



JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و یک، شماره چهار، مرداد و شهریور ۱۳۹۷

journal homepage: <http://jams.arakmu.ac.ir>



مقاله پژوهشی

ارزیابی اثربخشی والپروات سدیم و تحریک الکتریکی با فرکانس پایین بر رفتار شبه اضطرابی طی کیندلینگ CA1 هیپوکامپ در موش صحرایی نر بالغ

رها زال خانی^۱، احمد علی معاضدی^{۱*}، زهره قطب الدین^۲، مهدی پور مهدی بروجنی^۳

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: اختلالات هیجانی در بسیاری از بیماران مصروع شایع است. از این رو، در این مطالعه اثربخشی دو روش درمانی تشنج بر رفتار شبه اضطرابی طی روند کیندلینگ در موش صحرایی نر بالغ بررسی شد.

مواد و روش‌ها: ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ به طور تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند: کنترل، شاهد جراحی، گروه‌های سالین-کیندل و دارو-کیندل که سالین یا دارو را ۱۵ دقیقه قبل از تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند، گروه‌های سالین-کیندل-LFS و دارو-کیندل-LFS که سالین یا دارو را ۱۵ دقیقه قبل از کیندلینگ و LFS را بلافاصله پس از پایان تحریکات کیندلینگ دریافت کردند. رفتار شبه اضطرابی با استفاده از دستگاه ماز بعلاوه مرتفع و جعبه میدان باز در روز ششم ارزیابی شد.

یافته‌ها: کیندلینگ، درصد ورود به بازوهای باز، درصد زمان جستجوی بازوهای باز، افزایش تعداد پریدن از دستگاه ماز بعلاوه مرتفع ($p < 0.01$) و فرکانس ایستادن روی دوپا در دستگاه جعبه باز ($p < 0.05$) را در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش داد. والپروات سدیم درصد ورود به بازوهای باز و درصد زمان جستجوی بازوهای باز را در گروه دارو-کیندل در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد ($p < 0.01$). اما از نظر تعداد پریدن از دستگاه ماز بعلاوه ارتفاع و فرکانس ایستادن روی دو پا در آزمون میدان باز با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. همچنین، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های دارو-کیندل، سالین-کیندل-LFS و دارو-کیندل-LFS در این پارامترها وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: والپروات سدیم و LFS به عنوان دو روش درمانی کنترل‌کننده صرع، اضطراب القاشده توسط تحریکات کیندلینگ را کاهش می‌دهند.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۰۴

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۰۸

تاریخ انتشار: ۹۷/۰۵/۰۱

واژگان کلیدی:

والپروات سدیم

تحریک الکتریکی با فرکانس پایین

کیندلینگ

اضطراب

*نویسنده مسئول:

احمد علی معاضدی

آدرس پستی: اهواز، اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی.

تلفن: +98 916 308 0198

نمابر:

E-mail: moazedi.a@gmail.com

۱. مقدمه

صرع، تخریب هیپوکامپ و ناهنجاری‌های رفتاری و یادگیری بینایی-فضایی در صرع مدل کاینات جلوگیری می‌کند (۱۰). اما برانت و همکاران (۲۰۰۶) گزارش دادند که تیمار طولانی با والپروات از پیشرفت صرع ناشی از تحریکات الکتریکی هسته قاعده‌ای-جانسی آمیگدال جلوگیری نمی‌کند و اثری بر اصلاح آن ندارد، اما باعث مهار تغییرات ایجاد شده در تشکیلات هیپوکامپ و تغییرات رفتاری متعاقب آن می‌شود (۱۱). هم‌چنین کلیتگارد و همکاران (۲۰۰۱) عدم تاثیر والپروات بر فرآیند صرع‌زایی را در مدل پیلوکارپین گزارش کردند (۱۲).

تداخل مثبت بین عمل داروهای ضدصرعی و تحریک الکتریکی مغز می‌تواند یک روش موثر دیگر در کنترل صرع‌های غیرقابل درمان و توقف روند صرع‌زایی یا اصلاح بیماری باشد. گزارشات نشان داده‌اند که کاربرد HFS همراه با مقادیر زیرآستانه‌ای داروهای ضدصرعی (از جمله دیازپام، فنوباریتال و گاباپنتین)، انتقال گابارژیک را افزایش می‌دهد و اثرات ضدتشنجی ناشی از القای HFS را نیز تقویت می‌کند (۱۳، ۱۴).

از جمله پیامدهای بیماری صرع و درمان‌های به‌کار برده شده، اختلال حرکت، اضطراب و افسردگی می‌باشد و گزارشات زیادی تایید کننده این مطلب می‌باشند: برای مثال، گزارش شده است که کیندلینگ آمیگدال باعث کاهش فعالیت حرکتی در آزمون میدان باز و ماز بعلاوه مرتفع، افزایش زخم معده القاشده توسط استرس، افزایش فاکتور رهاکننده کورتیکوتروپین (CRF) ایجادکننده جنگ تدافعی می‌شود (۱۵). گزارش شده است که اختلالات رفتاری مانند اضطراب و افسردگی در افراد مبتلا به صرع به ویژه در صرع کانونی لوب گیجگاهی بیشتر است. داروهای ضدصرعی اثرات منفی و مثبتی بر روان افراد دارند. داروهای ضدصرعی ویگابترین، فنوباریتون و توپیرامات با ایجاد افسردگی اثر منفی بر روان دارند. اثرات مثبت روانی داروهای ضدتشنجی از سال ۱۹۶۰ مورد توجه قرار گرفت. داروهای ضدصرعی کاربامازپین و لاموتریژن و والپروات در درمان اختلالات رفتاری مانند افسردگی دوقطبی و مانیای حاد استفاده می‌شوند (۱۶).

تشنج به تغییر گذرای رفتاری به دلیل تخلیه ریتمیک و همزمان جمعی از نورون‌های سیستم اعصاب مرکزی گفته می‌شود و اگر این تشنجه‌ها تکرار شوند بیماری صرع نامیده می‌شود (۱). صرع مجموعه‌ای از اختلالات نورولوژیکی مزمن می‌باشد که بعد از سکته‌های مغزی (۲) رایج‌ترین اختلال عصبی در انسان است و میزان شیوع آن حدود ۱ تا ۲ درصد در جهان است (۳). صرع لوب گیجگاهی، شایع‌ترین اختلال صرعی در انسان می‌باشد که معمولاً ماه‌ها یا حتی سال‌ها بعد از اولین اختلالات عصبی ایجاد می‌شود (۴).

دارو درمانی معمول‌ترین روش درمانی بیماران صرعی می‌باشد که در بیش از ۷۰ درصد بیماران موثر است (۵). علاوه بر این، در تعدادی از بیماران از روش جراحی برای برداشت کانون صرع‌زا استفاده می‌شود که تنها در صورت تک کانونی بودن صرع قابل استفاده است، ولی این روش عوارض غیرقابل برگشتی را به دنبال دارد (۶). یکی از روش‌های درمانی صرع‌های غیرقابل کنترل، تحریک الکتریکی مغز با فرکانس‌های بالا (HFS) یا پایین (LFS) است. LFS نوعی تحریک عمقی مغز می‌باشد که اثر مهاری خود را همراه با افزایش آستانه شلیک نورون‌ها با مکانیسم‌های پیچیده اعمال می‌کند. کاربرد LFS به عنوان یک فاکتور مهاری در کسب کیندلینگ، اولین بار در سال ۱۹۸۰ توسط گایتو گزارش شده است. او با اعمال LFS قبل و بعد از تحریک کیندلینگ، افزایش آستانه تشنج را مشاهده کرد. کیندلینگ یک مدل آزمایشگاهی برای ایجاد تشنج است و به پدیده‌ای اشاره می‌کند که در طی آن تحریکات مکرر زیر آستانه‌ای می‌تواند واقعه پیش رونده‌ای را ایجاد کند که در نهایت به صرع عمومی تبدیل می‌شود (۷، ۸).

والپروات سدیم از داروهای ضدصرعی پرمصرفی است که اثربخشی زیادی در کنترل انواع صرع‌ها دارد. سیلور و همکاران (۱۹۹۱) گزارش کردند که والپروات در مدل کیندلینگ اثر ضد صرع‌زایی دارد (۹). هم‌چنین، بولانوس و همکاران (۱۹۹۸) گزارش دادند که تیمار طولانی با والپروات از پیشرفت

به طور روزانه دریافت می‌کردند، گروه‌های سالین-کیندل- LFS و دارو-کیندل- LFS که سالین یا دارو را ۱۵ دقیقه قبل و LFS را بلافاصله پس از پایان دریافت تحریکات کیندلینگ دریافت کردند. کلیه آزمایش‌ها در گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز و در زمان روشنایی، بین ساعت ۸ صبح الی ۴ بعد از ظهر به منظور جلوگیری از تأثیر ریتم شبانه‌روزی حیوان بر آزمایش‌ها انجام گرفت. حیوانات یک ساعت قبل از شروع آزمون به آزمایشگاه منتقل می‌شدند تا به شرایط آزمایشگاه عادت کنند (۱۸).

(الف) روش جراحی، آستانه‌گیری و اعمال تحریکات
(۱) جراحی حیوانات

برای بی‌هوشی حیوان، کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. سپس سر حیوان در دستگاه استریوتاکسی ثابت گردید. پس از ایجاد برش در پوست سر، ناحیه برگما شناسایی شده و براساس مختصات ذکر شده در اطلس پاکسینوس ناحیه مربوط به هیپوکامپ (۲/۵ میلی‌متر به سمت عقب و ۱/۸ میلی‌متر به سمت راست نسبت به برگما و ۲/۸ میلی‌متر زیر جمجمه) مشخص شد. بعد از علامت‌گذاری ناحیه مذکور، یک منفذ با استفاده از مته‌های دندانپزشکی در محل مشخص شده ایجاد گردید. از یک الکتروود سه قطبی جهت تحریک و ثبت و یک الکتروود مسی به عنوان زمین استفاده شد. الکتروود سه قطبی درون CA1 هیپوکامپ کار گذاشته شد. سپس الکتروود تک قطبی با استفاده از پیچ لحیم‌شده به آن‌ها بر روی جمجمه متصل شد. دو پیچ کوچک دیگر برای استحکام روی نقاط دیگری از جمجمه وصل گردید و الکتروودها و پیچ‌ها به وسیله سیمان دندانپزشکی روی سطح جمجمه ثابت شدند. آن‌گاه بین‌های متصل به الکتروودهای سه قطبی و تک قطبی درون بخش مادگی سوکت مربوطه قرار داده شد و سوکت با استفاده از سیمان دندانپزشکی بر روی جمجمه نصب گردید. برای بهبودی زخم‌ها و دست‌آموز شدن حیوان، ۷ روز به حیوان استراحت داده می‌شد (۱۸).

متاسفانه مدارک زیادی مبنی بر تأثیر مثبت روانی داروهای ضدتشنجی در بیماران مبتلا به صرع وجود ندارد. یکی از پرمصرف‌ترین داروهای ضدصرعی در جهان والپروات یا والپروئیک اسید می‌باشد که در درمان تشنج‌های کانونی و عمومی در بزرگسالان و کودکان کاربرد دارد. هم‌چنین از این دارو به عنوان یک روش درمانی جدید در درمان اختلالات روانی استفاده می‌شود (۱۷). فرض ما بر این اصل بود که درمان ترکیبی LFS و والپروات سدیم علاوه بر کنترل تشنج یا توقف روند صرع‌زایی، اثربخشی مثبتی بر اختلالات رفتاری القاشده توسط کیندلینگ داشته باشند، از این‌رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی میزان اثر بخشی LFS و والپروات به تنهایی و اثر ترکیبی آن‌ها بر رفتار شبه اضطرابی ایجاد شده به دنبال کیندلینگ هیپوکامپ طراحی گردید.

۲. ملاحظات اخلاقی

کلیه ضوابط منشور اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی (شماره: ۱۳/۹/۲۵۰/۳، مورخ: ۳/۱۲/۹۰، کد: ۹ الف ۹ ج Q ۵۵/۱۸۰) در روند اجرای آزمایش رعایت گردید.

۳. مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار استفاده شد. تمام مراحل آزمایش بر اساس دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز طراحی و اجرا شد. برای انجام این مطالعه، ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن تقریبی 20 ± 200 گرم انتخاب و در محل مخصوص نگهداری حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در طول مطالعه نگهداری شدند. دمای محل پرورش موش‌ها 23 ± 1 درجه سانتی‌گراد بود و کلیه گروه‌ها آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. سپس به طور تصادفی به ۶ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. گروه‌های مورد مطالعه عبارت بودند از: کنترل، شاهد جراحی، گروه‌های سالین-کیندل و دارو-کیندل که سالین یا دارو را ۱۵ دقیقه قبل از دریافت تحریکات کیندلینگ

دستگاه ماز به علاوه مرتفع به عنوان یک مدل غیرشرطی جهت تولید و سنجش اضطراب در جوندگان محسوب می‌گردد. اجزای تشکیل‌دهنده این دستگاه دو بازوی باز و دوبازوی بسته مقابل هم می‌باشند. هر چهار بازو دارای سقف باز هستند. طول هر بازو ۵۰ سانتی‌متر و پهنای آن‌ها ۱۰ سانتی‌متر است. بازوهای بسته دارای دیوارهای به ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر می‌باشند و در مرکز نیز مربع ۱۰ در ۱۰ سانتی‌متر بازوها را به هم مرتبط می‌کند. دستگاه به میزان ۵۰ سانتی‌متر از سطح زمین ارتفاع داشته و یک و نیم متر بالاتر از آن یک لامپ ۱۴ وات با پردازش نوری یکنواخت قرار گرفته است. در دستگاه ماز به علاوه مرتفع رفتار اضطرابی به معنی حرکت به محدوده بازوهای بسته تفسیر می‌گردد (۲۰).

اساس کار دستگاه ترس حیوان از ارتفاع و رفتن به سمت بازوهای بسته می‌باشد که هر چه میزان حضور و رفتن به بازوهای بسته بیشتر باشد، نشان‌دهنده افزایش اضطراب و برعکس هر چه میزان حضور و رفتن به بازوهای باز بیشتر باشد نشان‌دهنده کاهش اضطراب است. در ابتدای آزمون هر حیوان به گونه‌ای در ماز قرار داده می‌شد که روی آن به سمت بازوی بسته باشد و سپس به حیوان اجازه داده می‌شد که به مدت ۵ دقیقه آزادانه در ماز گردش کند. درصد حضور و تعداد ورود به بازوهای باز و بسته به ترتیب به عنوان شاخص اضطراب و شاخص فعالیت حرکتی سنجش شدند. جهت جلوگیری از یادگیری هر حیوان فقط یکبار تست گرفته می‌شد. پس از هر آزمون دستگاه توسط الکل و پنبه، تمیز و خشک می‌گردید (۲۰).

(۲) ارزیابی میزان اضطراب با آزمون جعبه باز یک ساعت بعد از سنجش اضطراب، ارزیابی فعالیت رفتاری در دستگاه جعبه باز انجام می‌گرفت. این دستگاه از یک جعبه مکعبی روباز با کف پلاستیکی سفید و دیواره‌های پلاستیکی گلاس به ابعاد ۵۰×۵۰×۵۰ سانتی‌متر ساخته شده است. یکی از پارامترهای مرتبط با سنجش اضطراب فاکتور کشیدگی بدن (تعداد دفعاتی که موش روی پای خود به صورت عمودی قرار می‌گیرد) می‌باشد. در مورد ارتباط این فاکتور و اضطراب دو

(۲) آستانه‌گیری: بعد از دوره بهبودی برای به دست آوردن حداقل شدت تحریک، حیوان توسط جریانی به شدت ۳۰ میکروآمپر تحریک می‌گردید. اگر امواج تخلیه متعاقب (حداقل به مدت ۸ ثانیه) ثبت می‌شدند، این شدت جریان به عنوان شدت جریان آستانه شناخته می‌شد. در غیر این صورت، هر بار شدت جریان ۱۰ میکروآمپر به فواصل ۵ دقیقه افزایش داده می‌شد تا وقتی که امواج تخلیه متعاقب ثبت گردد (۱۸).

(۳) تحریک حیوانات

۳-۱: تحریک برای ایجاد کیندلینگ

برای تحریک حیوان با روش کیندلینگ سریع، حیوانات با موج مربعی تک فازی با مدت پالس ۱ میلی‌ثانیه، فرکانس ۵۰ هرتز، شدت آستانه تولید امواج تخلیه متعاقب و به مدت ۳ ثانیه تحریک می‌شدند. این تحریکات به فاصله هر ۱۰ دقیقه یکبار و ۱۲ بار در روز انجام می‌شد تا مراحل مختلف تشنج را نشان داده و کیندل شوند. پس از اعمال تحریکات کیندلینگ، امواج الکتریکی مغزی توسط الکتروژن‌دهنده‌ها به دستگاه الکتروماجول منتقل و توسط برنامه کامپیوتری eprobe اندازه‌گیری می‌شدند. بر اساس معیارهای Racine شدت تشنج در طی کیندلینگ به پنج مرحله تقسیم شد (۱۹): مرحله ۱: انقباض عضلات صورت، مرحله ۲: حرکت دادن سر به طرف بالا و پایین، مرحله ۳: کلونوس یکی از اندام‌های جلویی، مرحله ۴: ایستادن روی هر دو پا توام با کلونوس هر دو اندام جلویی، و مرحله ۵: ایستادن روی هر دو پا همراه با از دست دادن تعادل و افتادن.

۳-۲: تحریک برای اعمال LFS

LFS به صورت چهار بسته در فواصل هر ۵ دقیقه یکبار به حیوان اعمال می‌شد. هر بسته شامل ۲۰۰ موج مربعی دوفازی و هر پالس ۰/۱ میلی‌ثانیه با فرکانس ۱ هرتز بود (۱۸). در تمامی گروه‌ها، شش روز پس از آغاز تحریکات برای سنجش اضطراب از آزمون ماز بعلاوه مرتفع و جعبه باز استفاده شد.

(ب) آزمون‌های رفتاری

(۱) ارزیابی رفتار شبه اضطرابی با دستگاه ماز بعلاوه مرتفع

ج) اثر تزریق والپروات سدیم قبل از اعمال تحریکات کیندلینگ هیپوکامپ بر رفتار شبه اضطرابی: درصد ورود به بازوهای باز در گروه سالین-کیندل ($p=0/001$) و گروهی که والپروات را قبل از اعمال تحریکات کیندلینگ دریافت کرده بودند ($p=0/014$) نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری را نشان داد (نمودار ۲A). درصد حضور در بازوهای باز نیز در گروه سالین-کیندل ($p=0/000$) و گروهی که والپروات را قبل از اعمال تحریکات کیندلینگ دریافت کرده بودند ($p=0/000$) نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری پیدا کرد (نمودار ۲B). تعداد ایستادن روی دو پا تنها در گروه سالین-کیندل نسبت به گروه شاهد افزایش معنی دار نشان داد ($p=0/02$) (نمودار ۲C).

د) اثر کاربرد توام والپروات سدیم و اعمال تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین در طی روند کیندلینگ هیپوکامپ بر رفتار شبه اضطرابی: درصد ورود به بازوهای باز ($p=0/980$) (نمودار ۳A) و حضور در بازوهای باز ($p=0/316$) (نمودار ۳B) در ماز بعلاوه مرتفع و تعداد روی دو پا ایستادن در جعبه میدان باز ($p=0/4$) (نمودار ۳C) در گروه توام دریافت کننده والپروات سدیم و تحریکات الکتریکی با فرکانس کم در مقایسه با شاهد جراحی افزایش معنی داری نداشت. هم چنین گروه توام با گروه دارو-کیندل به تنهایی اختلاف معنی داری نداشتند.

ه) تعداد پریدن از دستگاه ماز بعلاوه مرتفع: نتایج به دست آمده نشان می دهد که تعداد پرشها در گروه کیندل نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری داشت، درحالی که تعداد پرشها در سایر گروهها صفر بود و اختلاف معنی داری با گروه شاهد نشان نداد. افزایش پرشها در گروه کیندل بر افزایش اضطراب در این گروه دلالت دارد و کاهش پرش در گروههایی که دارو یا تحریک الکتریکی با فرکانس پایین را به تنهایی یا توام دریافت کرده بودند دلالت بر کاهش اضطراب در این گروهها دارد (جدول ۱).

نظر وجود دارد. در تعدادی از مقالات افزایش این فاکتور را ناشی از کاهش اضطراب می دانند و در برخی از مطالعات افزایش آن را به افزایش اضطراب نسبت می دهند که در نتیجه میزان آن می تواند با مصرف داروهای ضد اضطراب کاهش یابد (۲۱).

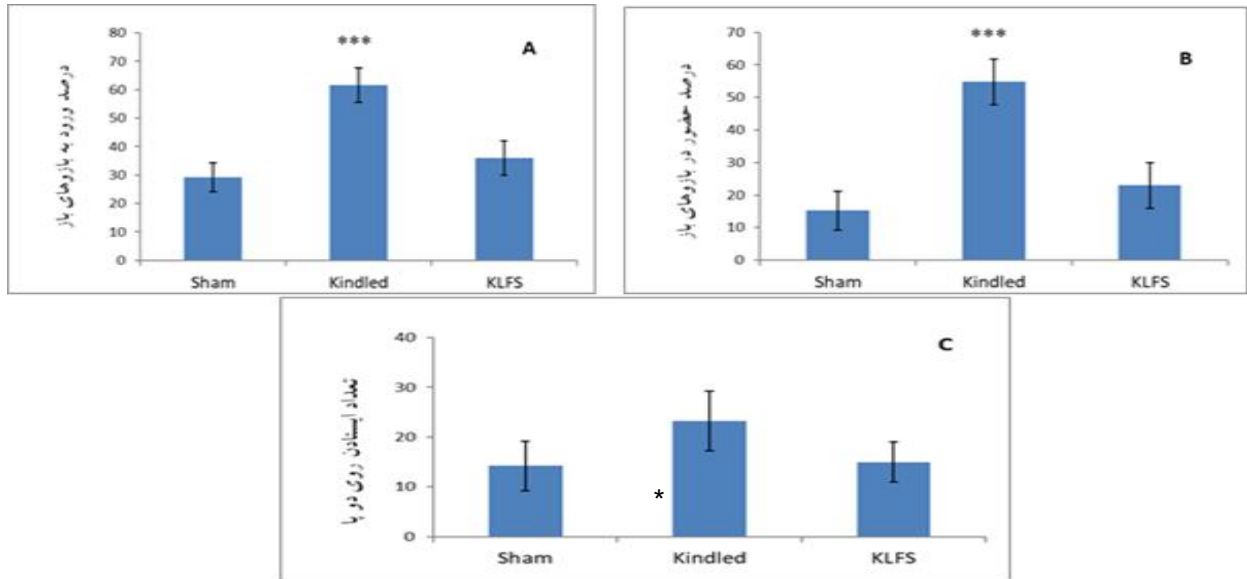
تحلیل آماری

برای تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد. برای مقایسه اختلاف بین گروهها از آزمون آنوای یک طرفه و برای هموزنیتی دادهها از آزمون لون استفاده شد. در کلیه موارد، در صورت وجود اختلاف بین گروهها و هموزن بودن دادهها از پس آزمون توکی و در صورت هموزن نبودن از آزمون دانت استفاده شد. هم چنین در تمامی موارد، $p \leq 0/05$ به عنوان معیار حداقل اختلاف معنی دار آماری طی تحلیل دادهها در نظر گرفته شد و تمامی دادهها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند.

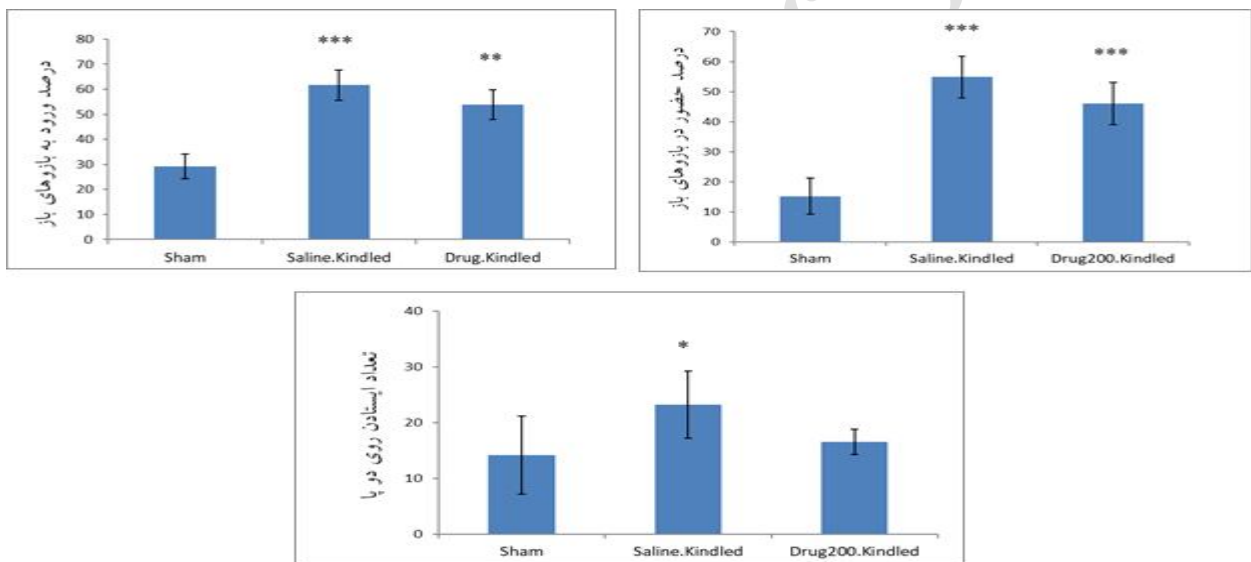
۴. یافتهها

الف) اثر کاشت الکتروود بر رفتار اضطرابی: از آنجایی که در شاخصهای درصد ورود به بازوهای باز و درصد حضور در بازوهای باز در آزمون ماز بعلاوه مرتفع و شاخص رفتار روی دو پا ایستادن در آزمون جعبه باز بین گروههای شاهد جراحی و کنترل تفاوت معنی داری وجود نداشت، بنابراین فقط از گروه شاهد جراحی جهت مقایسه با سایر گروهها استفاده شد.

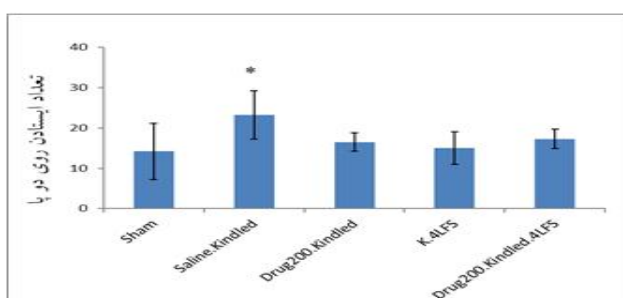
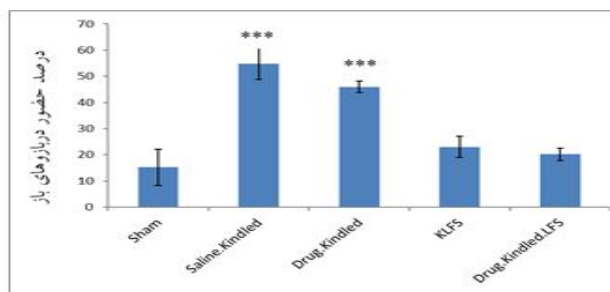
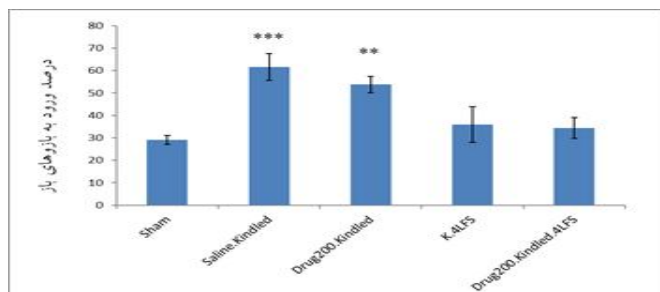
ب) اثر اعمال تحریک الکتریکی با فرکانس پایین طی روند کیندلینگ هیپوکامپ بر رفتار شبه اضطرابی: درصد ورود به بازوهای باز ($p=0/000$) (نمودار ۱A) و درصد حضور در بازوهای باز ($p=0/000$) در آزمون ماز بعلاوه مرتفع (نمودار ۱B) و تعداد ایستادن روی دو پا ($p=0/02$) در آزمون جعبه باز در گروه کیندل در مقایسه با گروه شاهد جراحی افزایش معنی داری داشت (نمودار ۱C). اما بین سایر گروهها نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی داری مشاهده نشد.



نمودار ۱. بررسی اثر اعمال تحریک الکتریکی با فرکانس پایین در طی روند کیندلینگ هیپوکامپ بر رفتار شبه اضطرابی؛ A: درصد ورود به بازوهای باز. B: درصد حضور در بازوهای باز. C: تعداد ایستادن روی دو پا. ***، **، * نشان دهنده تفاوت معنی دار به ترتیب در سطح ($p < 0.001$)، ($p < 0.01$) و ($p < 0.05$) با گروه شاهد است. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار نشان داده شده اند ($n=7$).



نمودار ۲. بررسی اثر والپروات سدیم در طی روند کیندلینگ هیپوکامپ بر رفتار شبه اضطرابی؛ A: درصد ورود به بازوهای باز. B: درصد حضور در بازوهای باز. C: تعداد ایستادن روی دو پا. ***، **، * نشان دهنده تفاوت معنی دار به ترتیب در سطح ($p < 0.001$)، ($p < 0.01$) و ($p < 0.05$) با گروه شاهد است. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار نشان داده شده اند ($n=7$).



نمودار ۳. بررسی اثر تداخلی والپروات سدیم و تحریک الکتریکی با فرکانس پایین در طی روند کیندلینگ هیپوکامپ بر رفتار شبه اضطرابی؛ A: درصد ورود به بازوهای باز. B: درصد حضور در بازوهای باز. C: تعداد ایستادن روی دو پا؛ **، ***، * نشان دهنده تفاوت معنی دار به ترتیب در سطح $(p < 0.001)$ ، $(p < 0.01)$ و $(p < 0.05)$ با گروه شاهد است. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار نشان داده شده اند ($n=7$).

جدول ۱. تعداد پریدن از دستگاه ماز بعلاوه مرتفع

| گروه | sham | Saline.kindled | K.LFS | Drug200.Kindled | Drug200.kindled.LFS |
|-------------|------|----------------|-------|-----------------|---------------------|
| تعداد پریدن | ۰ | ۱۰ | ۰ | ۰ | ۰ |

از دستگاه (جدول ۱) و نیز افزایش میزان روی دوپا ایستادن می‌باشد، اظهار می‌گردد که اضطراب در موش‌های صحرایی کیندل شده افزایش یافته است که با قرار گرفتن در دستگاه ماز بعلاوه مرتفع و دستگاه جعبه باز برای پیدا کردن راه فرار، میزان حضور در بازوهای باز و میزان ایستادن روی دو پا در مقابل دیواره‌های دستگاه افزایش می‌یابد.

مطابق با نتایج این آزمایش، کالینچوک و همکاران گزارش دادند که کیندلینگ آمیگدال و هیپوکامپ باعث افزایش فعالیت حیوان در بازوهای باز و اضطراب می‌شود (۲۲). همچنین گزارش شده است که کیندلینگ آمیگدال و هیپوکامپ باعث افزایش مقاومت در مقابل گرفته شدن با دست و افزایش زمان سپری شده در بازوی باز در ماز بعلاوه مرتفع می‌شود که در این روش، کیندلینگ هر حیوان روزی سه مرتبه و پنج بار در هفته به مدت حدود ۳۰ روز انجام می‌گرفت و آزمون‌های رفتاری یک روز بعد از آخرین تحریک انجام می‌شد (۲۳). برخلاف نتایج ذکر شده، شانگ-در چن و

ج-تایید بافتی

پس از آزمون‌های رفتاری جهت ارزیابی صحت ورود الکترودها موش را بی‌هوش کرده، سپس ناحیه مورد نظر را با استفاده از یک باتری ۹ ولتی و یک کابل رابط دست ساز و الکترودهای تحریکی کاشته شده تخریب کرده تا محل انتهای الکترودها در مغز تغییر رنگ دهد. سپس مغز جدا شده و در فرمالدهید ۱۰ درصد نگهداری می‌شود. بعد از ۴۸ ساعت، مغزها برش داده شده و با مختصات CA1 در اطلس پاکسینوس مقایسه می‌شود. در صورت عدم تطابق محل الکترودها با اطلس، داده‌های حاصل از موش مورد نظر حذف می‌گردد.

۵. بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تحریکات کیندلینگ سریع درصد ورود به بازوهای باز و زمان حضور در بازوهای باز را افزایش می‌دهد (نمودار ۱) که در واقع افزایش این دو شاخص بیان گر کاهش اضطراب است، اما چون همراه با افزایش پریدن

بدین وسیله از فعال شدن مدارهای نورونی درگیر در ترس و اضطراب نیز جلوگیری می‌کند. والپروات هم‌چنین باعث تعدیل انتقال‌دهنده‌های عصبی نورآدرنرژیک و سروتونرژیک می‌شود (۲۷). در بخش چهارم مطالعه، اثرات رفتاری کاربرد توام داروی والپروات و LFS به عنوان یک روش درمانی در کنترل صرع‌های غیرقابل درمان بررسی شد. نتایج نشان داد که درصد ورود به بازوهای باز و درصد حضور در بازوهای باز در گروه دارو-کیندل-LFS نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۳) و هم‌چنین علاوه بر این که هیچ‌کدام از حیوانات از دستگاه به بیرون نپریدند (جدول ۱)، میزان روی دو پا ایستادن هم نسبت به گروه شاهد جراحی تفاوت معنی‌داری نداشت. نتایج ذکر شده بر این دلالت دارند که استفاده از روش‌های درمانی توام والپروات و تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین مشابه روش استفاده از دارو یا تحریک الکتریکی با فرکانس پایین به تنهایی، اضطراب القا شده توسط تحریکات صرع‌زا را در مقایسه با گروه شاهد کاهش می‌دهد. مطالعات محدودی درباره اثر ترکیبی داروهای ضدصرعی و LFS در کنترل تشنج وجود دارد. گولار-هرا و همکاران نشان دادند که اثر ترکیبی بعضی داروهای ضدصرعی مانند گاباپنتین و دیازپام همراه با تحریک الکتریکی با فرکانس بالای مغز سبب کنترل بهتر تشنج‌ها می‌شود. اما کاربرد بعضی داروها مانند فنی‌توین از اثرات حفاظتی این تحریکات الکتریکی جلوگیری می‌کند (۱۴). هم‌چنین، عسگری و همکاران گزارش دادند که اعمال تحریکات الکتریکی با فرکانس کم با دوزهای غیر موثر فنوباریتال اثر ضد تشنجی قوی دارد (۱۳). به نظر می‌رسد داروهایی که بر سیستم گابا اثر می‌گذارند، باعث تقویت عملکرد تحریکات الکتریکی مغز می‌گردند، اما دارویی مانند فنی‌توین که از طریق بلوک کردن کانال‌های سدیمی عمل می‌کند، از عمل ضد تشنجی تحریک الکتریکی مغز جلوگیری می‌کند. احتمالاً به دلیل ارتباط شبکه‌های نورونی رفتارهای هیجانی و تشنج، روش‌های درمانی کنترل کننده تشنج، تاثیر مثبتی بر رفتارهای اضطراب و افسردگی دارند (۲۸). والپروات هم دارویی است که از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله

همکاران گزارش دادند که کیندلینگ آمیگدال باعث کاهش فعالیت در مناطق باز دستگاه ماز بعلاوه مرتفع و مناطق مرکزی دستگاه جعبه باز می‌شود (۲۴). در مطالعه‌ای گزارش شده است که یک هفته بعد از این که موش‌های صحرایی ۱۵ مرتبه مرحله‌ی ۵ تشنج را نشان دادند زمان حضور در بازوهای باز در تست ماز بعلاوه‌ی مرتفع در مقایسه با حیوان غیر کیندل کاهش یافته است. اما نتایج فعالیت حرکتی در آزمون میدان باز در دو گروه کیندل و غیر کیندل یک هفته پس از آخرین تحریک تفاوتی نداشتند (۲۵). در بخش دوم مطالعه، اثر LFS بر اضطراب القا شده توسط تحریکات کیندلینگ بررسی شد. نتایج نشان داد که درصد ورود به بازوهای باز، زمان حضور در بازوهای باز در آزمون ماز بعلاوه مرتفع، تعداد روی دو پا ایستادن در آزمون جعبه باز (شکل ۱) و میزان پریدن از ماز بعلاوه مرتفع (جدول ۱) در گروهی که تحریک LFS دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه شاهد جراحی تفاوت معنی‌داری نداشت که بیان‌گر اثر LFS در کاهش اضطراب القا شده توسط تحریکات کیندلینگ می‌باشد. مطابق با نتایج این گزارش، گادلفسکی و همکاران گزارش دادند که تحریکات الکتریکی از اختلالات هیجانی القاشده توسط کیندلینگ شیمیایی جلوگیری می‌کند (۲۶). در بخش سوم مطالعه، اثر داروی ضدصرعی والپروات سدیم بر رفتار اضطرابی بررسی شد. نتایج نشان داد که والپروات سدیم درصد ورود و حضور در بازوهای باز را افزایش (شکل ۲) و میزان پریدن از دستگاه را کاهش می‌دهد (جدول ۱). هم‌چنین، تزریق والپروات سدیم قبل از تحریکات کیندلینگ، از افزایش میزان روی دو پا ایستادن در آزمون جعبه باز جلوگیری کرد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که والپروات سدیم اضطراب القا شده توسط تحریکات کیندلینگ را کاهش داده است. والپروات سدیم به عنوان یک اسید چرب کربوکسیلیک باعث افزایش سنتز و مهار تجزیه اسید آمینه‌ی مهاری گابا می‌شود. هم‌چنین فعالیت نورون‌های گابارژیک و بلوک کردن جریان‌های سدیمی وابسته به ولتاژ را افزایش داده و به این ترتیب از تخلیه‌های انفجاری شبکه‌های نورونی یا به عبارت دیگر از تشنج جلوگیری می‌کند و

اضطراب القاشده توسط تحریکات کیندلینگ را کاهش می‌دهند.

۷. تقدیر و تشکر

نویسندگان از معاونت آموزشی دانشگاه شهید چمران اهواز جهت حمایت مالی و معنوی از این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

سیستم گابا اثرات متنوع خود را اعمال می‌کند و به نظر می‌رسد که برخلاف فنی‌توین از عملکرد LFS جلوگیری نکرده است و گروه توام والپروات و LFS هم مانند گروه دارو به تنهایی، سبب کاهش اضطراب القا شده توسط کیندلینگ شده است.

از آنجایی که هیپوکامپ، مدارهای عصبی آمیگدال که از مراکز عصبی مهم در پردازش هیجان‌ها می‌باشد را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بنابراین کیندلینگ هیپوکامپ می‌تواند با اثر بر آمیگدال شاخص‌های فیزیولوژیکی اضطراب را ایجاد کند. کیندلینگ با تغییر فعالیت سیستم گاباژیک، سبب کاهش آستانه تشنج‌ها و تقویت مدارهای تحریک‌پذیری رفتار اضطرابی می‌شود. روش‌های درمانی کنترل صرع مانند اعمال LFS و داروهای تقویت‌کننده سیستم گابا مانند والپروات سدیم با تعدیل شبکه‌های عصبی هیپوکامپ و آمیگدال می‌توانند هیجان‌ها را تنظیم کنند (۲۹، ۳۰).

۶. نتیجه‌گیری

کاربرد توام و جداگانه والپروات سدیم و تحریک الکتریکی با فرکانس پایین به عنوان دو روش درمانی کنترل‌کننده صرع،

References

1. Mc Namara JO: Cellular and molecular basis of epilepsy, *J Neurosci*. 1994;14: 3413-3425.
2. Loscher W, Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy, *Epilepsy Res*. 2002; 50: 105-123.
3. Loscher W, Current status and future direction in the pharmacotherapy of epilepsy, *Trends Pharmacol Sci*. 2002; 23: 113-8.
4. Kandravicius L, Balista P, Lopes-Aguiar IC, Ruggiero R, Umeoka E, Garcia-Cairasco N, Bueno-Junior IL, Leite J, Animal models of epilepsy: use and limitations, *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014; 10: 1693-1705.
5. Sander JW, The use of antiepileptic drug-principles and practice, *Epilepsia*. 2004; 45: 28-34.
6. Shahpari M, Mirnajafizade J, Firoozabadi S, Yadollahpour A, effect of low-frequency electrical stimulation parameters on its anticonvulsant action during rapid performant path kindling in rat, *Epilepsy Res*. 2012; 99: 69-77.
7. Wyckhuys T, Raedt R, Vonck K, Wadman W, Boon P, Comparison of hippocampal deep brain stimulation with high (130) and low frequency (5Hz) on afterdischarges in kindled rats, *Epilepsy Res*. 2010; 88: 239-246.
8. Gaito J, Nobrega J.N, Gaito, S.T, Interference effect of 3 Hz brain stimulation on kindling behavior induced by 60 Hz stimulation, *Epilepsia*. 1980; 21:73-84.
9. Silver JM, Shin C, McNamara JO, Antiepileptogenic effects of conventional anticonvulsants in the kindling model of epilepsy, *Ann Neurol*. 1991; 29: 356-363.
10. Bolanos AR, Sarkisian M. Yang Y, Hori A, Helmers SL, Mikati M, Tandon P, Stafstrom CE, Holmes GL. Comparison of valproate and phenobarbital treatment after status epilepticus in rats, *Neurol*. 1998; 51: 41-48.
11. Brandt C, Gastens AM, Sun M, Hausknecht M, and Loscher W. Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis and behavioral alteration in rats, *Neuropharmacol*. 2006; 51:789-804.
12. Klitgaard HV, Matagne AC, Vanneste Goemaere J, and Margineanu DG. Effect of prolonged administration of levetiracetam on pilocarpine-induced epileptogenesis in rats, *Epilepsia*. 2001; 42:114-115.
13. Asgari A, Semnani S, Atapour N, Shojaei A, Mirnajafi-zadeh J, combined sub-threshold dosages of phenobarbital and low frequency stimulation effectively reduce seizures in amygdala-kindled rats, *Neurol Sci*. 2014; 35: 1255-1260.
14. Cuellar-Herrera M, Pena F, Alcantara-Gonzalez D, Neri-Bazan L, Rocha L, Antiepileptic drugs combined with high-frequency electrical stimulation in the ventral hippocampus modify pilocarpine-induced status epilepticus in rats, *Epilepsia*. 2010; 51: 432-437.
15. Kalynchuk L, Pinel J, Treit D, Kippin T, Changes in emotional behavior produced by long-term amygdala kindling in rats, *Biol Psychiatry*. 1997; 41: 438-451.
16. Piazzini A, Canevini M, Maggiori M, R. Canger R, Depression and anxiety in patients with epilepsy, *Epilepsy Behav*. 2001; 2:481-489.
17. Perucca E, Pharmacological and therapeutic properties of valproate, *CNS drugs*. 2002; 16: 695-714.
18. Jalilifar M, Yadollahpour A, Moazedi A.A, Ghotbeddin Z. Low Frequency electrical stimulation either prior to or after rapid kindling stimulation inhibits the kindling-induced epileptogenesis, *Biomed Res Int*. 2017; 2017.
19. Racine R, Rose P, Burnham W, Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus, *Can J Neurol Sci*. 1977; 4: 273-278.
20. Charghan S, Eshagh Harooni H, Moazedi A, Khaje-Pour L, Interaction of zinc chloride with an aromatase inhibitor (letrozole) on anxiety in adult male rats, *Arak Medical University Journal (AMUJ)*. 2016; 19:34-45.
21. Angrini M, Leslie J, Shephard R, Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior, *Pharmacol Biochem Behav*. 1998; 59: 387-397.
22. Kalynchuk L, Pinel J, Treit D, Kippin T. Long-term kindling and interictal emotionality in rats: effect of stimulation site, *Brain Res*. 1998; 41: 149-157.
23. Hannesson D, Howland J, Pollock M, Mohapel P, Wallace A, Corcoran M, Dorsal hippocampal kindling produces a selective

- and enduring disruption of hippocampally mediated behavior, *Jnsi*. 2001; 21: 4443-4450.
24. Shang-Der Chen, Yu-Lin Wang, Sheng-Fu Liang, Fu-Zen Shaw, Rapid amygdala kindling causes motor seizure and comorbidity of anxiety and depression-like behaviors in rats, *Front Behav Neurosci*. 2016; 10: 129.
 25. Helfer V, Deransart C, Marescaux, Depaulis A, Amygdala kindling in the rats: Anxiogenic-like consequences, *Neurosci*. 1996; 73: 971-978.
 26. Godlevsky L, Muratova T, Kresyun N, Luijtelaar E, Coenen M, Anxiolytic and antidepressive effects of electric stimulation of the paleocerebellar cortex in pentylenetetrazol kindled rats, *Acta Neurobiol Exp*. 2014; 74: 456-464.
 27. Perucca E, Pharmacological and therapeutic properties of valproate, *CNS drugs*. 2002; 16:695-714.
 28. Sharma AK, Reams RY, Jordan WH, Miller MA, Thacker HL, Snyder PW, Mesial temporal lobe epilepsy: Pathogenesis, induced rodent models and lesions, *Toxicol Pathol*. 2007; 35: 984-998.
 29. Kalynchuk L, Pearson D, Pinel J, Meaney M, Effect of amygdala kindling on emotional behavior and benzodiazepine receptor binding in rats, *ANAS877*. 1999; 737-741.
 30. Buteme J, the role of valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, in reducing anxiety levels in rats: an epigenetics study, 2015. Honors College Theses.

Archive of SID

ORIGINAL RESEARCH

Evaluation the Efficacy of Sodium Valproate and Low Frequency Stimulation During CA1 Hippocampal Kindling on Anxiety Like Behavior in Adult Male Rat

Raha Zalkhani¹, Ahmad Ali Moazedi^{1*}, Zohreh Ghotbeddin², Mahdi Pourmahdi Borujeni³

1. Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

2. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

3. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history:

Received: 24 January 2018

Accepted: 29 May 2018

Published online: 23 July 2018

Keywords:

Sodium valproate

Low frequency stimulation

Kindling

Anxiety

* Corresponding Author:

Ahmad Ali Moazedi; Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Tel: +98 916 308 0198

Fax:

Email: moazedi.a@gmail.com

ABSTRACT

Background and Aim: Emotional disorders are prevalent in many epileptic patients. So, in this research we have studied the efficacy of two treatment of seizure on anxiety like behavior during kindling in adult male rat.

Materials and Methods: 42 male rats were randomly divided to 6 groups: Control, Sham operation, saline-kindled and drug-kindled groups which have received saline or drug 15 minutes before kindling stimulations, and saline-kindled-LFS or drug-kindled-LFS group which have received saline or drug 15 minutes before kindling stimulations and LFS applied after termination of kindling stimulations. Anxiety like behavior was assessed on the 6th day by using elevated plus maze and open field apparatus.

Findings: kindling significantly increased open arms (OAs) entries percentage, OAs exploration percentage, increasing jumping from elevated plus maze ($p < 0.001$) and rearing frequency in open field apparatus ($p < 0.05$) compare to the sham group. Sodium valproate increased OAs entries percentage and OAs exploration percentage in drug-kindled group compare to sham group ($p < 0.001$). But there wasn't any significant difference in jumping from elevated plus maze and rearing in open field compare to sham group. Also, there was no significant change in these parameters in Saline-kindled-LFS, drug-kindled and drug-kindled-LFS groups.

Conclusion: These findings show that sodium valproate and LFS decrease anxiety induced by kindling stimulation.

© Copyright (2018) Arak University of Medical Sciences

Cite this article as:

Zalkhani R., Moazedi A.A., Ghotbeddin Z., et al. Evaluation the Efficacy of Sodium Valproate and Low Frequency Stimulation During CA1 Hippocampal Kindling on Anxiety Like Behavior in Adult Male Rat. J Arak Uni Med Sci. 2018; 21(4): 6-17.