

The effect of parameters of low-frequency electrical stimulation on piriform-cortex kindled seizures in rat

Parviz Ghorbani Moghadam, Mohammad Mohammad-Zadeh,
Javad Mirnajafi-Zadeh*, Yaghoub Fathollahi

Dept. Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Abstract

Introduction: Electrical low-frequency stimulation (LFS) has antiepileptic effect, but the role of different stimulation parameters on this effect has not been determined. In this study the effect of different LFS parameters (intensity, pulse duration and train duration) on piriform-cortex kindled seizures was investigated.

Methods: Seizure was produced in animals using kindling model of epilepsy. Then, the effect of LFS on seizure severity was investigated.

Results: Different patterns of LFS (1 Hz) applied immediately before kindling stimulation in fully kindled animals, had no significant effect on seizure parameters. In the second experiment, effect of LFS (1 Hz) on inter-seizure interval was investigated. Data showed that daily stimulation of animals for 15 min with LFS for one week after the last kindling stimulation reduced significantly stage 5 seizure duration. Application of the same LFS protocols for three days and two weeks had no significant effect on seizure parameters. In the third experiment, effect of LFS (1 Hz) on kindling rate was investigated. Results showed that when LFS was delivered daily after each kindling stimulation it could decrease afterdischarge duration in various days during kindling and delayed the appearance of seizure stages 1 and 2 significantly.

Conclusion: It may be concluded that LFS has antiepileptic effects on kindling acquisition and inter-seizure interval in kindled animals and that the characteristics of LFS protocol (intensity, pulse duration and train duration) have an essential role on these effects.

Keywords: Low-frequency stimulation, Epilepsy, Kindling, Piriform cortex.

* Corresponding Author Email: mirnajaf@modares.ac.ir

تأثیر کمیت‌های تحریک الکتریکی با فرکانس پایین بر تشنج‌های ناشی از کیندلینگ قشر پیریفورم

پرویز قربانی مقدم، محمد محمد زاده، سید جواد میر نجفی زاده*، یعقوب فتح الهی
دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

دریافت: خرداد ۸۵ بازبینی: مهر ۸۵ پذیرش: آذر ۸۵

چکیده

هدف: تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (Low-frequency stimulation: LFS) دارای اثرات ضد صرعی می‌باشد، اما نقش الگوهای مختلف تحریک در ایجاد این اثرات به خوبی مشخص نشده است. در این تحقیق نقش کمیت‌های مختلف LFS (شدت، مدت پالس و مدت تحریک) بر تشنج‌های ناشی از کیندلینگ قشر پیریفورم مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: با استفاده از مدل صرعی کیندلینگ تشنج در حیوانات ایجاد شد و تأثیر الگوهای مختلف LFS بر شدت تشنجهای ارزیابی گردید.

یافته‌ها: اعمال الگوهای مختلف LFS (با فرکانس یک هرتز) بلافاصله قبل از تحریک کیندلینگ در حیوانات کیندل تأثیری معنی داری بر کمیت‌های تشنج نداشت. در آزمایش دوم، تأثیر اعمال LFS (با فرکانس یک هرتز) در فاصله بین دو تشنج بر شدت تشنج دوم بررسی شد. نتایج نشان داد تحریک روزانه حیوانات (۱۵ دقیقه در هر روز) بوسیله LFS به مدت یک هفته پس از آخرین تحریک کیندلینگ باعث کاهش معنی دار مدت زمان مرحله پنج در تشنج دوم می‌گردد. استفاده از همین الگوهای LFS به مدت سه روز و دو هفته تأثیر معنی داری بر کمیت‌های تشنج نداشت. در آزمایش سوم، اثر LFS (با فرکانس یک هرتز) بر روند اکتساب کیندلینگ بررسی شد. نتایج حاصله نشان داد که اگر LFS روزانه بعد از هر تحریک کیندلینگ اعمال شود سبب کاهش معنی دار مدت امواج تخلیه متعاقب در روزهای مختلف حین کیندلینگ می‌گردد و باعث تأخیر در ظهور مراحل یک و دو تشنج شدند.

نتیجه گیری: LFS دارای اثرات ضد صرعی در روند اکتساب کیندلینگ و در فاصله بین دو تشنج در حیوانات کیندل می‌باشد و خصوصیات الگوی LFS (شدت، مدت پالس و مدت تحریک) نقشی اساسی در اعمال اثرات آن دارد.

کلمات کلیدی: تحریک با فرکانس پایین، صرع، کیندلینگ، قشر پیریفورم.

مقدمه

گیجگاهی است [۱۸]. و بهترین مدل آزمایشگاهی برای ایجاد

این نوع صرع، کیندلینگ الکتریکی است. [۱۴].

در حدود ۲۵ درصد بیماران صرعی علیرغم دارو-درمانی، تشنجهای قابل کنترل نمی‌باشد [۴]. درمان جراحی نیز تنها در صورت تک کانونی بودن صرع قابل استفاده است و عوارض

صرع یک اختلال عصبی شایع با میزان شیوع حدود یک

درصد است [۱۵]. شایعترین نوع صرع در بالغین، صرع لوب

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبات:

mirnajaf@modares.ac.ir

با توجه به اینکه هنوز اثرات LFS بر صرع و تشنجهای ناشی از مدل صرعی کیندلینگ به درستی مشخص نشده است، و با توجه به اهمیت قشر پیریفورم در صرع زایی [۱۳]، در این تحقیق اثر اعمال LFS در قشر پیریفورم بر کیندلینگ این ناحیه مورد بررسی قرار گرفت. بعلاوه، تأثیر تغییر برخی کمیت‌های LFS از قبیل مدت زمان پالس، شدت و مدت تحریک نیز بر اثر بخشی آن بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جراحی حیوانات

در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر نژاد Wistar با محدوده وزنی ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم استفاده شد. برای بیهوشی، کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۲۰ mg/kg) به صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شدند. حیوان بیهوش در دستگاه استریوتاکس (Narishige, Japan) قرار داده شده و پس از مشخص شدن برگما، بر اساس اطلس Paxinos و Watson [۱۶] مختصات قشر پیریفورم ($L = \pm 4 \text{ mm}$, $A_p = +0.2 \text{ mm}$) و $V = 7/6 \text{ mm}$ نسبت به پرده سخت شامه) که محل قرارگیری الکتروده سه قطبی (برای تحریک و ثبت) بود بر روی سطح استخوان جمجمه به دقت تعیین و سپس با مته دستی آن نقطه سوراخ می‌گردید. دو الکتروده تک قطبی نیز بوسیله پیچ‌های متصل به آنها به سطح جمجمه محکم می‌شدند. همچنین دو پیچ عینک در دو نقطه دیگر از سطح جمجمه متصل می‌گردید. در پایان کار گذاری الکترودها، بین‌های متصل به آنها داخل مادگی سوکت مخابراتی قرار داده می‌شد و سوکت توسط سیمان دندانپزشکی به روی سر حیوان متصل می‌گردید.

ایجاد کیندلینگ

برای ایجاد موج تحریکی از دستگاه استیمولاتو (Nihon Kohden, ساخت آمریکا) و ایزولاتور و واحد ثابت کننده جریان (Nihon Kohden, SS-202J, ساخت آمریکا) استفاده

غیرقابل برگشتی را به دنبال دارد. لذا در سالیان اخیر تحریک الکتریکی مغز به عنوان یک درمان کمکی و گاهی اصلی در بیماران صرعی مقاوم به درمان مورد توجه قرار گرفته است [۲۰].

استفاده از تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (LFS: Low-frequency stimulation) به صورت موج مربعی ۰/۱ میلی ثانیه‌ای و به مدت ۱۵ دقیقه در *in vitro* باعث ایجاد تضعیف طولانی مدت (Long-term depression: LTD) در سیناپس می‌شود [۳]. با توجه به مطرح بودن تضعیف طولانی مدت به عنوان یکی از مکانیسم‌های عمل LFS، عمدتاً از این الگو برای بررسی اثرات ضد صرعی LFS در مطالعات آزمایشگاهی و انسانی استفاده شده است. تحریک کانون‌های تشنجی قشر گیجگاهی در بیماران صرعی توسط LFS باعث کاهش امواج نیزه‌ای بین حمله‌ای می‌شود [۲۶، ۱۰]. نشان داده شده است که اعمال LFS در آمیگدال روند اکتساب کیندلینگ این ناحیه را کند کرده و باعث تعویق در ظهور مراحل تشنج کیندلینگ می‌گردد [۲۵، ۲۳، ۱۱]. به علاوه آستانه تشنج افزایش [۱۳، ۷] و مدت زمان امواج تخلیه متعاقب کاهش می‌یابد و میزان وقوع مرحله پنج تشنج کاهش می‌یابد [۹].

اعمال LFS در قشر پیریفورم (قشر بویایی اولیه) نیز سبب تأخیر در روند کیندلینگ آمیگدال می‌شود [۲۷]. قشر پیریفورم به دلیل ارتباطات عصبی با نواحی مختلف مغزی دخیل در ایجاد صرع (سیستم لیمبیک) می‌تواند در ایجاد و گسترش صرع لوب گیجگاهی نقش داشته باشد [۱۳].

اثرات LFS همیشه مهاری نمی‌باشد بلکه اثرات تحریکی آن نیز گزارش شده است. به عنوان مثال اعمال LFS با شدت‌های بالا در کانون‌های صرعی قشر مغز اثرات تشنج‌زا داشته است [۲۶]. همچنین با LFS می‌توان در حیوانات آزمایشگاهی کیندلینگ ایجاد کرد [۲، ۱]. علاوه بر این نشان داده شده که اعمال LFS در هسته مرکزی - میانی تالاموس سبب ایجاد حملات تشنجی Absence می‌شود [۲۴، ۲۲]. بنابراین، در رابطه با اثرات LFS گزارشهای متفاوتی وجود دارد و به تحقیقات زیادی برای دستیابی به نقش دقیق LFS بر حملات تشنجی نیاز است.

آزمایش ۲- اثر LFS بر دوره‌های مهاری پس از تشنج‌های کیندلینگ قشر پیریفورم: در این آزمایش، حیوانات کیندل ابتدا با شدت آستانه تخلیه متعاقب تحریک می‌شدند. سپس به مدت چندین روز، هر ۲۴ ساعت یک بار، فقط الگوهای مختلف LFS با فرکانس یک هرتز به آنها اعمال می‌شد. ۲۴ ساعت پس از آخرین LFS حیوانات مجدداً با شدت آستانه تخلیه متعاقب تحریک می‌شدند و کمیت‌های تشنجی آنها ثبت می‌گردید. در این آزمایش الگوهای مختلف LFS (با شدت و مدت زمان پالس متفاوت) به مدت سه روز، یک هفته و دو هفته مورد بررسی قرار گرفت. در هر گروه داده‌های بدست آمده با داده‌های حاصل از گروهی که LFS دریافت نکرده بودند مقایسه گردید.

آزمایش ۳- اثر LFS بر روند کیندلینگ قشر پیریفورم: در این آزمایش پس از تعیین آستانه تخلیه متعاقب، LFS با فرکانس یک هرتز و به مدت ۱۵ دقیقه روزانه بلافاصله بعد از تحریک کیندلینگ به حیوانات داده شد و اثر شدت تحریک و مدت زمان پالس بررسی گردید. داده‌های حاصل از این گروه‌ها با داده‌های گروهی که در طی روند کیندلینگ LFS به آن اعمال نشده بود مقایسه شدند. تعداد حیوانات در تمام گروه‌ها ۶ سر بود.

تأیید بافت شناسی

در پایان هر آزمایش جهت اطمینان از قرار داشتن الکترود در محل مورد نظر، پس از پرفیوژن با سرم فیزیولوژیک و فرمالدئید ۱۰ درصد، مغز حیوانات خارج و برش‌گیری می‌شد. نمونه‌هایی که الکترود در قشر پیریفورم قرار نداشت از نتایج حذف می‌گردید. همچنین برای اطمینان از عدم آسیب بافتی ناشی از LFS، رنگ آمیزی نیسل انجام شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری

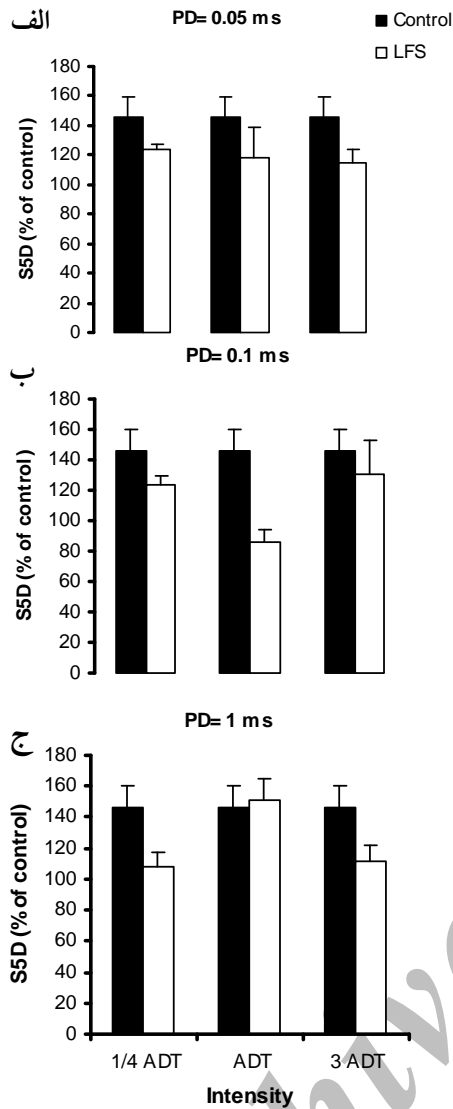
در آزمایش اول برای مقایسه تأثیر LFS بر کمیت‌های تشنج از آزمون t - زوجها استفاده شده است. در آزمایش دوم برای مقایسه اثر هر یک از کمیت‌های LFS (شدت، مدت زمان پالس و مدت تحریک) بر کمیت‌های تشنج در گروه‌های آزمایش

گردید. تحریک کیندلینگ به صورت موج مربعی تک فازی با مدت پالس ۱ میلی ثانیه، فرکانس ۶۰ هرتز و به مدت ۲ ثانیه بود.

حداقل یک هفته بعد از جراحی، از شدت آستانه به منظور تحریک دادن استفاده می‌گردید. برای تعیین شدت آستانه از حداقل شدت جریان الکتریکی که قادر به ایجاد امواج تخلیه متعاقب (حداقل به مدت ۵ ثانیه) می‌باشد، استفاده می‌شد. پس از آن حیوان با شدت جریان آستانه هر ۲۴ ساعت یکبار تحریک می‌شد تا کیندل شود. کمیت‌هایی مورد اندازه‌گیری در این تحقیق عبارت بودند از: (۱) مدت امواج تخلیه متعاقب (Afterdischarge duration; ADD): برای تعیین آن زمان بین شروع تحریک تا پایان امواج تخلیه متعاقب در نظر گرفته می‌شد؛ (۲) مدت زمان تأخیری بین تحریک تا شروع مرحله ۴ تشنج (Stage 4 latency; S₄L) که از زمان تحریک تا شروع مرحله ۴ تشنج در نظر گرفته می‌شد؛ (۳) مدت زمان مرحله ۵ تشنج (Stage 5 duration; S₅D) که فاصله زمانی بین شروع و خاتمه مرحله پنج تشنج بود و (۴) مدت زمان امواج تخلیه متعاقب تجمعی (Cumulative ADD) که با جمع مدت تمام امواج تخلیه متعاقب ثبت شده پس از هر تحریک از روز اول تا ظهور مرحله پنج تشنج در حیوان محاسبه می‌گردد.

گروه‌های آزمایشی

آزمایش ۱- اثر LFS قبل از تحریک کیندلینگ بر شدت تشنج‌های ناشی از کیندلینگ قشر پیریفورم: در این آزمایش پس از اینکه حیوانات سه بار مرحله ۵ تشنج را نشان دادند و بطور کامل کیندل شدند، الگوهای مختلف LFS با فرکانس یک هرتز بلافاصله قبل از تحریک کیندلینگ اعمال می‌شد. در این آزمایش اثر شدت تحریک، مدت زمان اعمال تحریک و مدت زمان پالس بررسی گردید. در تمامی گروه‌ها، داده‌های بدست آمده با داده‌های قبل از اعمال LFS در همان حیوانات (به عنوان داده‌های کنترل) مقایسه شدند.

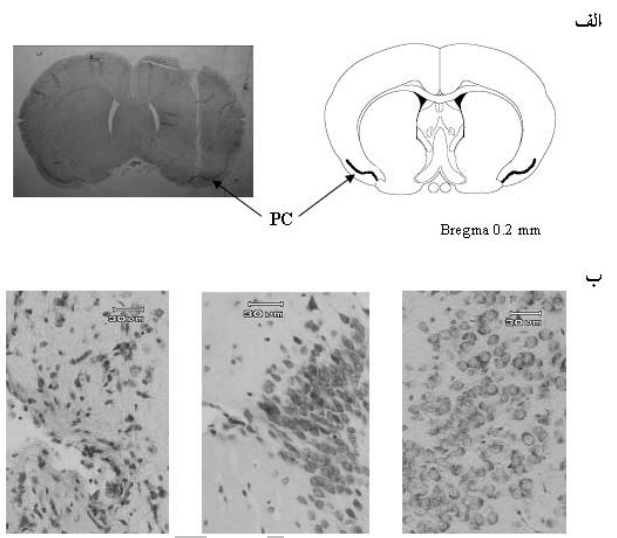


شکل ۲- اثر الگوهای مختلف LFS (به مدت یک هفته) بر مرحله پنج تشنج در فاصله بین دو تشنج. الف- LFS با مدت پالس ۰/۰۵ میلی ثانیه در شدت‌های مختلف، ب- LFS با مدت پالس ۰/۱ میلی ثانیه در شدت‌های مختلف، ج- LFS با مدت پالس ۱ میلی ثانیه در شدت‌های مختلف. مقادیر به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین و بر حسب درصد است. * نشان دهنده $P < 0.05$ و ** نشان دهنده $P < 0.01$ است. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ سر است. PD = مدت زمان پالس و ADT = آستانه امواج تخلیه متعاقب.

نمی‌کند، در حالی که LFS با مدت پالس ۱۰ میلی ثانیه سبب آسیب نورونی در محل تحریک می‌گردد (شکل ۱).

نتایج آزمایش ۱

الف- بررسی اثر شدت تحریک: در گروه اول تا سوم، LFS با مدت زمان پالس ۰/۱ میلی ثانیه و به مدت ۱۵ دقیقه با

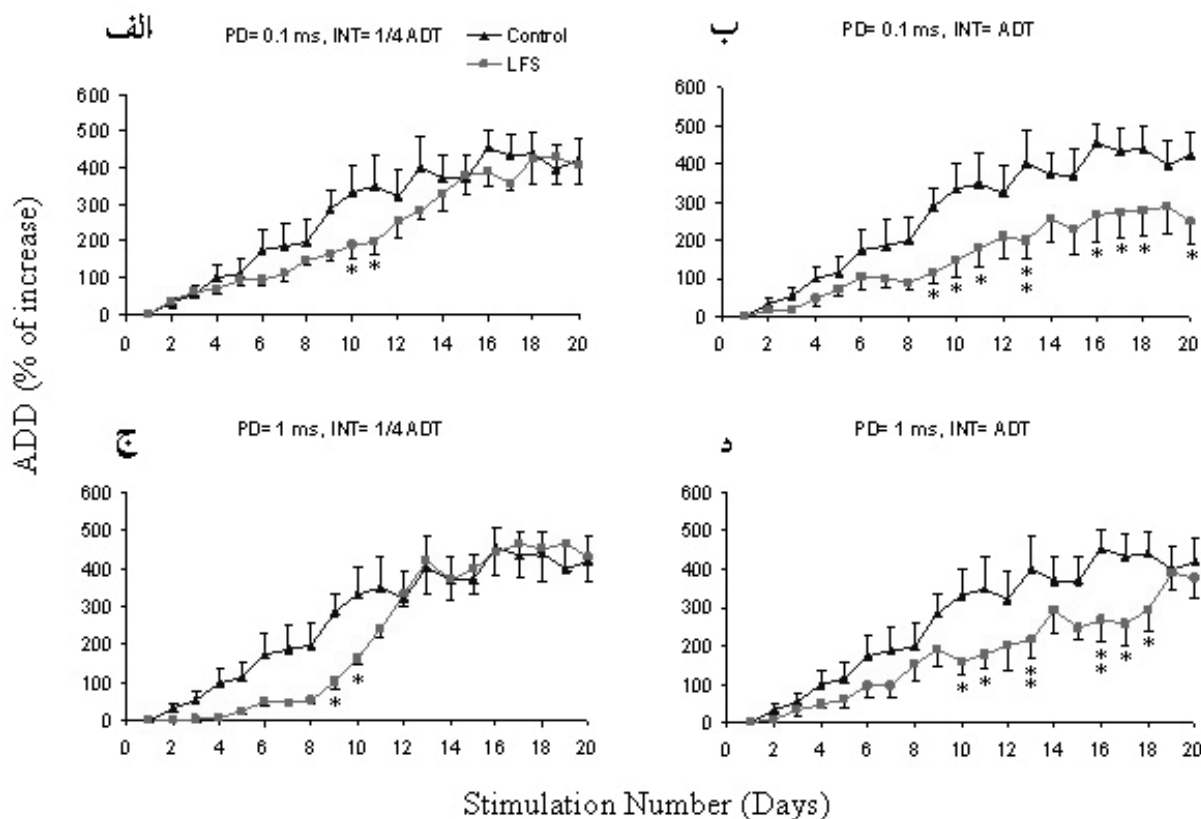


شکل ۱- الف- نمای شماتیک از قشر پیریفورم از اطلس پاكسينوس- واتسون بر اساس محل کار گذاری الکتروود (سمت راست) و برش کرونال از مغز موش صحرایی که در آن مسیر الکتروود و قشر پیریفورم قابل مشاهده است (سمت چپ). ب- برش بافتی قشر پیریفورم در گروه کنترل (بدون دریافت تحریک الکتریکی، سمت راست)، گروه LFS با مدت پالس ۱ میلی ثانیه با شدت برابر آستانه امواج تخلیه متعاقب (وسط) و گروه LFS با مدت پالس ۱۰ میلی ثانیه با شدت برابر آستانه تخلیه متعاقب که فقط یک نوبت در حیوانات کیندل داده شد (سمت چپ). همانگونه که در شکل مشاهده می‌شود به دنبال تحریک با مدت پالس ۱۰ میلی ثانیه تخریب بافتی دیده می‌شود. PC = قشر پیریفورم.

نسبت به گروه‌های کنترل از آزمون t- غیر زوج‌ها استفاده شده است. در آزمایش سوم برای بررسی تأثیر LFS بر درصد افزایش مدت امواج تخلیه متعاقب در طی روند کیندلینگ در هر یک از گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (آزمون LSD) و برای بررسی تأثیر LFS بر مدت امواج تخلیه متعاقب تجمعی و تعداد تحریکات لازم برای ظهور مراحل یک تا پنج تشنج در گروه‌های آزمایش نسبت به گروه کنترل از آزمون t- غیر زوج‌ها استفاده شده است.

یافته‌ها

بررسی‌های بافت شناسی نشان داد که LFS با مدت پالس ۱ میلی ثانیه هیچگونه آسیب نورونی در محل تحریک ایجاد



Stimulation Number (Days)

قبل (فقط تحریک کیندلینگ دریافت کرده بودند) از طریق آزمون t -زوجها مقایسه شد. نتایج نشان داد که کوتاه شدن مدت LFS نیز تأثیر معنی داری بر کمیت‌های تشنجی نداشته است.

ج- بررسی اثر مدت زمان پالس تحریک: در گروه‌های پنجم و ششم LFS با شدت برابر آستانه تخلیه متعاقب، به مدت یک دقیقه و با مدت پالس‌های ۱ میلی ثانیه (گروه پنجم) و ۱۰ میلی ثانیه (گروه ششم) اعمال شد. مقایسه داده‌های کنترل و آزمایش در گروه پنجم از طریق آزمون t -زوجها تفاوت معنی داری را نشان ندادند. ولی در گروه ششم که LFS با مدت پالس ۱۰ میلی ثانیه داده شد مدت S5D بطور معنی داری نسبت به داده‌های کنترل کاهش یافت ($P < 0.05$). مطالعات بافت شناسی آسیب نورونی ناشی از الگوی LFS با مدت پالس ۱۰ میلی ثانیه را نشان داد (شکل ۱). بنابراین کاهش مدت مرحله پنج تشنج می‌تواند به دلیل آسیب نورونی باشد و نه یک اثر واقعی از LFS. در این بخش از آزمایش چون احتمال آسیب بافتی به دنبال استفاده از پالس‌های تحریکی به مدت ۱۰ میلی

شکل ۳- اثر چهار LFS بر درصد افزایش مدت امواج تخلیه متعاقب (ADD) در طی تحریکات روزانه برای ایجاد کیندلینگ (الف). LFS با مدت پالس ۰/۱ میلی ثانیه با شدت یک چهارم؛ (ب) LFS به مدت پالس ۰/۱ و شدت برابر آستانه امواج تخلیه متعاقب؛ (ج) LFS با مدت پالس ۱ میلی ثانیه با شدت یک چهارم و (د) LFS با مدت پالس ۱ میلی ثانیه و شدت برابر آستانه امواج تخلیه متعاقب. تغییرات ADD بر حسب درصد افزایش نسبت به روز اول می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین است. آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (آزمون LSD) تفاوت معنی داری را بین دو گروه نشان داد. * نشان دهنده $P < 0.05$ است. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ سر است. PD = مدت زمان پالس، INT = شدت تحریک.

شدت‌های یک چهارم (گروه اول)، برابر (گروه دوم) و سه برابر (گروه سوم) شدت تخلیه متعاقب داده شد. پس از اتمام LFS کمیت‌های تشنجی اندازه‌گیری و توسط آزمون t -زوجها با داده‌های کنترل مقایسه شدند. نتایج نشان داد الگوهای مختلف LFS تأثیر معنی داری بر کمیت‌های تشنجی ندارد.

ب- بررسی اثر مدت تحریک: در گروه چهارم مشخصات تحریک مشابه گروه دوم ولی مدت تحریک ۱ دقیقه بود. مقادیر کمیت‌های تشنجی اندازه‌گیری شده با مقادیر بدست آمده از روز

تأثیر معنی داری بر کمیت‌های تشنجی داشت، بنابراین، از پالس‌های با مدت زمان کوتاهتر (۰/۰۵ میلی ثانیه) نیز استفاده گردید.

در گروه اول تا سوم LFS با مدت زمان پالس ۰/۰۵ میلی ثانیه در شدت‌های یک چهارم (گروه اول)، برابر (گروه دوم) و سه برابر (گروه سوم) داده شد. آزمون t- غیر زوج‌ها نشان داد که این الگوهای تحریکی تأثیر معنی داری بر کمیت‌های تشنجی ندارند (شکل ۲ الف).

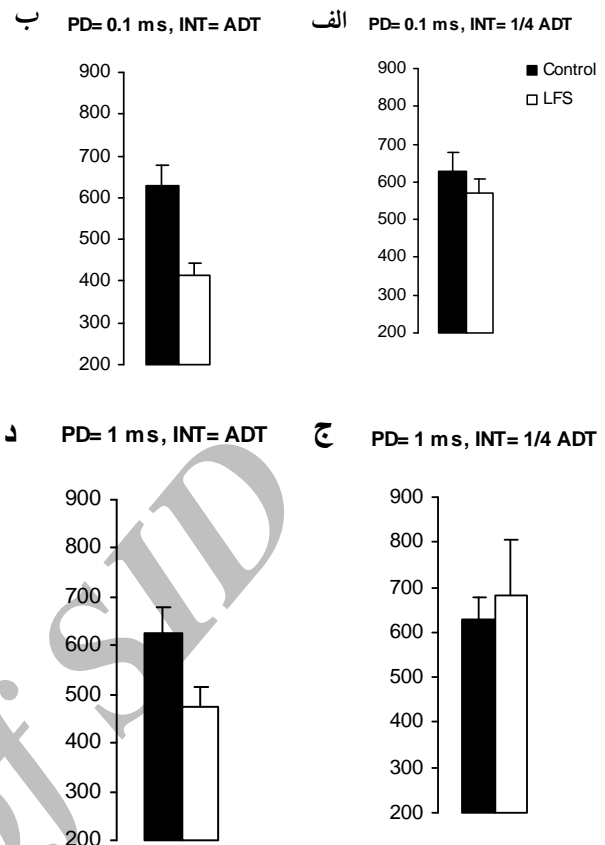
در گروه چهارم تا ششم LFS با مدت پالس ۰/۱ میلی ثانیه در شدت‌های یک چهارم (گروه چهارم)، برابر (گروه پنجم) و سه برابر (گروه ششم) داده شد. الگوی تحریکی گروه پنجم (با مدت پالس ۰/۱ میلی ثانیه و شدت برابر آستانه تخلیه متعاقب) S5D را بطور معنی داری کاهش داد ($P < 0.01$) (شکل ۲-ب) و بر سایر کمیت‌های تشنجی تأثیر معنی داری نداشت.

در گروه هفتم تا نهم LFS با مدت پالس ۱ میلی ثانیه در شدت‌های یک چهارم (گروه هفتم)، برابر (گروه هشتم) و سه برابر (گروه نهم) داده شد. الگوی تحریکی گروه هفتم (مدت پالس ۱ میلی ثانیه و شدت یک چهارم آستانه) باعث کاهش معنی دار S5D گردید ($P < 0.05$) (شکل ۲-ج) و بر سایر کمیت‌های تشنجی تأثیر معنی داری نداشت.

با توجه به تأثیر معنی دار دو الگوی تحریکی در گروه پنجم و هفتم بر S5D، این دو الگو به مدت ۳ روز و ۲ هفته در گروه‌های بعدی اعمال شد تا تأثیر تعداد روزهای تحریک بر نتایج بررسی شود.

ب- بررسی اثر LFS به مدت سه روز: در گروه دهم LFS مشابه گروه پنجم (مدت پالس ۰/۱ میلی ثانیه و شدت برابر آستانه تخلیه متعاقب) و در گروه یازدهم LFS مشابه گروه هفتم (مدت پالس ۱ میلی ثانیه و شدت یک چهارم آستانه تخلیه متعاقب) به مدت سه روز داده شد. الگوهای تحریکی اعمال شده به این دو گروه در مقایسه با گروه کنترل تأثیر معنی داری بر کمیت‌های تشنجی نداشتند.

ج- بررسی اثر LFS به مدت دو هفته: در گروه دوازدهم LFS مشابه گروه پنجم (مدت پالس ۰/۱ میلی ثانیه و شدت



شکل ۴- اثر LFS (با مدت پالس ۰/۱ میلی ثانیه در شدت‌های یک چهارم و برابر آستانه امواج تخلیه متعاقب) بر مدت امواج تخلیه متعاقب جمعی (Cumulative ADD) که تا پایان روز بیستم محاسبه شده است. مقادیر ADD به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین و برحسب ثانیه می باشد. ** نشان دهنده $P < 0.01$ است. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ سر است. ADT= آستانه امواج تخلیه متعاقب، INT= شدت تحریک.

ثانیه بسیار زیاد بود، لذا فقط از مدت زمان تحریک یک دقیقه استفاده شد و از زمان ۱۵ دقیقه استفاده نگردید.

نتایج آزمایش ۲

الف- بررسی اثر LFS به مدت یک هفته: حیوانات ۲۴ ساعت پس از آخرین تحریک کیندلینگ، به مدت یک هفته و فقط روزانه یک نوبت تحریک LFS دریافت می کردند. LFS با شدت‌های یک چهارم، برابر و سه برابر آستانه تخلیه متعاقب و در مدت پالس‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۱ میلی ثانیه اعمال شد. در این آزمایش، چون بر خلاف آزمایش ۱، مدت پالس ۰/۱ میلی ثانیه

معنی داری بر مدت امواج تخلیه متعاقب تجمعی که تا پایان روز بیستم محاسبه شده بود، گردید ($P < 0.05$) (شکل ۴-د). هیچ یک از دو الگو تأثیر معنی داری بر سرعت ظهور مراحل تشنج نداشتند.

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد اعمال LFS در روند ایجاد کیندلینگ باعث کند شدن این روند شده و اعمال LFS در فاصله بین دو تشنج باعث کاهش شدت تشنج دوم می‌شود. این مطالعه در راستای برخی مطالعات قبلی است که اثرات ضد صرعی LFS را در مدل کیندلینگ نشان داده‌اند [۲۷، ۲۵، ۲۳، ۱۳، ۱۱، ۹، ۷]. همچنین مطالعات بالینی بسیار محدودی نیز، اثرات ضد تشنجی LFS را در انسان گزارش کرده‌اند [۲۶، ۲۰، ۱۷، ۱۰].

مطالعات نشان داده است بین قدرت مهارى LFS و مدت اعمال آن یک ارتباط مستقیم وجود دارد. McIntyre و همکارانش به دنبال اعمال LFS بصورت موج سینوسی افزایش آستانه امواج تخلیه متعاقب را مشاهده کردند [۱۳]. Gaito نشان داده است که هر چه مدت اعمال LFS بصورت موج سینوسی افزایش یابد (از مدت‌های ۵ تا ۶۰۰ ثانیه) اثرات مهارى آن قویتر می‌شود [۸]. همچنین در یک مطالعه *in vitro* نشان داده شد که هر چه تعداد پالس LFS قبل از تحریک تتانیک بیشتر باشد، اثر مهارى آن بر القاء LTP قویتر است [۶]. اما در تحقیق ما LFS با مدت پالس ۰/۱ بلافاصله قبل از تحریک کیندلینگ با مدت‌های ۱ و ۱۵ دقیقه داده شد که هیچ یک از دو الگو، بر کمیت‌های تشنجی تأثیر معنی داری نداشتند. لذا ممکن است LFS به مدت ۱۵ دقیقه بلافاصله قبل از تحریک کیندلینگ در حیوانات کیندل که مدارهای صرعی در آنها کاملاً تقویت شده است، کافی نباشد و زمانی بیش از ۱۵ دقیقه نیاز باشد. از طرف دیگر Goodman و همکارانش با اعمال LFS کوتاه مدت سینوسی (۳۰ ثانیه) روزانه بلافاصله قبل از تحریک کیندلینگ تا ۲۰ روز پس از کیندل شدن حیوانات، درصد وقوع

تحریک برابر آستانه تخلیه متعاقب) و در گروه سیزدهم LFS مشابه گروه هفتم (مدت پالس ۱ میلی ثانیه و شدت تحریک یک چهارم آستانه تخلیه متعاقب) به مدت ۲ هفته داده شد. مقایسه داده‌های دو گروه آزمایش با گروه کنترل از طریق آزمون t - غیر زوج‌ها نشان داد LFS تأثیر معنی داری بر کمیت‌های تشنجی ندارد.

نتایج آزمایش ۳

الف- بررسی اثر شدت‌های مختلف LFS با مدت پالس ۰/۱ میلی ثانیه بر روند کیندلینگ: در دو گروه آزمایشی، پس از تحریک کیندلینگ، LFS با مدت پالس ۰/۱ میلی ثانیه و با دو شدت یک چهارم (گروه اول) و برابر (گروه دوم) آستانه امواج تخلیه متعاقب به حیوانات داده شد. مقایسه درصد افزایش مدت امواج تخلیه متعاقب بین هر یک از گروه‌های LFS و گروه کنترل بر اساس آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (LSD) تفاوت معنی داری را نشان داد (شکل ۳ الف و ب). الگوی LFS در گروه اول تأثیری معنی داری بر مدت امواج تخلیه متعاقب تجمعی و سرعت ظهور مراحل تشنج که تا پایان روز بیستم محاسبه شده بود، نداشت (شکل ۴-الف). اما در گروه دوم مدت امواج تخلیه متعاقب تجمعی را بطور معنی دار کاهش داد ($P < 0.01$) (شکل ۴-ب). همچنین این الگوی LFS تعداد تحریکات مورد نیاز برای ظهور مراحل اول و دوم تشنج را نسبت به گروه کنترل بطور معنی داری افزایش داد ($P < 0.05$) ولی بر سرعت ظهور مراحل سوم تا پنجم تشنج تأثیری نداشت.

ب- بررسی اثر شدت‌های مختلف LFS با مدت پالس ۱ میلی ثانیه بر روند کیندلینگ: در دو گروه آزمایشی دیگر LFS با مدت پالس ۱ میلی ثانیه و با دو شدت یک چهارم (گروه سوم) و برابر (گروه چهارم) آستانه امواج تخلیه متعاقب به حیوانات داده شد. مقایسه درصد افزایش مدت امواج تخلیه متعاقب بر اساس آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (LSD) تفاوت معنی داری را در بین هر یک از دو گروه LFS نسبت به گروه کنترل نشان داد (شکل ۳-ج و د). الگوی LFS در گروه چهارم (مدت پالس ۱ میلی ثانیه و شدت برابر آستانه تخلیه متعاقب) باعث کاهش

مهارى، اثرات تحريكى دارد [۲۶]. همچنين مطالعات قبلى اثرات مهارى LFS را در شدت‌هاى پايين (۵۰ يا ۱۰۰ ميكروآمپر) گزارش کرده‌اند [۱۳،۹].

اگر بين دو تحريك تشنج زا در مدل كيندلینگ به مدتی طولانى (مثلا چند روز) تحريكى به حيوان اعمال نشود، سيستم‌هاى مهارى فعال نشده و شدت تشنج در پاسخ به تحريك دوم افزايش می‌يابد. در اين تحقيق الگوهاى مختلف LFS روزانه و به مدت يك هفته در فاصله بين دو تشنج اعمال شد. الگوهاى LFS با مدت پالس ۰/۱ و ۱ میلی ثانیه (روزانه ۱۵ دقیقه و به مدت يك هفته) باعث کاهش مدت زمان مرحله پنچ تشنج گردید و بر ساير کمیت‌هاى تشنجى تأثيرى نداشت. اثر ضد تشنجى LFS در فاصله بين دو تشنج تأييد کننده مطالعه Weiss و همکارانش در اين زمينه است [۲۵].

در اين تحقيق اثر LFS بر روند اكتساب كيندلینگ نيز بررسى شد. الگوهاى LFS روزانه با مدت پالس‌هاى ۰/۱ و ۱ میلی ثانیه در شدت‌هاى يك چهارم و برابر آستانه تخليه متعاقب بلافاصله بعد از تحريك كيندلینگ به مدت ۱۵ دقیقه اعمال شدند. همه الگوهاى LFS باعث کاهش مدت زمان تخليه متعاقب در گروه‌هاى LFS نسبت به کنترل شدند كه اين اثر تأييد کننده نتايج مطالعات قبلى [۲۳،۲۵،۲۷] است. اين تحقيق نشان داد LFS با مدت پالس ۱ میلی ثانیه هم اثرات مهارى بر روند كيندلینگ دارد كه در مطالعات بافت شناسى تخریب نورونى ناشى از اعمال اين الگوى LFS مشاهده نشد. اين تحقيق نشان داد كه اعمال LFS به قشر پيريفورم در طى روند كيندلینگ، مانع ظهور مراحل تشنج نمی‌شود، در حالیکه در مطالعات قبلى (LFS در روند اكتساب كيندلینگ آمیگدال) LFS از بروز تشنج‌هاى عمومى (مراحل ۴ و ۵ تشنج) و نه تشنج‌هاى موضعی (مراحل ۱ تا ۳)، جلوگیری کرده است [۱۱،۲۳،۲۵،۲۷]. با وجود اينکه الگوهاى تحريكى LFS در اين مطالعه با الگوهاى تحريكى مورد استفاده در مطالعات قبلى مشابه بودند، مشاهده اين تفاوت‌ها در نتايج اهميت محل اعمال LFS (برای بروز اثرات ضد تشنجى) را نشان می‌دهد.

تشنج‌هاى مرحله پنچ را از ۹۸ درصد به ۷۰ درصد کاهش دادند [۹]. بنا بر اين بر خلاف مطالعه حاضر، تحقيق McIntyre و همکاران [۱۳] و Goodman و همکاران [۹] ثابت کردند كه اعمال LFS در مدت‌هاى خيلى کوتاه (۳۰ ثانيه) می‌تواند اثرات ضد تشنجى داشته باشد. عدم مشاهده اثرات مهارى در مطالعه حاضر نسبت به کارهاى ذکر شده [۱۳،۹] می‌تواند به دليل تفاوت در شکل موج تحريكى مورد استفاده باشد. در تحقيق ما از LFS با موج مربعى به جاي سينوسى استفاده شد. اعتقاد بر اين است كه تحريك بصورت موج سينوسى باعث می‌شود تا بار الكتریکى بيشترى در كانون تحريك نسبت به موج مربعى اعمال گردد [۹]. همچنين عدم مشاهده اثرات مهارى LFS در حيوانات كيندل در تحقيق ما بر خلاف تحقيق Goodman، می‌تواند مربوط به تعداد دفعات اعمال LFS باشد. در تحقيق ما تعداد دفعات اعمال LFS به جاي ۲۰ بار در روز، فقط يك نوبت داده شد [۱۳،۹].

وقتی الگوهاى LFS با مدت پالس‌هاى ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی ثانیه بلافاصله قبل از تحريك كيندلینگ در حيوانات كيندل داده شد فقط الگوى LFS با مدت پالس ۱۰ میلی ثانیه سبب کاهش مدت زمان مرحله پنچ تشنج در همان روز شد. مطالعات بافت شناسى تخریب نورونى به دنبال اعمال اين الگوى LFS را نشان داد. در همين راستا مشاهده شده است كه اعمال فقط يك نوبت LFS با مدت پالس بالا (۱۲۵ میلی ثانیه) باعث افزايش آستانه امواج تخليه متعاقب در كيندلینگ آمیگدال و هيپوكمپ می‌شود [۲۱]. البته در اين مطالعه به آسیب بافتى احتمالى ناشى از اين الگوى تحريكى اشاره‌اى نشده است ولى با توجه به مشاهدات تحقيق ما مبنى بر تخریب نورونى ناشى از الگوى LFS با مدت پالس ۱۰ میلی ثانیه، اين اثر نيز بايد ناشى از تخریب نورونى باشد.

در تحقيق ما، الگوهاى LFS با شدت‌هاى سه برابر آستانه تخليه متعاقب بلافاصله قبل از تحريك كيندلینگ، تأثير معنی داری بر کمیت‌هاى تشنجى نداشت و به نظر نمی‌رسد افزايش شدت، اثرات مهارى LFS را قويتر کند. در اين رابطه گزارش شده است كه اعمال LFS در شدت‌هاى بالا بجای اثرات

- hippocampus and N-methy-D-aspartate receptor blockade. *Proc Nat Acad Sci*, 1992; 89: 4363-4367.
- [4] Durand DM, Bikson M, Suppression and control of epileptiform activity by electrical stimulation: a review. *Proc IEEE*, 2001; 89: 1065-1082.
- [5] Fuji S, Kuroda Y, Ito K, Yoshioka M, Kaneko K, Yamazaki Y, Sasaki H, Kato H, 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: 121-124.
- [6] Fujii S, Kuroda Y, Miura M, Furuse H, Sasahi H, Kaneko K, Ito K, Chen Z, Kato H, The long-term suppression effect of prior activation of synaptic input by low-frequency stimulation on induction of long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Exp Brain Res*, 1996; 111: 305-312.
- [7] Gaito J, The effect of low-frequency and direct current stimulation on the kindling phenomenon in rats. *Can J Neurol Sci*, 1981; 8(31): 249-253.
- [8] Gaito J, The effect of variable duration one hertz interference on kindling. *Can. Neurol. Sci.*, 1980; 7: 59-64.
- [9] Goodman JH, Berger RE, Tchong TK, Preemptive low-frequency stimulation decreases the incidence of amygdala-kindled seizures. *Epilepsia*, 2005; 46: 1-7.
- [10] Kinoshita M, Ikeda A, Matsumoto R, Begum T, Usui K, Yamamoto J, Matsuhashi M, Takayama M, Mikuni N, Takahashi J, Miyamoto S, Shibasaki H, Electric stimulation on human cortex suppresses fast cortical activity and epileptic spikes. *Epilepsia*, 2004; 45: 78-791.
- [11] Lopez- Meraz ML, Neri- Bazan L, Rocha L, Low-frequency stimulation modifies receptor binding in rat brain. *Epilepsy Res*, 2004; 59: 95-105.
- [12] Loscher W, Ebert U, The role of the piriform cortex in kindling. *Prog. Neurobiol.*, 1996; 50: 421-481.
- مکانیسم‌های مختلفی می‌تواند مسئول ایجاد اثرات LFS باشد. با توجه به اثرات مهاري LFS بر LTP، و احتمال وقوع LTP در حین کیندلینگ [۵]، ممکن است LFS با کاهش پاسخدهی سیناپسی مدارهای صرعی از طریق مکانیسم‌هایی از قبیل LTD و تضعیف پس از تقویت سبب مهار تشنج شود [۲۷،۲۵،۲۳].
- بنابراین می‌توان نتیجه گرفت کمیت‌های LFS نقش تعیین کننده‌ای در بروز اثرات ضد تشنجی و ضد صرعی آن دارد. الگوهای مهاري LFS در روند اکتساب کیندلینگ (Development) و به دنبال تثبیت آن (Kindled state) الزاماً یکسان نمی‌باشند. اثرات مهاري LFS بر روند اکتساب کیندلینگ و در فاصله بین دو تشنج دیده می‌شود و اعمال آن بلافاصله قبل از تحریک کیندلینگ در حیوانات کیندل، اثر مهاري بر شدت تشنج‌ها ندارد. اعمال LFS در کانون تشنج می‌تواند اثرات ضد تشنجی داشته باشد و ظاهراً میزان پاسخدهی هر ناحیه مغزی به LFS بستگی به خصوصیات آن ناحیه و نوع ارتباطات عصبی آن با ساختمان‌های دیگر مغزی دخیل در صرع دارد. استفاده بالینی از LFS به عنوان یک روش درمانی در بیماران صرعی نیازمند دستیابی به بهترین الگوهای LFS برای مهار تشنج است که آن هم بدون شناخت هر چه بهتر مکانیسم‌های عمل LFS ممکن نیست.

منابع

- [1] Armitage LL, Mohapel P, Jenkins EM, Hannesson DK, Corcoran ME, Dissociation between mossy fiber sprouting and rapid kindling with low-frequency stimulation of amygdale. *Brain Res*, 1998; 781: 37-44.
- [2] Cain DP, Corcoran ME, Kindling with low-frequency stimulation: generality, transfer, and recruiting effects. *Exp Neurol*, 1981; 73: 219-32.
- [3] Dudec SM, Bear MF, Homosynaptic long-term depression in area CA1 of

- [22] Velasco M, Velasco F, Velasco AL, Brito F, Jimenes F, Marquez I, Rojas B, Electrocortical and behavioral responses produced by acute electrical stimulation of the human centromedian thalamic nucleus. *Electrode Clin Neurophys*, 1996; 102: 461-471.
- [23] Velisek L, Veliskova J, Stanton PK, Low-frequency stimulation of the kindling focus delay basolateral amygdala kindling in immature rats. *Neurosci Lett*, 2002; 326: 61-63.
- [24] 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.
- [25] Weiss SRB, Li X, Rosen J, Li H, Heynen T, Post RM, Quenching: Inhibition of development and expression of amygdala kindled seizures with low-frequency stimulation. *Neuroreport*, 1995; 6: 2171-2176.
- [26] Yamamoto J, Ikeda A, Satow T, Takeshita K, Takayama M, Matsuhashi M, Matsumoto R, Ohara S, Mikuni N, Takahashi J, Miyamoto S, Taki W, Hashimoto N, Rothwell JC, Shibasaki H, Low-frequency electric cortical stimulation has an inhibitory effect on epileptic focus in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 2002; 43: 491-5.
- [27] Yang LX, Jin CL, Zhu-Ge ZB, Wang S, Wei EQ, Bruce IC, Chen Z., Unilateral low-frequency stimulation of central piriform cortex delays seizure development induced by amygdaloid kindling in rats. *Neuroscience*, 2006; 138:1089-96.
- [13] McIntyre DC, Gilby K, Carrington CA, Effect of low-frequency stimulation on amygdala-kindled afterdischarge thresholds and seizure profile in fast and slow kindling rat strains. *Epilepsia*, 2002; 43: 12-17.
- [14] McNamara JO, Byrne MC, Dasheiff RM, Fitz JG, The kindling model of epilepsy: a review. *Prog Neurobiol*, 1980; 15: 139-157.
- [15] McNamara JO, Emerging insight into the genesis of epilepsy. *Nature*, 1999; 399: A15-A22.
- [16] Paxinos G, Watson C, *The rat Brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York, 1986.
- [17] Schrader LM, Stern JM, Wilson CL, Fields TA, Salamon N, Nuwer MR, Vespa PM, Fried I, Low-frequency electrical stimulation through subdural electrodes in a case of refractory status epilepticus. *Clin Neurophysiol*, 2006; 117: 781-8.
- [18] Sloviter RS, The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information not enough knowledge. *C R Biol*, 2005; 328: 143-153.
- [19] Theodore WH, Fisher RS, Brain stimulation for epilepsy. *Lancet Neurol.*, 2004; 3: 111-118.
- [20] Tkeshelshvili D, Zaveri H, Spencer SS, Spencer DD, Cavus I, Effect of 1 Hz intracranial stimulation on interictal spiking and EEG power in humans. *Epilepsia*, 2003; 44: 2206.
- [21] Ullal GR, Ninchoji T, Uemura K, Low-frequency stimulation induces an increase in after-discharge thresholds in hippocampal and amygdaloid kindling. *Epilepsy Res*, 1989; 3: 232-235.