

بررسی نقش سرین - ترئونین پروتئین فسفاتازها طی اثرات مهارى تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین بر بروز تشنج ناشی از کیندلینگ مسیر پرفورنت

تاریخ دریافت مقاله : ۸۷/۴/۱

مهدی صادق^{*}، دکتر سید جواد میر نجفی زاده^{**}

تاریخ پذیرش مقاله : ۸۷/۱۲/۱۰

* مربی مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان و دانشگاه علوم پزشکی زابل، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی
 ** دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان و دانشگاه تربیت مدرس دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

چکیده

زمینه و هدف: امروزه تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (LFS) به عنوان یکی از درمانهای صرع در حیوانات آزمایشگاهی و بیماران مبتلا به صرع مورد استفاده قرار می گیرد. در مطالعه حاضر نقش سرین-ترئونین پروتئین فسفاتازها طی اثرات مهارى LFS بر بروز تشنجهای ناشی از کیندلینگ مسیر پرفورنت مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار: در این مطالعه آزمایشگاهی از ۶۴ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد Wistar جهت بررسی تحریک مسیر پرفورنت با استفاده از پروتکل کیندلینگ سریع (۶ تحریک روزانه) استفاده شد. LFS (فرکانس ۱ هرتز) بلافاصله پس از قطع تحریکات کیندلینگ اعمال می گردید. FK506 (۱ میکرومولار به صورت تزریق داخل بطنی) به عنوان مهار کننده سرین-ترئونین فسفاتاز نوع PP2B و Okadaic acid (۱ میکرومولار به صورت تزریق داخل بطنی) به عنوان مهار کننده سرین-ترئونین فسفاتاز نوع PP1/2A هر روز ۱۰ دقیقه قبل از شروع پروتکل تحریک به داخل بطن چپ تزریق می شد. تفاوت آماری در میزان تخلیه های متعاقب روزانه بین گروههای آزمایشی با استفاده از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس محاسبه گردید و برای مقایسه وقوع مراحل پنج گانه تشنج از آزمون غیرپارامتریک Kruskal-Wallis و آزمون Mann-Whitney استفاده شد. $P < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها: اعمال LFS بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ به طور معناداری بروز تشنجات کیندلینگ و مراحل مختلف تشنجات کیندلینگ را به تاخیر انداخت. به علاوه LFS مجموع تخلیه های متعاقب طی روزهای تحریک را به طور معناداری کاهش داد. ($P < 0.001$) تزریق هیچ کدام از FK506 و یا Okadaic acid به داخل بطن چپ تاثیر معناداری بر اثرات مهارى LFS روی پارامترهای تشنجی نداشت. **نتیجه گیری:** نتایج به دست آمده نشان می دهد که فعال شدن سرین-ترئونین فسفاتازها (PP1/2A, PP2B) (که نقش اساسی در تضعیف قدرت سیناپسی ایجاد شده توسط LFS را دارند) هیچ نقشی در اثرات مهارى LFS بر تشنجات ناشی از کیندلینگ مسیر پرفورنت ندارند.

(مجله طبیب شرق، دوره ۱۱، شماره ۱، بهار ۱۳۸۸، ص ۱ تا ۱۱)

کلیدواژه ها: تشنج، صرع، تحریک با فرکانس پایین، کیندلینگ

مقدمه

درمانی جدیدی برای بیماران صرعی مقاوم به دارو مورد استفاده قرار گرفته است.^(۵-۷) با توجه به نتایج بررسی های انجام شده، اعمال تحریکات LFS در فواصل بین تحریکات کیندلینگ سبب تاخیر معناداری در بروز تشنجات کیندلینگ مسیر پرفورنت می شود.^(۸) به علاوه نشان داده شده که LFS افزایش

استفاده از تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (1-3Hz) یا LFS^۱ که در محیط in vitro باعث ایجاد تضعیف طولانی مدت LTD^۲ و تقویت زدایی (Depotentiation) می شود^(۴-۱) در چند سال اخیر به دلیل اثر بر نواحی خاص مغز به عنوان روش

1 Low-frequency Stimulation
 2 Long-term Depression

تزریق داخل بطنی (icv) قبل از شروع پروتکل تحریک استفاده گردید.

روش کار

در این مطالعه آزمایشگاهی ۶۴ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar با وزن ۲۷۰-۳۰۰ گرم (خریداری شده از انیستیتو پاستور کرج) مورد استفاده قرار گرفت.

حیوانات در حیوان خانه در شرایط دسترسی آزاد به آب و غذا، و ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در قفس های انفرادی نگهداری می شدند تمام مراحل آزمایش طبق پروتکل "روشهای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی" به گونه ای پیش رفت که حیوانات آزمایشی کمترین رنج را ببرند و مصرف نمونه ها در کمترین تعداد باشد.^(۱۸) برای از بین بردن اثرات ناشی از ریتم های شبانه روزی، آزمایش ها هر روز در فاصله ساعت ۸ صبح تا ۱۴ عصر انجام می شد.

کلیه آزمایش ها در پائیز ۸۶ در محل آزمایشگاه کیندلینگ مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان انجام می شد. بیهوشی توسط تزریق داخل صفاقی سدیم پنتوباریتال (۵۰ mg/kg) انجام می گرفت. پس از بیهوش کردن، حیوان درون دستگاه استرنوتاکسی قرار می گرفت و با استفاده از اطلس Paxinos و Watson^(۱۹) موقعیت مسیر پرفورنت (۶/۹ میلی متر عقب تر و ۴/۱ به سمت راست نسبت به برگما و ۳/۳ به سمت پایین نسبت به سطح استخوان جمجمه) و ژيروس دنداندار (۳/۶ میلی متر عقبتر و ۱/۸ میلی متر به سمت راست نسبت به برگما و ۳/۱ میلی متر به سمت پایین نسبت به سطح استخوان جمجمه) در سطح جمجمه علامت گذاری می شد. سپس با استفاده از مته دندانپزشکی، جمجمه در آن نقطه سوراخ شده، یک الکتروود دو قطبی در مسیر پرفورنت و یک الکتروود تک قطبی در ژيروس دنداندار قرار داده می شد همچنین به منظور تزریق روزانه دارو یک کانول ۲۳ G داخل بطن چپ (۰/۹ میلی متر عقبتر و ۱/۲ میلی متر به سمت راست نسبت به برگما و ۳/۲ به سمت پایین

ایجاد شده در تضعیف جفت پالسها (Paired-pulse depression) طی بروز تشنجات کیندلینگ را مهار می کند،^(۹) بنابراین شاید بتوان گفت که اثرات ضد تشنجی LFS در مسیر پرفورنت می تواند ناشی از کاهش یا مهار انتقال سیناپسی در ژيروس دنداندار باشد. تقویت طولانی مدت^(۲) (LTP)، LTD و تقویت زدایی از بهترین شکلهای شکل پذیری سیناپسی در هیپوکمپ و ژيروس دنداندار هستند.^(۱۰،۱۱) نشان داده شده که القاء LTP نیازمند فعال شدن پروتئین کینازها است^(۱۲) در حالی که تضعیف سیناپسی (LTD و تقویت زدایی) نیازمند فعال شدن پروتئین فسفاتازها (PPs) نظیر PP2B (کلسی نورین) و PP1/2A است.^(۱۳،۱۴) همچنین پیشنهاد شده که تعادل فعالیت پروتئین کینازها و پروتئین فسفاتازها کنترل کننده قدرت سیناپسی است.^(۱۵) مطالعات فارماکولوژیک نشان داده اند که هر دو فرایند LTD و تقویت زدایی نیازمند فعال شدن پروتئین فسفاتازها هستند^(۱۶) به علاوه بررسی ژنتیکی پیشنهاد می کند که پروتئین فسفاتازها این کار را از طریق مهار فعالیت پروتئین کینازهای ضروری در القاء LTP انجام می دهند.^(۱۷)

LFS با مشخصات مشابهی در هر دو پدیده تضعیف قدرت سیناپسی و مهار تشنجات استفاده می شود^(۲-۴،۷) اما روشن نیست که این اثرات LFS در پاسخ به این سوال که از طریق مکانیسمهای داخل سلولی مشابه انجام می شوند یا هر کدام مسیر داخل سلولی مجزایی دارند. در این تحقیق در ادامه مطالعات قبلی برای شناخت مکانیسمهای درون سلولی اثرات ضد تشنجی LFS در پاسخ به این سوال که آیا اثرات LFS در مهار بروز تشنجات کیندلینگ مسیر پرفورنت به واسطه همان مکانیسمهایی است که سبب القاء تضعیف سیناپسی می شود یا مکانیسمهای متفاوتی دخیل هستند؟ از FK506 به عنوان مهار کننده PP2B و از Okadaic acid به عنوان مهار کننده PP1/2A به صورت

نسبت به سطح استخوان جمجمه) قرار داده می شد. دو الکتروود تک قطبی نیز به عنوان Earth و Differential توسط پیچ بر روی جمجمه قرار می گرفت. پس از بستن پیچ های لنگرگاه، حیوان برای ثبت به قفسه فارادی انتقال می یافت. با استفاده از استیمولاتور، تحریک الکتریکی با شدت ۴۰۰ تا ۸۰۰ میکروآمپر از طریق الکتروود تحریک به مسیر پرفورنت اعمال می گردید. در صورت قرار داشتن الکتروودهای ثبت و تحریک در محل مناسب، پتانسیل تحریکی پس سیناپسی تجمعی (pEPSP)^۴ توسط نرم افزار ثبت می گردید. در غیر این صورت الکتروودهای تحریک و ثبت آنقدر تغییر داده می شد تا pEPSP با حداکثر دامنه ثبت شود. سپس با سیمان دندانپزشکی الکتروودها و پیچ روی جمجمه حیوان ثابت می شدند. پس از پایان کارگذاری الکتروودها و کانولها، پین های متصل به الکتروودها وارد مادگی سوکت مخابراتی شده و سوکت به وسیله سیمان دندانپزشکی روی سطح جمجمه متصل می گردید. در پایان جراحی یک سر سوزن ۳۰G به طول مناسب بریده شده و در داخل کانول قرار می گرفت تا از انسداد آن جلوگیری کند.

هفت تا ده روز پس از جراحی، از شدت آستانه برای تحریک حیوانات استفاده شد. برای به دست آوردن شدت آستانه، ابتدا حیوان توسط جریانی به شدت ۳۰ میکروآمپر تحریک می گردید. در صورتی که امواج تخلیه متعاقب (حداقل به مدت ۱۰ ثانیه) ثبت می شدند، این شدت جریان به عنوان شدت جریان آستانه شناخته می شد. در غیر این صورت، با فواصل ۵ دقیقه ای شدت جریان هر بار ۱۰ میکروآمپر بیشتر می شد تا آستانه تحریک به دست آید. سپس حیوانات با شدت جریان آستانه تحریک می شدند تا مراحل مختلف تشنج را نشان دهند. این مراحل رفتاری عبارتند از^(۲۰): ۱- حرکات دهان و صورت ۲- حرکت سر به بالا و پایین ۳- کلونوس اندام جلویی طرف مقابل نسبت به محل تحریک ۴- کلونوس اندام های 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 می شد^(۸،۹) 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 می شدند. هر حیوان در هر روز ۶ بار (با فواصل ۱۰ دقیقه) توسط این امواج تحریک می شد. در گروهی از حیوانات که تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین (LFS) دریافت می کردند بلافاصله بعد از اتمام تحریکات کیندلینگ، LFS به مدت ۵۹۵ ثانیه در تمام فواصل بین تحریکات کیندلینگ به حیوان اعمال می شد و اثر آن بر کمیت های تشنجی بررسی می گردید. 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 گروه هایی که LFS دریافت نمی کردند در تمام فواصل بین تحریکات سوکت روی سر حیوان قرار داشت. کمیت های تشنجی اندازه گیری شده عبارت بودند از: ۱- مدت زمان تخلیه های متعاقب روزانه یا Daily ADD^۵ (مجموع تخلیه های متعاقب ناشی از ۶ تحریک روزانه) و ۲- تعداد روزهای لازم برای رسیدن به هر یک از مراحل پنجگانه تشنجی

در این تحقیق از FK506 (شرکت Fluka) به عنوان مهار کننده PP2B و Okadaic acid (شرکت Sigma-Aldrich) به عنوان مهار کننده PP1/2A استفاده شد. FK506 و Okadaic acid هر کدام با دوز ۱ میکرومولار به کار برده شدند.^(۲۱،۲۲) از DMSO به عنوان 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 شد. همچنین از DMSO که pH آن تنظیم شده بود، به عنوان محلول شاهد استفاده شد. برای تزریق دارو به داخل بطن چپ، از لوله پلی اتیلنی PE-20 (شرکت

Stoelting، آمریکا) که یک سر آن به سرسوزن ۳۰ G و سر دیگر آن به سرنگ هاملتون ۱۰ میکرولیتر متصل بود، استفاده گردید. قبل از تزریق دارو، لوله و سرسوزن با DMSO استریل شستشو داده می‌شدند. سپس سرنگ هاملتون در محل مخصوص روی پمپ تزریق (Microsyring Pump شرکت Stoelting، آمریکا) قرار می‌گرفت و ۰/۵ میکرولیتر دارو با سرعت ۰/۵ $\mu\text{l}/5 \text{ min}$ به حیوان تزریق می‌شد سپس حیوان برای اجرای پروتکل تحریک به قفس فارادی انتقال می‌یافت. در آزمایش اول برای بررسی و تایید اثرات مهاری LFS بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت سه گروه آزمایشی و در هر گروه پنج سر مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه اول حیوانات فقط تحریکات با فرکانس ۱هرتز (Hz) دریافت می‌کردند. در گروه دوم حیوانات فقط تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند (Kindled) و در گروه سوم حیوانات در فواصل بین تحریکات کیندلینگ، تحریکات با فرکانس ۱هرتز دریافت می‌کردند (Kindled+LFS).

در آزمایش دوم برای بررسی نقش سرین-ترئونین فسفاتاز طی این اثرات مهاری LFS، شش گروه آزمایشی مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه اول (Kindled+DMSO) هر روز ابتدا DMSO به داخل بطن چپ تزریق می‌شد و سپس حیوانات در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می‌گرفتند. در گروه دوم (Kindled+LFS+DMSO) هر روز ابتدا DMSO به داخل بطن چپ تزریق می‌شد و سپس حیوانات تحریکات کیندلینگ به همراه LFS دریافت می‌کردند. در گروه سوم (Kindled+FK506) هر روز ابتدا FK506 با دوز ۱ میکرومولار (μM) به داخل بطن چپ تزریق می‌شد و سپس حیوانات در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می‌گرفتند. در گروه چهارم (Kindled+LFS+FK506) هر روز ابتدا FK506 با دوز ۱ میکرومولار به داخل بطن چپ تزریق می‌شد سپس حیوانات تحریکات کیندلینگ به همراه LFS دریافت می‌کردند. در گروه پنجم (Kindled+Okadaic acid) هر

روز ابتدا Okadaic acid با دوز ۱ میکرومولار به داخل بطن چپ تزریق می‌شد و سپس حیوانات در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می‌گرفتند. در گروه ششم (Kindled+LFS+Okadaic acid) هر روز ابتدا Okadaic acid (با دوز ۱ μM) تزریق می‌شد و سپس حیوانات تحریکات کیندلینگ به همراه LFS دریافت می‌کردند. تعداد حیوانات در هر گروه حداقل ۶ سر بود. داده‌ها به صورت (Mean \pm S.E.M) ارائه شده‌اند. برای اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها از آزمون Kolmogrove-Smirnov استفاده شد. تفاوت آماری در میزان تخلیه‌های متعاقب روزانه طی روند تشنج زایی بین گروه‌های آزمایشی با استفاده از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس از نوع Repeated Measures و به دنبال آن آزمون LSD محاسبه گردید. تخلیه‌های متعاقب روزانه از جمع تخلیه‌های متعاقب ناشی از ۶ تحریک روزانه به دست آمد. برای مقایسه وقوع مراحل پنج‌گانه تشنجی بین گروه‌های آزمایشی نیز از آزمون غیرپارامتریک Kruskal-Wallis و آزمون Mann-Whitney استفاده شد. همه آزمون‌ها به صورت دو طرفه (Two tailed) انجام شد و $P < 0/05$ به عنوان حداقل سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

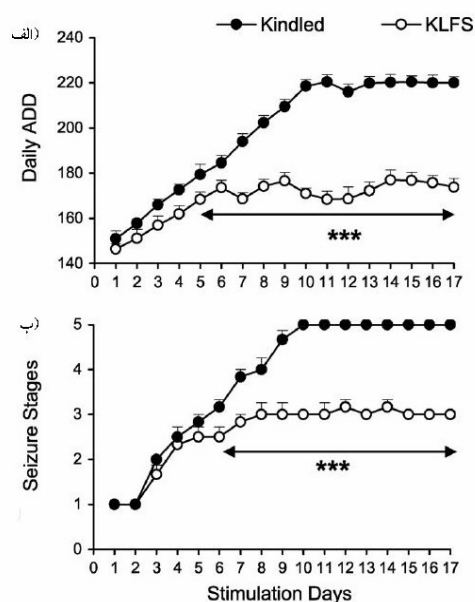
یافته‌ها

میانگین تخلیه‌های متعاقب روزانه (ADD) پس از اولین تحریک در گروهی که فقط تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند (Kindled) $17/53 \pm 0/34$ ثانیه و در گروهی که حیوانات در فواصل بین تحریکات کیندلینگ، تحریکات با فرکانس پایین نیز دریافت می‌کردند (Kindled+LFS) $16/83 \pm 0/79$ ثانیه بود که از نظر آماری تفاوت معناداری نداشتند. به علاوه، میانگین شدت تحریکات آستانه برای شروع تخلیه‌های متعاقب در این گروه‌ها نیز تفاوت معناداری را با هم نشان نداد که بیانگر این است که حیوانات دو گروه تفاوت معناداری در استعداد ابتلا به تشنج نداشتند.

تزریق هیچ کدام از دو داروی FK506 و Okadaic acid با دوز ۱ میکرومولار به داخل بطن چپ تغییرات معناداری در کمیت تشنج گروهی که هر روز به دنبال تزریق دارو در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می گرفتند نسبت به گروه "Kindled+DMSO" (که هر روز به دنبال تزریق DMSO در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می گرفتند) ایجاد نکرد. تزریق دارو در گروهی که هر روز به دنبال تزریق دارو در فواصل بین تحریکات کیندلینگ، LFS دریافت می کردند تغییرات معناداری در کمیت های تشنجی نسبت به گروه "Kindled+LFS+DMSO" ایجاد نکرد. استفاده از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس از نوع Repeated Measures و به دنبال آن آزمون LSD نشان داد که تزریق دوز ۱ میکرومولار FK506 قبل از پروتکل تحریک، تغییر معناداری در مجموع تخلیه متعاقب روزانه در گروه "Kindled+LFS+FK506" نسبت به گروه "Kindled+LFS+DMSO" ایجاد نمی کند (شکل ۲- الف). به علاوه استفاده از آزمون غیرپارامتریک Kruskal-Wallis نشان داد که تزریق FK506 در گروه "Kindled+LFS+FK506" تغییر معناداری در اثرات کاهشی LFS بر تعداد روزهای لازم برای رسیدن به مراحل ۳ تا ۵ رفتاری تشنج نسبت به گروه "Kindled+LFS+DMSO" ایجاد نمی کند (شکل ۱- ب).

تزریق Okadaic acid با دوز ۱ میکرومولار نیز تغییرات معناداری در کمیت های تشنجی گروه "Kindled+Okadaic acid" نسبت به گروه "Kindled+DMSO" ایجاد نکرد. تزریق Okadaic acid در گروهی که در فواصل بین تحریکات کیندلینگ، LFS دریافت می کردند تغییرات معناداری در کمیت های تشنجی (مجموع تخلیه های متعاقب روزانه و تعداد روزهای لازم برای رسیدن به مراحل رفتاری تشنج) نسبت به گروه "Kindled+LFS+DMSO" ایجاد نکرد (شکل ۲)

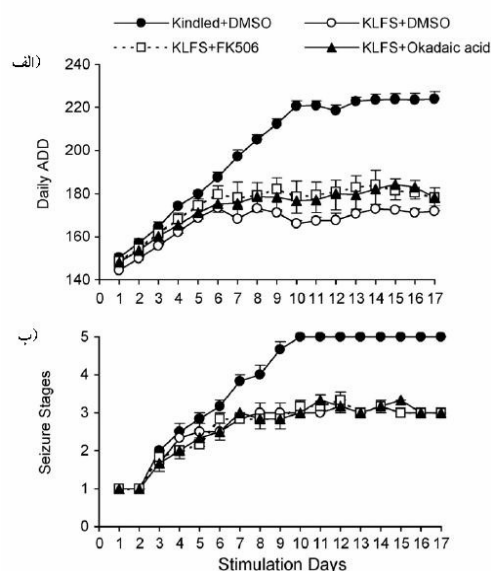
آزمون تجزیه و تحلیل واریانس از نوع Repeated Measures و به دنبال آن آزمون LSD^۶ نشان داد که تحریک الکتریکی مسیر پرفورنت توسط LFS در فواصل بین تحریکات کیندلینگ در گروه (Kindled+LFS) کاهش معناداری در مجموع تخلیه های متعاقب روزانه نسبت به گروه (Kindled) ایجاد می کند ($P < 0.001$) (شکل ۱- الف؛ برای محاسبه مدت زمان تخلیه های متعاقب روزانه، ADD های به دست آمده پس از ۶ تحریک روزانه با هم جمع شده اند). استفاده از آزمون غیرپارامتریک Mann-Whitney کاهش معناداری را در بروز مراحل رفتاری ۳، ۴ و ۵ تشنجی در گروه (Kindled+LFS) نسبت به گروه (Kindled) نشان داد ($P < 0.001$). به طوری که بالاترین مرحله تشنجی بعد از ۱۷ روز در این گروه 3.1 ± 0.1 بود. تعداد روزهای تحریکی لازم برای رسیدن به این مراحل نیز افزایش یافت در حالی که در تعداد روزهای تحریکی لازم برای رسیدن به مراحل ۱ تا ۲ تغییر معناداری ایجاد نشد (شکل ۱- ب).



شکل ۱. تاثیر LFS بر مدت زمان تخلیه های متعاقب روزانه و مراحل رفتاری

تشنج: الف) از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس از نوع Repeated Measures و سپس آزمون تکمیلی LSD استفاده شد. ب) از آزمون غیرپارامتریک Mann-Whitney جهت تجزیه و تحلیل داده ها استفاده شد. خطوط زیر نمودارها نشان دهنده مناطقی است که تغییرات معنادار بوده اند. در هر دو نمودار اعداد نشان دهنده $Mean \pm S.E.M$ می باشند ($n = 5$).

لازم برای رسیدن به مراحل ۴ و ۵ تشنج را به صورت معناداری افزایش می دهد (شکل ۱- ب). مراحل پنج گانه تشنجات کیندلینگ را می توان به دو دوره تقسیم کرد: دوره کانونی شدن تشنجات (Focal seizure) که شامل مراحل ۱ تا ۳ می شود و دوره عمومی شدن تشنجات (Generalized seizure) که شامل مراحل ۴ و ۵ است،^(۲۶) با توجه به این نتایج شاید بتوان گفت که نقش اصلی LFS مهار مرحله گذر از تشنجات کانونی به تشنجات عمومی است. در این مطالعه نیز مشابه مطالعات قبلی اعمال LFS به تنهایی تغییرات معناداری در علائم رفتاری و ثبتهای الکتریکی حیوانات غیرصرعی ایجاد نکرد. در مطالعه حاضر تخلیه های متعاقب حاصل از ۶ تحریک روزانه با هم جمع شده و به عنوان مقادیر Daily Afterdischarge Duration استفاده شدند (شکلهای ۱- الف و ۲- الف). به هر حال تحلیل داده های حاصل از روز آستانه گیری (After discharge Threshold) و همچنین بررسی مدت زمان تخلیه های متعاقب به دنبال اولین تحریک در گروههای مختلف اختلاف معناداری را بین گروههای آزمایشی نشان نداد که بیانگر آن است که حیوانات در گروههای آزمایشی از نظر استعداد ابتلا به تشنج یکسان بودند. با وجود اینکه استفاده از LFS امروزه وارد مراحل آزمایش کلینیکی شده است^(۲۷،۲۸) مکانیسم دقیق اثرات آن هنوز نامشخص است. بررسی ها نشان داده که LFS می تواند سبب تغییر غلظت بعضی از نورومودولاتورها و نوروترانسمیترها در مغز شود. به عنوان مثال، اعمال LFS در برش های زنده هیپوکمپ باعث آزاد شدن آدنوزین می گردد.^(۲) همچنین گزارش شده که اعمال LFS به صورت طولانی مدت، تغییراتی را در میزان اتصال به گیرنده های بنزودیازپینی و اپیوئیدی μ ایجاد می کند.^(۲۹) مطالعه قبلی ما اهمیت سیستم گالانترژیک زیرس دنداندار را طی اثرات مهاری LFS بر کیندلینگ مسیر پرفورنت نشان داد.^(۸) احتمال دارد که LFS از طریق ایجاد تغییراتی مشابه آنچه ذکر شد، در نهایت سبب تقویت سیستمهای مهاری شود. در این تحقیق LFS با مدت پالس ۱ میلی ثانیه و



شکل ۲. تاثیر تزریق داخل بطنی FK506 و Okadaic acid طی اثرات مهاری LFS بر مدت زمان تخلیه های متعاقب روزانه و مراحل رفتاری تشنج. الف) از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس از نوع Repeated Measures و سپس آزمون تکمیلی LSD استفاده شد. ب) از آزمون غیرپارامتریک Kruskal-Wallis استفاده شد. در هر دو نمودار اعداد نشان دهنده Mean \pm S.E.M می باشند (n = ۶).

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که فعال شدن سرین-ترئونین فسفاتازهای PP1/2A و PP2B، که نقش مهمی در تضعیف قدرت سیناپسی ایجاد شده توسط LFS دارند، طی اثرات مهاری LFS بر روند بروز تشنج های ناشی از کیندلینگ الکتریکی مسیر پرفورنت نقشی ندارند. بنابراین احتمالاً این دو پدیده از مسیرهای درون سلولی متفاوتی انجام می شوند.

مطالعات گذشته نشان داده بود که به کار بردن LFS (فرکانس ۱ Hz) بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ، سبب تاخیر و حتی مهار روند صرع زایی می شود همچنین این اثرات با افزایش آستانه تشنجی همراه بود^(۲۳،۲۵-۲۷) بنابراین احتمالاً LFS به نحوی تحریک پذیری نورونها را کاهش می دهد. نتایج آزمایش اول اثرات مهاری LFS بر بروز تشنجات کیندلینگ مسیر پرفورنت را تایید می کند. یافته های ما همچنین نشان داد که هر چند LFS تغییر معناداری در تعداد تحریکات لازم برای رسیدن به مراحل ۱ و ۳ تشنج ایجاد نمی کند اما تعداد تحریکات

شدتی برابر شدت آستانه تحریکات کیندلینگ مورد استفاده قرار گرفت. تاثیر مهاری LFS نمی تواند ناشی از تخریب نورونی باشد و بررسی های بافت شناسی در مطالعات قبلی نیز نشان داده است که اعمال LFS با چنین مشخصاتی تخریب نورونی مشخصی ایجاد نمی کند.^(۸,۹,۳۰) LFS با مشخصات مشابهی در هر دو پدیده تضعیف سیناپسی^(۴,۱۶,۳۱) و مهار تشنجات استفاده می شود^(۲۳-۲۵,۲۹) بنابراین ممکن است اثرات ضد تشنجی LFS از طریق مکانیسم هایی مشابه آنچه سبب القاء LTD و تقویت زدایی می شود، اعمال شود. از آنجا که تقویت زدایی پدیده معکوس LTP است^(۳,۳۲) و با توجه به شباهتهای بین LTP و پدیده کیندلینگ،^(۱۱,۳۳,۳۴) این احتمال مطرح می شود که اعمال LFS بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ از طریق مکانیسم هایی مشابه تقویت زدایی سبب مهار روند صرع زایی شود. مطالعه در زمینه مکانیسم های دخیل در پدیده تضعیف سیناپسی نشان داده اند که پروتئین فسفاتازها نظیر PP2B (کلسی نورین) و PP1/2A در القاء LTD و تقویت زدایی نقش اساسی دارند.^(۱۶,۲۱,۳۵) بررسی های ژنتیک و فارماکولوژیک تائید کننده اهمیت پروتئین فسفاتازهای PP2B و PP1/2A در پدیده تضعیف سیناپسی است به علاوه این مطالعات نشان داده اند که پروتئین فسفاتازها این کار را از طریق مهار پروتئین کینازهای ضروری در القاء LTP انجام می دهند^(۱۵) در واقع این مشاهدات بیان می کنند که تعادل میان فعالیت پروتئین کینازها و پروتئین فسفاتازها کنترل کننده قدرت سیناپسی است. در این مطالعه ما برای بررسی نقش سرین-ترئونین فسفاتازهای PP2B و PP1/2A طی اثرات مهاری LFS از روش فارماکولوژیک استفاده کردیم، طبق فرض ما در صورتی که اثرات ضد تشنجی LFS به واسطه عملکرد این فسفاتازها روی دهد، مهار این فسفاتازها اثرات ضد تشنجی LFS را مهار خواهد کرد. به همین منظور از FK506 به عنوان مهار کننده PP2B و از Okadaic acid به عنوان مهار کننده PP1/2A به صورت تزریق داخل بطنی (icv) قبل از شروع پروتکل تحریک

استفاده کردیم. نتایج این بررسی نشان داد که مهار سرین-ترئونین فسفاتازهای PP1/2A و PP2B تاثیر معناداری بر اثرات ضد تشنجی LFS طی بروز تشنجهای ناشی از کیندلینگ مسیر پرفورنت ندارد، بنابراین این فسفاتازها نمی توانند به عنوان واسطه اثرات ضد تشنجی LFS در نظر گرفته شوند و اثرات ضد تشنجی LFS از طریق ایجاد تقویت زدایی در محل سیناپسها صورت نمی گیرد زیرا تقویت زدایی در سیناپسها نیازمند عملکرد پروتئین فسفاتازها است. گزارش هایی وجود دارد که نشان می دهند دو نوع LTD در ناحیه هیپوکمپ ایجاد می شود، LTD وابسته به گیرنده های NMDA که به مهار پروتئین فسفاتازها حساس است و LTD مستقل از گیرنده های NMDA که به مهار پروتئین فسفاتازها مقاوم است.^(۱۰,۱۳,۳۶,۳۷) اگر اثرات ضد تشنجی LFS را از طریق ایجاد LTD اعمال شود، این اثرات نمی تواند از طریق ایجاد LTD وابسته به گیرنده های NMDA باشد زیرا این نوع از LTD به عملکرد پروتئین فسفاتازها نیازمند است اما ممکن است این اثرات مهاری از طریق LTD مستقل از گیرنده های NMDA باشد لذا مطالعه بیشتری در این زمینه باید صورت گیرد. به علاوه برخی مطالعات دیگر نشان داده اند که پروتکل LFS که سبب القاء LTD در ناحیه CA1 هیپوکمپ می شود قادر به القاء LTD در ژيروس دندانه دار نیست.^(۳۸) در مجموع نتایج ما نشان داد که اعمال LFS بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ سبب مهار روند صرع زایی می شود به طوری که طی ۱۷ روز تحریک، حیوانات تنها تا مرحله ۳ رفتارهای تشنج را نشان دادند. مهار پروتئین فسفاتازهای PP1/2A و PP2B که به عنوان واسطه مهم در پدیده تضعیف سیناپسی عمل می کنند تاثیری معناداری بر اثرات ضد تشنجی LFS ندارند، بنابراین این اثرات ضد تشنجی LFS احتمالاً مستقل از پروتئین فسفاتازهای PP1/2A و PP2B بوده و از طریق مکانیسم های داخل سلولی دیگری انجام می گیرد که شناخت آنها نیازمند مطالعات بیشتری است.

سیاسگزاری

کرمان و دکتر وحید شیبانی به خاطر همکاری همه جانبه ایشان در طول انجام این پروژه تشکر می کنند.

این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان انجام گردید. نویسندگان از رئیس مرکز تحقیقات علوم اعصاب

References

1. Fujii H, Hirano T. Calcineurin regulates induction of late phase of cerebellar long-term depression in rat cultured Purkinje neurons. *Eur J Neurosci*. 2002; 16:1777-1788.
2. Fujii S, Kuroda Y, Ito KL, 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; 279:121-124.
3. Klausnitzer J, Kulla A, Manahan-Vaughan D. Role of the group III metabotropic glutamate receptor in LTP, depotentiation and LTD in dentate gyrus of freely moving rats. *Neuropharmacology*. 2004; 46:160-170.
4. Manahan-Vaughan D, Kulla A. Regulation of depotentiation and long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats by dopamine D2-like receptors. *Cereb Cortex*. 2003; 13:123-135.
5. Gaito J. The effect of low frequency and direct current stimulation on the kindling phenomenon in rats. *Can J Neurol Sci*. 1981;249; 253-8
6. Goodman JH, Berger RE, Tchong TK. Preemptive low-frequency stimulation decreases the incidence of amygdala-kindled seizures. *Epilepsia*. 2005; 46:1-6
7. Yang LX, Jin CL, Zhu-Ge ZB, et al. Unilateral low-frequency stimulation of central piriform cortex delays seizure development induced by amygdaloid kindling in rats. *Neuroscience*. 2006; 138:1089-1096.
8. Sadegh M, Mirnajafi-Zadeh J, Javan M, et al. The role of galanin receptors in anticonvulsant effects of low-frequency stimulation in perforant path-kindled rats. *Neuroscience*. 2007; 150:396-403.
9. Mohammad-Zadeh M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, 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; 75:154-161.
10. Oliet SH, Malenka RC, Nicoll RA. Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron*. 1997; 18:969-982.
11. Scharfman HE. Epilepsy as an example of neural plasticity. *Neuroscientist* 2002; 8:154-161.
12. Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, et al. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature*. 1989; 340:554-557.

13. Isaac J. Protein phosphatase 1 and LTD: synapses are the architects of depression. *Neuron*. 2001; 32:963-966.
14. Morishita W, Connor JH, Xia H, et al. Regulation of synaptic strength by protein phosphatase 1. *Neuron*. 2001; 32:1133-1148.
15. Wang JH, Kelly PT. The balance between postsynaptic Ca (2+)-dependent protein kinase and phosphatase activities controlling synaptic strength. *Learn Mem*. 1996; 3:170-181.
16. O'Dell TJ, Kandel ER. Low-frequency stimulation erases LTP through an NMDA receptor-mediated activation of protein phosphatases. *Learn Mem*. 1994; 1:129-139.
17. Iyengar R. Gating by cyclic AMP: expanded role for an old signaling pathway. *Science*. 1996; 271:461-463.
18. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Guide to the care and use of experimental animals, Canadian Council on Animal Care, Ottawa. 1993;1:25-40.
19. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press New York, 1986; 4:150-159.
20. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972; 32:281-294.
21. Kang-Park MH, Sarda MA, Jones KH, et al. Protein phosphatases mediate depotentiation induced by high-intensity theta-burst stimulation. *J Neurophysiol*. 2003; 89:684-690.
22. Lu YF, Tomizawa K, Moriwaki A, et al. Calcineurin inhibitors, FK506 and cyclosporin A, suppress the NMDA receptor-mediated potentials and LTP, but not depotentiation in the rat hippocampus. *Brain Res*. 1996; 729:142-146.
23. Weiss SR, Eidsath A, Li XL, et al. Quenching revisited: low level direct current inhibits amygdala-kindled seizures. *Exp Neurol*. 1998; 154:185-192.
24. Weiss SR, Li XL, Rosen JB, et al. Quenching: inhibition of development and expression of amygdala kindled seizures with low frequency stimulation. *Neuroreport*. 1995; 6:2171-2176.
25. 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.
26. Sato M, Racine RJ, McIntyre DC. Kindling: basic mechanisms and clinical validity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1990; 76:459-472.
27. Carrington CA, Gilby KL, McIntyre DC. Effect of focal low-frequency stimulation on amygdala-kindled afterdischarge thresholds and seizure profiles in fast- and slow-kindling rat strains. *Epilepsia*. 2007; 48:1604-1613.

28. Yamamoto J, Ikeda A, Satow T, et al. Low-frequency electric cortical stimulation has an inhibitory effect on epileptic focus in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2002; 43:491-495.
29. Lopez-Meraz ML, Neri-Bazan L, Rocha L. Low frequency stimulation modifies receptor binding in rat brain. *Epilepsy Res*. 2004; 59:95-105.
30. Ghorbani P, Mohammad-Zadeh M, Mirnajafi-Zadeh J, et al. Effect of different patterns of low-frequency stimulation on piriform cortex kindled seizures. *Neurosci Lett*. 2007; 425:162-166.
31. Abraham WC, Mason-Parker SE, Logan B. Low-frequency stimulation does not readily cause long-term depression or depotentiation in the dentate gyrus of awake rats. *Brain Res*. 1996; 722:217-221.
32. Lin CH, Lee CC, Gean PW. Involvement of a calcineurin cascade in amygdala depotentiation and quenching of fear memory. *Mol Pharmacol*. 2003; 63:44-52.
33. Morimoto K, Fahnstock M, Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol*. 2004; 73:1-60.
34. Sloviter RS. The neurobiology of temporal lobe epilepsy :too much information, not enough knowledge. *C R Biol*. 2005; 328:143-153.
35. Jouvenceau A, Billard JM, Haditsch U, et al. Different phosphatase-dependent mechanisms mediate long-term depression and depotentiation of long-term potentiation in mouse hippocampal CA1 area. *Eur J Neurosci*. 2003; 18:1279-1285.
36. Solger J, Wozny C, Manahan-Vaughan D, et al. Distinct mechanisms of bidirectional activity-dependent synaptic plasticity in superficial and deep layers of rat entorhinal cortex. *Eur J Neurosci*. 2004; 19:2003-2007.
37. Wang YT, Yu XM, Salter MW. Ca^{2+} -independent reduction of N-methyl-D-aspartate channel activity by protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:1721-1725.
38. Schrader LM, Stern JM, Wilson CL, et al. Low frequency electrical stimulation through subdural electrodes in a case of refractory status epilepticus. *Clin Neurophysiol*. 2006; 117:781-7.

The Role of Serine/Threonine Protein Phosphatases in the Inhibitory Effect of Low Frequency Stimulation on Perforant Path Kindled Seizure Acquisition

Sadegh Mehdi, MSc^{*} ; Mirnajafi-Zadeh Javad, PhD^{}**

Received: 21/June /2008

Accepted: 28 /Feb /2009

Background: *The use of low-frequency electrical stimulation (LFS) as a therapy for epilepsy is currently being studied in experimental animals and patients with epilepsy. In the present study, we investigated the role of serine/threonine protein phosphatases in the inhibitory effects of LFS on perforant path kindling acquisition.*

Materials and Methods: *Sixty four male Wistar rats were stimulated by perforant path stimulation in a rapid kindling manner (6 stimulations per day). The LFS (1 Hz) was applied immediately after termination of each kindling stimulation. The FK506 (1 μ M; i.c.v.), a serine/threonine protein phosphatase PP2B inhibitor and okadaic acid (1 μ M; i.c.v.), a serine/threonine protein phosphatases PP1/2A inhibitor, were daily microinjected into the left ventricle 10 min before starting the stimulation protocol. A two-way ANOVA was done to compare the seizure parameters of different groups. The effect of LFS on behavioral seizure scores was analyzed using the nonparametric Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests. P value less than 0.05 was considered as the level of significance.*

Results: *Applying LFS immediately after kindling stimulation significantly retarded the kindling acquisition and delayed the expression of different kindled seizure stages. In addition, LFS significantly reduced the increment of daily after-discharge duration during kindling development. Microinjection of neither FK506 nor okadaic acid had significant effect on the antiepileptogenic effect of LFS on kindling parameters.*

Conclusion: *Our findings showed that activation of PP1/2A and PP2B, which play a critical role in LFS, induced down-regulation of synaptic strength, had no role in mediating the inhibitory effects of LFS on perforant path kindled seizures.*

KEYWORDS: *Seizure, Epilepsy, Low-frequency stimulation, Kindling*

***Instructor, Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran and Dept of Physiology, Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences and Health Services, Zabol, Iran**

****Associate Prof, Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran and Dept of Physiology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran**