ردیابی با تکنیک مورد اسـتفاده بیان نمی شود.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق اهمیت گیرنده نوع ۲ گالانین را طی اثرات مهاری LFS بر بروز تشنجهای ناشی از کیندلینگ الکتریکی مسیر پرفورنت نشان داد. بررسی توسط Semi-quantitative RT-PCR نشان داد که کیندلینگ سبب کاهش بیان گیرنده‌های نوع ۲ گالانین می‌شود در حالیکه LFS این کاهش بیان را مهار می‌کند.

مطالعات گذشـته نشـان داده بود که به کار بردن LFS (با فرکانس ۱ Hz و بـه مدت ۱۵ دقیقه) بلافاصلـه بعد از تحریکات کیندلینگ، سـبب تاخیر و حتی مهار روند صرع زایی می‌شود. بعلاوه این اثرات با افزایش آستانه تشنجی همراه بود (۳۴-۳۱و۴و۳). بنابراین احتمالا LFS بـه نحوی تحریک پذیری نورونهـا را کاهش می‌دهد. با این وجود مکانیسم اثرات LFS هنوز نامشخص است. یافته‌های ما اثرات مهاری LFS برروند کیندلینگ مسـیرپرفورنت را نشان داده است و برای اولین بار این احتمـال را مطرح می‌کند که گالانین را می‌توان بعنوان یکی از واسـطه‌های اثرات مهـاری LFS در نظر گرفت زیرا مهـار غیراختصاصی گیرنده‌های گالانین در ژیروس دندانه دار اثرات مهـاری LFS بـر روند کیندلینگ را به صـورت معنی داری کاهش می‌دهد.

در این تحقیق LFS با مدت پالس ۱ میلی ثانیه و شدتی برابر شدت آسـتانه تحریکات کیندلینگ اثرات مهاری بر روند کیندلینگ داشت. این تاثیر مهاری نمی تواند ناشـی از تخریب نورونی بوسـیله LFS باشـد زیرا مطالعات بافت شناسی تخریب نورونی مشخصی را نشان نداد. حجم داروی تزریق شـده در ناحیـه ژیروس دندانه دار نیز ۰/۵ میکرولیتر بود که با سرعت ۰/۱ میکرولیتر در دقیقه تزریق می‌شد و نمی توانست تخریب نورونی ایجاد کند.

مشخص شده اسـت که LFS می‌تواند سبب تغییر غلظت بعضی از نورومودولاتورهـا و نوروترانسـمیترها در مغز شـود. به عنوان مثال، اعمال LFS در برش‌های زنده هیپوکامپ باعث آزاد شـدن آدنوزین می‌گردد (۵) همچنین گزارش شـده اسـت که اِعمال طولانی مدت LFS تغییراتی را در میزان رسپتور بایندینگ گیرنده‌های بنزودیازپینی و اپیوئیدی μ ایجاد می‌کند (۶). احتمال دارد که LFS ازطریق ایجاد تغییراتی مشابه آنچه که ذکر شد، در نهایت سبب تقویت سیستم‌های مهاری شـود. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که مهار گیرنده‌های گالانین (که یک نوروپپتید مهاری در مغز اسـت (۳۵) باعث کاهش اثرات مهاری LFS می‌شـود. بنابراین، می‌توان این احتمال را مطرح نمود که فعالیت گیرنده‌های گالانین مسئول حداقل بخشی از اثرات ضد تشنجی LFS می‌باشد.

مطالعات گذشته توزیع گسترده گیرنده‌های گالانین را در هیپوکامپ و ژیروس دندانه‌دار و اثرات ضد تشـنجی این گیرنده‌ها را نشان داده اسـت (۱۵و۱۲) همچنین بررسـی‌های مختلف در محیط in vitro و in vivo نشـان می‌دهـد کـه گالانین به عنوان یک ضد تشـنج درونزاد قوی از انتهای فیبرهـای نورآدنرژیک ورودی به هیپوکامپ آزاد می‌شود و از طریق تضعیف تقویت سیناپسی و یا کاهش رهایش نورترانسـمیترهای تحریکی نظیر گلوتامات باعث اثرات ضد تشنجی می‌شـود (۳۷-۳۵و۱۷و۱۰). بررسـی‌های مختلف نشان می‌دهد که گالانیـن یـک مهار کننده موثـر LTP در هر دو محیـط in vitro و in vivo اسـت (۳۶و۳۵و۱۰). مطالعـه روی برشـهای هیپوکامپ موشـهایی که ژن گالانین آنها حذف شده بود نشان داد که رهایش گلوتامات از پایانه‌های سیناپسـی آنها ۶ تـا ۹ برابر افزایش می‌یابد. بعلاوه، پایانه‌های سیناپسـی در برشـهای هیپوکامپ موشهایی که دچار افزایش بیان ژن گالانین شـده بودند قادر به رهایش گلوتامات نبودند (۴۰-۳۸و۲۴) که تایید می‌کند گالانین از طریق مهار رهایش گلوتامات مانع از تقویت سینایسی می‌شود. بنابراین گالانین می‌تواند به عنوان یک ماده ضد تشـنجی درونزاد در بعضی شرایط وارد عمل شـود. نتایج حاصل از مطالعه قبلی ما نشـان داد کـه اگر طی روند کیندلینـگ قبل از اعمال LFS هر روز به حیوانات M35 (به عنوان آنتاگونیست غیر اختصاصی گیرنده‌های گالانین) (۴۰) تزریق شود و

Archive of SID
www.SID.ir

در نتیجه جلوی فعالیت گیرنده‌های گالانین گرفته شود، اثرات ضد تشنجی LFS کاهش می‌یابد.

گالانین در سیستم عصبی مرکزی حداقل از طریق سه گیرنده متصل به پروتئین‌های GalR2، GalR1- G و GalR3- عمل می‌کند. مشخص شده است که از بین این سه گیرنده تنها نوع ۱ و ۲ در هیپوکامپ بیان می‌شوند. همچنین نشان داده شده است که توزیع گیرنده نوع ۱ در سلولهای هرمی هیپوکامپ فراوان است در حالیکه گیرنده نوع ۲ در ژیروس دندانه دار فراوانی بیشتری دارد.

در این تحقیق برای تعیین نقش گیرنده نوع ۲ در اثرات مهاری LFS از M871، پپتیدی تازه ساخته شده ای که حدود ۳۰ بار تمایل بیشتری برای اتصال به گیرنده نوع ۲ دارد (۳۰) بعنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده نوع ۲، استفاده شد. همانطور که در شکل ۴-۶ نشان داده شده M871 طی ده روز ابتدای روند کیندلینگ تاثیر معنی داری بر مهار اثرات LFS ندارد در حالیکه از روز ۱۰ به بعد به صورت معنی داری سبب مهار اثرات LFS می‌شود. با توجه به اینکه در این تحقیق گروههای دریافت کننده LFS به همراه تحریکات کیندلینگ تقریبا در روز دهم به مرحله ۳ می‌رسیدند. شاید بتوان گفت که طی دوره کانونی شدن تشنج (مراحل ۱ تا ۳) گیرنده نوع ۲ تاثیر چندانی در بروز اثرات مهاری LFS ندارند اما در دوره عمومی شدن تشنج (مراحل ۴ و ۵) نقش عمده گالانین در مهار اثرات ضد تشنجی LFS به واسطه فعالیت گیرنده‌های نوع ۲ می‌باشد زیرا در این دوره (روز دهم تا پانزدهم در آزمایش ما) اثرات M35 و M871 یکسان بود و تفاوتی بین آنها مشاهده نشد. در همین راستا نشان داده شده است که نقش ضد تشنجی گیرنده‌های گالانین نوع ۲ در مراحل عمومی شدن تشنج بیشتر از مراحل کانونی آن است.

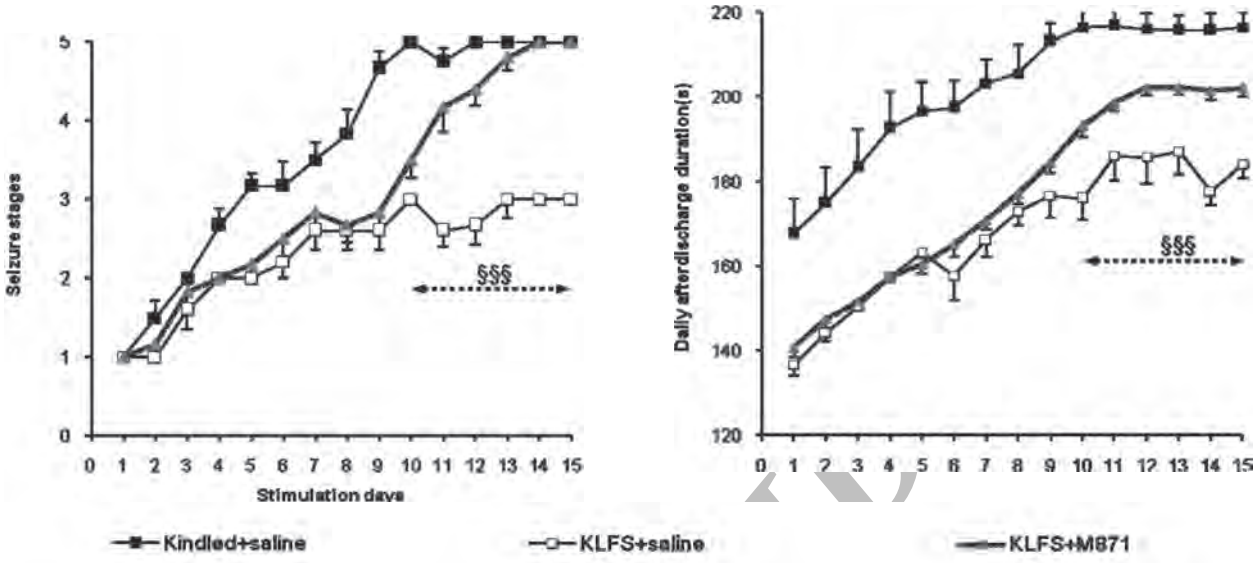
داده‌های حاصل از Semi-quantitative RT-PCR نیز نقش گیرنده‌های نوع ۲ را در اثرات ضد تشنجی LFS تائید می‌کند. این مطالعه نشان داد که به دنبال کیندلینگ مسیر پرفورنت میزان mRNA گیرنده نوع ۲ در ژیروس دندانه دار به صورت معناداری کاهش پیدا می‌کند. این مشاهده با گزارشهای قبلی در مورد کاهش بیان ژن گیرنده نوع ۲ به دنبال تشنجات ایجاد شده توسط پیلوکارپین مطابقت دارد. بعلاوه نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اعمال LFS به دنبال تحریکات کیندلینگ جلوی کاهش بیان گیرنده نوع ۲ را می‌گیرد. این داده‌ها ممکن است نشان دهنده اهمیت وجود این گیرنده‌ها در ایجاد اثرات ضد تشنجی LFS باشد. در واقع حداقل بخشی از اثرات ضد تشنجی LFS از طریق فعال کردن گیرنده‌های گالانین و شاید افزایش رهایش گالانین درونزاد صورت می‌گیرد. از سوی دیگر داده‌های ما نشان داد که مهار گیرنده‌های گالانین اثرات معنی داری در گروههایی که تنها تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند نداشت. این نتایج با نتایج قبلی در تشنجات ایجاد شده با پیلوکارپین مطابقت نداشت که ممکن است به علت تفاوت در مدلهای ایجاد کیندلینگ باشد و همچنین تفاوت در نژاد حیوانات مورد استفاده باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که گیرنده نوع ۱ گالانین، در ژیروس دندانه دار، درسطح قابل ردیابی با تکنیک مورد استفاده بیان نمی شود. گزارشهایی قبلی نیز بیان می‌کنند که گیرنده نوع ۲ در ژیروس دندانه دار توزیع بیشتری دارند در حالیکه گیرنده‌های نوع ۱ عمدتا در سلولهای هرمی ناحیه CA1 و CA3 متراکم شده اند و میزان بیان آن در ژیروس دندانه دار بسیار کم است (۴۱). در هر حال با استفاده از تکنیک Real Time-PCR گیرنده نوع ۱ گالانین در ژیروس دندانه‌دار ردیابی و گزارش شده است که بیان آن طی کیندلینگ دچار تغییرات معناداری نمی شود (۳۹و۲۲و۲۱). تفاوت تکنیک مورد استفاده برای ردیابی میزان بیان گیرنده و همچنین تفاوت در نژاد موشهای صحرایی مورد استفاده ممکن است علت تفاوت مشاهدات باشد.

بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت که گیرنده‌های گالانین بویژه گیرنده‌های نوع ۲ گالانین می‌توانند به عنوان واسطه بخشی از اثرات مهاری LFS بر تشنجات ناشی از کیندلینگ مسیر پرفورنت عمل کنند. اما بجز گالانین عوامل دیگری هم می‌توانند در اعمال اثرات مهاری LFS نقش داشته باشند که برای شناسایی این عوامل و مکانیسمهای اثر ضد تشنجی LFS به مطالعات بیشتری نیاز است.

Archive of SID
www.SID.ir

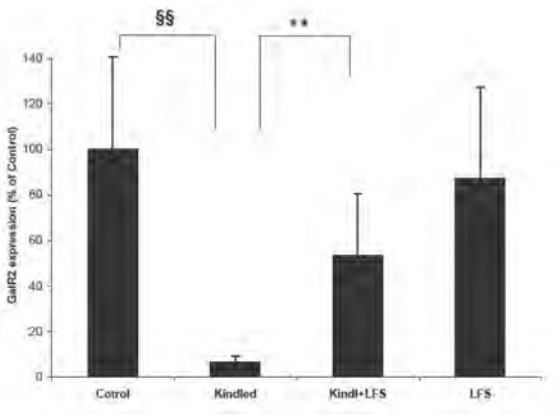
شکل ۱. تاثیر تزریق M871 به ژیروس دندانه دار بر مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه و مراحل رفتاری تشنج



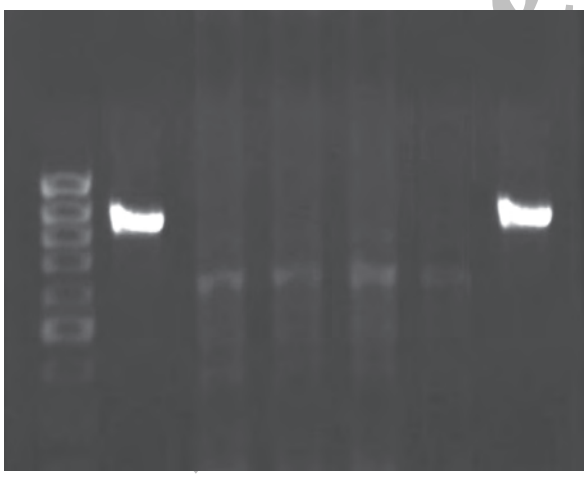
الف) تزریـق M871 در گروهی کـه همراه تحریکات کیندلینـگ LFS دریافت می‌کردند "Kindled+LFS+M871" اثرات کاهشی LFS بر مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه را از روز دهم یه بعد نسبت به گروهی که ابتدا نرمال سالین و سپس تحریکات کیندلینگ همراه LFS دریافت می‌کردند "سالین+Kindled+LFS" به طور معنی داری کاهش داد (P< ۰/۰۰۱).

ب) تزریـق M871 در گروه"Kindled+LFS+M871" اثرات کاهشـی LFS بر تعداد روزهای لازم برای رسـیدن به مراحل مختلف رفتاری تشـنج را نسـبت به گروه "سـالین+Kindled+LFS" به طور معنـی‌داری کاهش داد. همان گونه که در شـکل دیده می‌شـود این کاهش تنها از روز دهم به بعد معنادار اسـت. در هر دو نمودار اعداد نشـان دهنده میانگین ± خطای معیار میانگین می‌باشند (n = ۶). *** نشـان دهنده P< ۰/۰۰۱ در مقایسـه با گروه "سالین+Kindled+LFS" از روز اول تا روز پانزدهم می‌باشد.

شکل ۲. تاثیر تحریکات الکتریکی کیندلینگ و LFS بر بیان ژن گیرنده‌های نوع ۲ گالانین در ژیروس دندانه دار.



الف) بیان ژن GalR2 به صورت درصد نسـبت به دانسـیته باند B-اکتین نشان داده شده. همانگونه که در شکل مشاهده می‌شود اعمال تحریکات کیندلینگ تا بروز مرحله ۵ رفتاری تشنج در گروهی که تنها تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند (Kindled) سـبب کاهش معنـی داری در میزان mRNA گیرنده نوع ۲ گالانین نسـبت به گروه کنترل می‌شـود. (§§ p< 0.01) در حالیکه در گروهی که همراه تحریکات کیندلینگ LFS دریافت می‌کردند "Kindled+LFS" این کاهش میزان mRNA نسبت به گروه کنترل معنی دار نیست اما این گروه نسبت به گروه Kindled تفاوت معناداری را نشان می‌دهـد. بعلاوه اعمال تحریکات LFS به تنهایی و بدون اعمال تحریکات کیندلینگ (گروه LFS) سـبب تغییر معناداری در میزان mRNA گیرنده نوع ۲ گالانین نسبت به گروه کنترل نشـد (p< 0.1 **). دانسیته باند مربوط به گیرنده نوع ۲ گالانین برای هر نمونه نسبت به دانسیته باند B-اکتین نرمالایز شده است. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین نشان داده شده است (n =۶).



ب) یـک نمونـه ژل الکتروفورز، نمونه‌ها از چپ به راسـت عبارتنـد از: Ladder، Kindled، LFS، Control، Kindled+LFS، β-actin.

www.SID.ir

References

1. Hauser WA, Hesdorffer DH. Epilepsy frequency, causes and consequences. New York, Demos Press; 1990.

2. 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.

3. Weiss SR, Eidsath A, Li XL, Heynen T, Post RM. Quenching revisited: low level direct current inhibits amygdala-kindled seizures. Exp Neurol 1998. 154: 185-92.

4. Weiss SR, et al. Quenching: inhibition of development and expression of amygdala kindled seizures with low frequency stimulation. Neuroreport 1995; 6: 2171-6.

5. Fujii S, et al. Endogenous adenosine regulates the effects of low-frequency stimulation on the induction of long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. Neurosci Lett 2000; 279: 121-4.

6. Lopez-Meraz ML, Neri-Bazan L, Rocha L. Low frequency stimulation modifies receptor binding in rat brain. Epilepsy Res 2004; 59: 95-105.

7. 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.

8. Lundkvist J, et al. cDNA sequence, ligand biding, and regulation of galanin/GMAP in mouse brain. Neurosci Lett 1995; 200: 121-4.

9. Lundstrom L, Elmquist A, Bartfai T, Langel U. Galanin and its receptors in neurological disorders. Neuromolecular Med 2005; 7: 157-80.

10. Mazarati AM, et al. Modulation of hippocampal excitability and seizures by galanin. J Neurosci 2000; 20: 6276-81.

11. Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD, De Lacalle S, Mufson EJ. Galanin in Alzheimer disease. Mol Interv, 2003. 3: 137-56.

12. Zhang X, et al. Expression of neuropeptides and neuropeptide mRNAs in spinal cord after axotomy in the rat, with special reference to motoneurons and galanin. Exp Brain Res 1993; 93: 450-61.

13. Kuteeva E, et al. Distribution of galanin and galanin transcript in the brain of a galanin-overexpressing transgenic mouse. J Chem Neuroanat 2004; 28: 185-216.

14. Miller MA, Kolb PE, Leverenz JB, Peskind ER, Raskind MA. Preservation of noradrenergic neurons in the locus ceruleus that coexpress galanin mRNA in Alzheimer's disease. J Neurochem 1999; 73: 2028-36.

15. Perez SE, et al. Distribution of galaninergic immunoreactivity in the brain of the mouse. J Comp Neurol 2001; 434: 158-85.

16. Xu ZQ, Shi TJ, Hokfelt T. Galanin/GMAP- and NPY-like immunoreactivities in locus coeruleus and noradrenergic nerve terminals in the hippocampal formation and cortex with notes on the galanin-R1 and -R2 receptors. J Comp Neurol 1998; 392: 227-51.

17. Coumis U, Davies CH. The effects of galanin on long-term synaptic plasticity in the CA1 area of rodent hippocampus. Neuroscience 2002; 112: 173-82.

18. Crawley JN, Minireview. Galanin-acetylcholine interactions: relevance to memory and Alzheimer's disease. Life Sci 1996; 58: 2185-99.

19. Floren A, Land T, Langel U. Galanin receptor subtypes and ligand binding. Neuropeptides 2000; 34:

Archive of SID

www.SID.ir

Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1972; 32: 281-94.

29. McIntyre DC, Wong RK. Modification of local neuronal interactions by amygdala kindling examined in vitro. Exp Neurol 1985; 88: 529-37.

30. Sollenberg UL, et al. M871-A novel peptide antagonist selectively recognizing the galanin receptor type 2. Int J Peptide Res Therapeut 2006; 12: 115-9.

31. Goodman JH, Berger RE, Tcheng TK. Preemptive low-frequency stimulation decreases the incidence of amygdala-kindled seizures. Epilepsia 2005; 46: 1-7.

32. 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.

33. Yamamoto J, Ikeda A, Satow T, Takeshita K, Takayama M, Matsuhashi M, et al. Low-frequency electric cortical stimulation has an inhibitory effect on epileptic focus in mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsia 2002; 43: 491-5.

34. Yang LX, et al. Unilateral low-frequency stimulation of central piriform cortex delays seizure development induced by amygdaloid kindling in rats. Neuroscience 2006; 138: 1089-96.

35. Zini S, et al. Galanin reduces release of endogenous excitatory amino acids in the rat hippocampus. Eur J Pharmacol 1993; 245: 1-7.

36. Sakurai E, et al. Galanin inhibits long-term potentiation at Schaffer collateral-CA1 synapses in guinea-pig hippocampal slices. Neurosci Lett 1996; 212: 21-4.

331-7.

20. Wang S, et al. Differential intracellular signaling of the GalR1 and GalR2 galanin receptor subtypes. Biochem 1998; 37: 6711-7.

21. Mazarati A, et al. Galanin type 2 receptors regulate neuronal survival, susceptibility to seizures and seizure-induced neurogenesis in the dentate gyrus. Eur J Neurosci 2004; 19: 3235-44.

22. Mazarati A, et al. Patterns of seizures, hippocampal injury and neurogenesis in three models of status epilepticus in galanin receptor type 1 (GalR1) knockout mice. Neuroscience 2004; 128: 431-41.

23. Mazarati AM, Halaszi E, Telegdy G. Anticonvulsive effects of galanin administered into the central nervous system upon the picrotoxin-kindled seizure syndrome in rats. Brain Res 1992; 589: 164-6.

24. Mazarati AM, et al. Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus. J Neurosci 1998; 18: 10070-7.

25. Sadegh M, et al. The role of galanin receptors in anticonvulsant effects of low-frequency stimulation in perforant path-kindled rats. Neurosci 2007.

26. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press 1986.

27. Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK, A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. Exp Neurol 1969; 25: 295-330.

28. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure.

Archive of SID

www.SID.ir

37. 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: 20-9.

38. Mazarati A, Lu X. Regulation of limbic status epilepticus by hippocampal galanin type 1 and type 2 receptors. Neuropeptides 2005; 39: 277-80.

39. Mazarati A, et al. Regulation of kindling epileptogenesis by hippocampal galanin type 1 and type 2 receptors: The effects of subtype-selective agonists and the role of G-protein-mediated signaling. J Pharmacol Exp Ther 2006; 318: 700-8.

40. Mazarati A, Wasterlain CG. Anticonvulsant effects of four neuropeptides in the rat hippocampus during self-sustaining status epilepticus. Neurosci Lett 2002; 331: 123-7.

41. Smith KE, Forray C, Walker MW, Jones KA, Tamm JA, Bard J, et al. Expression cloning of a rat hypothalamic galanin receptor coupled to phosphoinositide turnover. J Biol Chem 1997; 272: 24612-6.

Archive of SID

www.SID.ir