

## اثر تحریک الکتریکی کم فرکانس بر جریان‌های گاباژیک نورون‌های ناحیه‌ی CA1 در برش‌های زنده هیپوکمپ موش صحرایی کیندل شده

اعظم عسگری<sup>۱</sup>، سعید سمنانیان<sup>۲</sup>، نفیسه عطاپور<sup>۳</sup>، امیر شجاعی<sup>۴</sup>، وحید شیانی<sup>۵</sup>، سید جواد میرنجفی زاده<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۲</sup> استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۳</sup> استاد مرکز تحقیقات علوم اعصاب، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

<sup>۴</sup> دانشجوی دکتری گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۵</sup> استاد مرکز تحقیقات علوم اعصاب، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

<sup>۶</sup> استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

\*نشانی نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی، سیدجواد میرنجفی زاده

E-mail: mirnajaf@modares.ac.ir

وصول: ۹۴/۱۰/۱۲، اصلاح: ۹۴/۱۱/۲۲، پذیرش: ۹۵/۱/۲۵

### چکیده

**زمینه و هدف:** تحریک الکتریکی کم فرکانس (LFS) دارای اثرات ضد تشنجی است که مکانیسم عملکرد آن به درستی مشخص نشده است. هدف مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر اعمال LFS بر جریان‌های برانگیخته‌ی مهارتی گاباژیک (eIPSC) در نورون‌های هر می ناحیه‌ی CA1 هیپوکمپ موش‌های صحرایی کیندل شده می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه‌ی تجربی حیوانات با تحریک الکتریکی آمیگدال کیندلینگ شدند. ۲۴ ساعت بعد از اکتساب کامل کیندلینگ در ۲۰ عدد موش صحرایی ویستار، تأثیر اعمال LFS بر eIPSC در برش‌های زنده هیپوکمپ مورد بررسی قرار گرفت.  $p < 0.05$  به عنوان سطح معناداری منظور گردید.

**یافته‌ها:** اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و شدت ۱/۵ برابر آستانه، دامنه‌ی eIPSC و ثابت زمانی بازگشت eIPSC به حالت پایه را در گروه کنترل و کیندل به‌طور معناداری افزایش داد و هنگامی که LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و با شدت آستانه اعمال شد، فقط دامنه‌ی eIPSC در گروه کنترل و کیندل به‌طور معناداری افزایش را نشان داد ( $P < 0.001$ ). مقایسه‌ی میزان تأثیر اعمال LFS در گروه کنترل و کیندل نشان داد که اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و با شدت ۱/۵ برابر آستانه در گروه کنترل، دامنه‌ی eIPSC را به‌طور معناداری بیشتر از گروه کیندل افزایش داد ( $P < 0.001$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اعمال LFS به‌طور وابسته به تعداد پالس و شدت، باعث افزایش eIPSC می‌شود و این افزایش می‌تواند یکی از مکانیسم‌های احتمالی اثرات ضد تشنجی LFS باشد.

**واژه‌های کلیدی:** صرع، تحریک کم فرکانس، جریان گاباژیک، هیپوکمپ، کیندلینگ.

## مقدمه

صرع، مجموعه‌ای از اختلالات نورولوژیکی مزمن می‌باشد که بعد از سکت‌های مغزی و آلزایمر، رایج‌ترین اختلال عصبی در انسان است. تظاهرات عصبی حملات صرع متنوع بوده و از یک حواس‌پرتی کوتاه‌مدت تا از دست رفتن هوشیاری به مدت طولانی همراه با فعالیت حرکتی غیرطبیعی بروزی می‌نماید. امروزه، اساس کنترل صرع دارودرمانی می‌باشد که داروهای متعددی در این زمینه مورد استفاده قرار می‌گیرند که فنی توئین، کاربامازپین، فنوباریتال و والپروئیک اسید از جمله این داروها هستند. اکثر داروهای ضد صرع مورد استفاده، عوارض جانبی در بیماران مصرف‌کننده ایجاد می‌نمایند (۱).

هنوز روش قطعی برای درمان صرع شناخته نشده است. داروهای ضد صرع موجود تنها در چند درصد موارد باعث از بین رفتن تشنج می‌شوند و در بقیه موارد، تنها تعداد دفعات وقوع تشنج‌ها را کاهش می‌دهند. در بسیاری از موارد مصرف توأم داروهای ضد صرع می‌تواند اثر بخشی آنها را به شکل قابل ملاحظه‌ای افزایش دهد. علاوه بر افزایش اثر بخشی، مصرف توأم داروهای ضد صرع می‌تواند از بروز مقاومت به یک دارو جلوگیری یا عوارض جانبی آن را بکاهد و به همین دلیل امروزه در مواردی که مقاومت نسبت به یک داروی ضد صرع مشاهده شود، به ناچار از درمان توأم با دو دارو کمک گرفته می‌شود (۲، ۳).

با وجود استفاده از داروهای ضد صرعی، تقریباً ۳۰ درصد بیماران از صرع مقاوم به درمان رنج می‌برند (۴). در این بیماران، بافت صرعی به وسیله جراحی برداشته می‌شود، ولی به علت عوارض جانبی زیاد آن، محققان به دنبال یافتن درمان جایگزین دیگر هستند (۴، ۵). بنابراین، توجه زیادی به استفاده از روش‌های درمانی از جمله تحریک الکتریکی مستقیم ناحیه صرعی معطوف شده است.

یکی از این روش‌های درمانی بالقوه برای صرع مقاوم به دارو، تحریک الکتریکی کم فرکانس (Low-

frequency stimulation; LFS) می‌باشد. استفاده از تحریک الکتریکی مستقیم مغز، برای تعدیل فعالیت مغزی از سال ۱۸۷۰ مورد استفاده قرار گرفته است. امروزه تحریک الکتریکی عمقی مغز برای رفع اختلالات مغزی مقاوم به درمان از قبیل درد مزمن، بیماری پارکینسون و دیس تونیا مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶، ۷)، در استفاده از این روش، دو نکته مهم باید در نظر گرفته شود: نخست این که کدام ساختارهای مغزی باید تحریک شوند و دومی این که مشخصات محرک (از قبیل فرکانس و شدت و غیره) باید چگونه باشد؟ (۸). امروزه سعی می‌کنند که در درمان صرع مقاوم به دارو از LFS، که آسیب بافتی کمتری نسبت به تحریکات الکتریکی با فرکانس بالا ایجاد می‌کند، استفاده کنند. علاوه بر این، مطالعات زیادی نشان داده اعمال LFS در طی روند یا پس از ایجاد کیندلینگ دارای اثرات مهمی بر تخلیه‌های متعاقب و رفتار تشنجی در موش‌های صحرایی می‌باشد (۸-۱۴). هر چند نحوه دقیق ایجاد اثر ضد تشنجی LFS مشخص نشده، اما کاهش تحریک پذیری نورون‌ها، افزایش آستانه تشنج، افزایش فعالیت سیناپس‌های مهارتی و کاهش فعالیت سیناپس‌های تحریکی به عنوان مکانیسم‌های احتمالی عملکرد آن پیشنهاد شده است. همچنین احتمال داده می‌شود که مکانیسم ضد تشنجی LFS مشابه با مکانیسم‌های دخیل در LTD و یا تضعیف پس از تقویت (Depotentiation) باشد (۸).

نتایج حاصل از آزمایش‌های Lopez و همکارانش نشان داد که اعمال LFS باعث افزایش میزان اتصال بنزودیپین به گیرنده‌ی گابا می‌شود. بنابراین، آنها این احتمال را مطرح کردند که اثر ضد تشنجی LFS همراه با افزایش فعالیت سیستم گاباژیک در مغز می‌باشد (۶). اما هنوز هیچ گزارشی مستقیمی در رابطه با تأثیر اعمال LFS بر جریان‌های گاباژیک وجود ندارد. بنابراین، در مطالعه حاضر اثر اعمال الگوهای مختلف LFS بر جریان‌های گاباژیک در نورون‌های هر می ناحیه CA1 در برش‌های

برای تحریک حیوان از روش کیندلینگ سریع استفاده گردید. در این روش حیوانات با موج مربعی تک فاز با مدت پالس ۱ میلی ثانیه، فرکانس ۵۰ هرتز، شدت آستانه‌ی تولید امواج تخلیه متعاقب و به مدت ۳ ثانیه تحریک شد. مراحل رفتاری تشنج بر اساس معیارهای Racine تقسیم‌بندی شدند: (۱) حرکات دهان و انقباض عضلات صورت.

(۲) حرکت دادن سر به طرف بالا و پایین (۳) کلونوس یکی از اندام‌های جلویی طرف مقابل نسبت به محل تحریک (۴) کلونوس اندام‌های جلویی و ایستادن روی هر دو پا (۵) ایستادن روی هر دو پا همراه با از دست دادن تعادل و افتادن حیوان (۱۶). این تحریکات به فاصله‌ی هر ۵ دقیقه یک بار و ۱۲ بار در روز انجام شده و تا زمان نشان دادن ۳ بار مرحله‌ی ۵ تشنج تحریک‌ها اعمال گردید تا حیوان کاملاً کیندل شود. ۲۴ ساعت بعد از این‌که حیوان کاملاً کیندل شد، موش‌های صحرایی گروه کنترل و گروه‌هایی که تحریکات کیندلینگ را دریافت کرده بودند با استفاده از اتر بیهوش و سر آنها جدا شد. مغز به سرعت برداشته و در ACSF سرد و کربوژنه (۹۵٪ O<sub>2</sub> و ۵٪ CO<sub>2</sub>) قرار گرفت. برش‌های عرضی با ضخامت ۴۵۰ μm با استفاده از ویبروتوم (Vibratome 1000 plus) تهیه گردید. محلول ACSF مخصوص برش‌گیری که دارای غلظت کلسیم پایین است حاوی (برحسب mM): سوکروز ۲۳۸، CaCl<sub>2</sub> ۲، MgSO<sub>4</sub> ۲، NaHCO<sub>3</sub> ۲۶/۲، NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ۱، KCl ۲/۵ و گلوکز ۱۱ بود. pH در محدوده‌ی ۷/۴-۷/۳ و اسمولاریته نیز در محدوده‌ی ۲۹۰-۳۰۰ mOsm تنظیم شد. برش‌ها در محلول کربوژن‌شده‌ی ACSF به مدت یک ساعت در درجه‌ی حرارت ۳۵-۳۲ درجه سانتی‌گراد، انکوبه و پس از آن تا هنگام آزمایش در محلول مذکور در درجه‌ی حرارت اتاق نگهداری شدند.

برش‌های تهیه‌شده، در محفظه‌ی ثبت قرار داده شد و با کمک میکروسکوپ مجهز به سیستم IR-DIC (Infrared-differential interference contrast) با

زنده هیپوکمپ در موش‌های صحرایی که با استفاده از مدل آزمایشگاهی کیندلینگ دچار تشنج شده بودند، بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

جراحی و کارگذاری الکتروود

در این مطالعه‌ی تجربی از موش‌های صحرایی نر بالغ جوان از نژاد ویستار در محدوده‌ی وزنی ۸۰-۶۰ گرم که تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲۳ ± ۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند، استفاده شد. حیوانات به صورت آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند و کلیه‌ی مراحل کار این مطالعه به تائید کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس رسیده است.

حیوان توسط تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بیهوش شد و در دستگاه استریوتاکسی قرار گرفت. پس از ایجاد برش و کنار زدن پوست سر، ناحیه‌ی برگما شناسایی شده و بر اساس مختصات ذکر شده در اطلس پاکسینوس و واتسون (۱۵) ناحیه‌ی مربوط به آمیگدال (۲/۵ mm به سمت عقب و ۴/۸ mm به سمت راست نسبت به برگما و ۷/۵ mm زیر جمجمه) مشخص شد (شکل ۱-). با استفاده از مته‌های دندان پزشکی در محل مشخص شده، منفذی ایجاد و الکتروود سه قطبی درون مغز کار گذاشته شد. سپس الکتروود تک قطبی با استفاده از پیچ لحیم‌شده به آن، بر روی جمجمه متصل گردید. دو پیچ کوچک دیگری نیز برای استحکام روی نقاط دیگری از جمجمه وصل شد و الکتروودها و پیچ‌ها بوسیله‌ی سیمان دندان پزشکی روی سطح جمجمه ثابت شدند. آنگاه پین‌های متصل به الکتروودهای سه قطبی و تک قطبی درون بخش مادگی یک سوکت قرار داده و سوکت با استفاده از سیمان دندان-پزشکی بر روی جمجمه نصب شد. برای بهبودی زخم‌ها و بازگشت به شرایط طبیعی، ۷ روز به حیوان استراحت داده شد.

گرفت. قبل از انجام هر آزمایش، مشاهده‌ی مستقیم سلول هرمی زیر میکروسکوپ، برای تأیید این نکته که سلول مورد بررسی یک نورون هرمی ناحیه‌ی CA1 است، انجام شد. ثبت‌ها در ۳ KHz، فیلتر و با استفاده از نرم-افزار ۱۰ Pclamp ذخیره شدند.

برای ثبت eIPSC یک الکتروود دوقطبی تحریک در فاصله‌ی ۲۰۰-۳۰۰ میکرونی الکتروود ثبت قرارداد و به دنبال تحریک، پاسخ برانگیخته مهارتی در یک نورون هرمی ناحیه‌ی CA1 ثبت شد. تحریک توسط پالس مربعی به مدت ۱ میلی ثانیه و شدت ۱/۵ برابر آستانه اعمال می-شود. قبل از هر تحریک، آزمون سلامت سلول با اعمال موج منفی هیپرپلاریزه کننده صورت گرفت.

در هنگام ثبت eIPSC نورون ابتدا با شدت‌های کم، تحریک شد و هر بار میزان تحریک، تا زمانی که اولین پاسخ ثبت شود، افزایش یافت. این میزان تحریک، «شدت آستانه» نامیده شد. سپس نورون با شدتی معادل با ۱/۵ برابر شدت آستانه تحریک گردید. در این مطالعه، LFS باشدت آستانه و ۱/۵ برابر آن بر سطح برش مغزی اعمال شد. پس از انجام ثبت، کمیت‌های مختلف eIPSC شامل دامنه، شیب، مدت زمانی که جریان از ۱۰٪ به ۹۰٪ می-رسد (rise time) و ثابت زمانی بازگشت eIPSC به حالت پایه (decay time constant) در گروه‌های کیندل و کنترل اندازه‌گیری شدند (شکل-۲).

LFS نیز با الگوی موج مربعی (۲۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ پالس) مدت زمان ۰/۱ میلی ثانیه، فرکانس ۱ هرتز و با شدت‌های مساوی و ۱/۵ برابر شدت آستانه بر برش‌های زنده‌ی هیپوکمپ اعمال شد. برای اعمال این تحریک از الکتروود دو قطبی تحریک در فاصله‌ی ۲۰۰-۳۰۰ میکرونی الکتروود ثبت استفاده گردید.

از آنجاکه هدف مطالعه ما ثبت جریان‌های پس سیناپسی مهارتی وابسته به گابا A بود، همه ثبت‌ها در حضور مهارکننده‌های گیرنده‌های AMPA (CNQX)، NMDA (APV) و GABAB (CGP) انجام شد. پس از

اپتیک‌های مادون قرمز از طریق عدسی شیئی غوطه‌ور در آب مشاهده شدند. محفظه‌ی ثبت با مایع مغزی نخاعی مصنوعی (ACSF) استاندارد کربوژنه شده به‌طور مداوم با سرعت ۱-۲ میلی لیتر در دقیقه پرفیوژ گردید. ACSF استاندارد حاوی (برحسب mM): ۱۳۲/۴ NaCl، ۲/۵ CaCl<sub>2</sub>، ۲ MgSO<sub>4</sub>، ۱ NAH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>، ۲۵ NAHCO<sub>3</sub> و گلوکز ۱۰ بود.

**ثبت جریان‌های مهارتی پس سیناپسی بر انگیخته وابسته به گابا A**

در این تحقیق جریان‌های مهارتی پس سیناپسی برانگیخته وابسته به گابا A (eIPSC) از جسم سلولی سلول‌های هرمی CA1 هیپوکمپ با استفاده از روش کلمپ ولتاژ (whole cell voltage clamp) انجام شد. مقاومت نوک پیت پس از پرشدن با محلول داخل سلولی، ۵-۶ MΩ بود. محتویات محلول داخل پیت ثبت حاوی (برحسب mM): ۱۴۰ CsCl، ۱ CaCl<sub>2</sub>، ۱۰ HEPES، lidocaineN-ethyl bromide (QX-314)، ۲ MgCl<sub>2</sub>، ۲ MgATP، ۲ Na<sub>2</sub>GTP و ۱۰ EGTA بود. با استفاده از محلول یک مولار CsOH، pH در محدوده‌ی ۷/۴ تا ۷/۳ تنظیم شد و اسمولاریته نیز در محدوده‌ی ۲۹۰-۳۰۰ mOsm بود.

محلول داخل پیت با استفاده از یک الکتروود Ag/AgCl به آمپلی فایر مرتبط شد. پیت را به سطح غشا، نزدیک و با اعمال مکشی کوچک، غشا را پاره کرده تا حالت whole cell ایجاد گردد. به منظور تثبیت شدن محیط داخل سلولی، ثبت حداقل ۵ دقیقه بعد از پاره شدن غشای سلول شروع شد. مقاومت دستیابی به سلول (access resistance) کمتر از ۳۰ مگا اهم بود. این کمیت در طی آزمایش بررسی شد و نورون‌هایی که مقاومت دستیابی آنها در طی انجام ثبت بیشتر از ۲۰ درصد تغییر می‌کرد، مورد تجزیه و تحلیل قرار نمی گرفتند. جریان‌های غشا با کمک آمپلی فایر Multiclamp 700B، ثبت و در کامپیوتر ذخیره شدند. تمام ثبت‌ها در دمای اتاق انجام-

پایان ثبت‌ها، برای اطمینان از این که ثبت مربوط به گیرنده‌ی گابا A بوده‌است، از بیکوکولین ( $50 \mu\text{M}$ ) که مهارکننده‌ی گابا A می‌باشد، استفاده شد.

### گروه‌های آزمایشی

حیوانات به دو گروه کنترل و کیندل تقسیم شدند. در گروه کنترل، برش‌های زنده‌ی هیپوکمپ از موش‌هایی که هیچ تحریکی را دریافت نکرده بودند، تهیه و جریان‌های گابارژیک در حالت پایه و پس از اعمال الگوهای مختلف LFS ثبت شد. در گروه کیندل، حیوانات جراحی و الکتروود در آمیگدال کار گذاشته شد. تحریکات کیندلینگ اعمال گردید تا حیوان کاملا کیندل شود. ۲۴ ساعت پس از اعمال آخرین تحریک برش‌های زنده‌ی هیپوکمپ، تهیه و همانند گروه کنترل، جریان‌های گابارژیک در حالت پایه و پس از اعمال الگوهای مختلف LFS ثبت شد.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

کلیه‌ی داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین (Mean  $\pm$  SEM)، ازایه و تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از برنامه‌ی (Sigma Plot 12) و با در نظر گرفتن سطح معناداری  $p < 0.05$  انجام شدند. تأثیر فاکتورهای تعداد پالس LFS (۲۰، ۱۰۰ و ۲۰۰)، شدت اعمال LFS (یک یا ۱/۵ برابر آستانه) و گروه آزمایشی (کنترل یا کیندل) بر کمیتهای اندازه‌گیری شده توسط آزمون واریانس سه‌طرفه و آزمون متعاقب Tukey تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه‌ی آماری پارامترهای مختلف eIPSC در شرایط قبل (ثبت پایه) و بعد از اعمال LFS در بین گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون متعاقب Tukey انجام شد.

### یافته‌ها

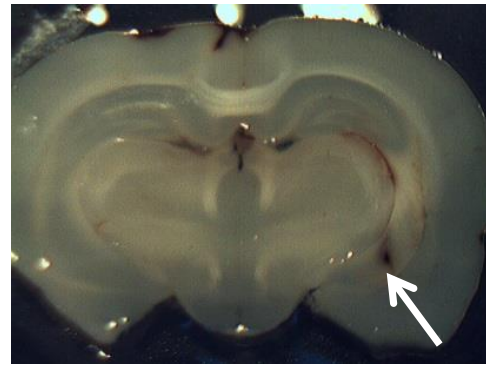
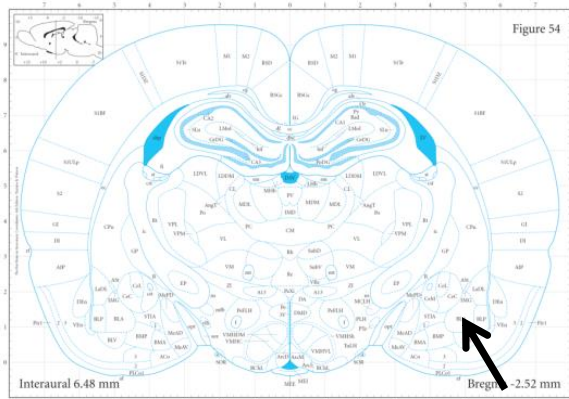
نتایج آنالیز واریانس سه‌طرفه نشان دادند که اثرات LFS بر جریان‌های گابارژیک وابسته به تعداد پالس و شدت تحریک آن است. به گونه‌ای که اعمال LFS با

الگوی ۲۰۰ پالس اثرات بیشتری نسبت به اعمال ۲۰ و ۱۰۰ پالس آن از خود نشان دادند ( $P < 0.001$ ). به علاوه، اعمال LFS با شدت ۱/۵ برابر آستانه تأثیر بیشتری نسبت به شدت آستانه داشتند ( $P < 0.001$ ).

اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و در هر دو شدت یک یا ۱/۵ برابر آستانه، دامنه‌ی eIPSC را در گروه کنترل به طور معناداری نسبت به قبل از اعمال آن، افزایش دادند ( $P < 0.001$ ) (شکل-۳). اعمال LFS با همین الگو فقط در شدت ۱/۵ برابر آستانه ثابت زمانی بازگشت eIPSC به حالت پایه را به میزان معناداری در مقایسه با قبل از اعمال تحریک افزایش دادند ( $P < 0.001$ ) (شکل-۳). همچنین نتایج آزمون آنالیز واریانس سه‌طرفه و آزمون متعاقب Tukey نشان دادند که در این گروه اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و با شدت ۱/۵ برابر آستانه، دامنه‌ی eIPSC را به میزان بیشتری نسبت به اعمال آن با شدت آستانه افزایش دادند ( $P < 0.001$ ).

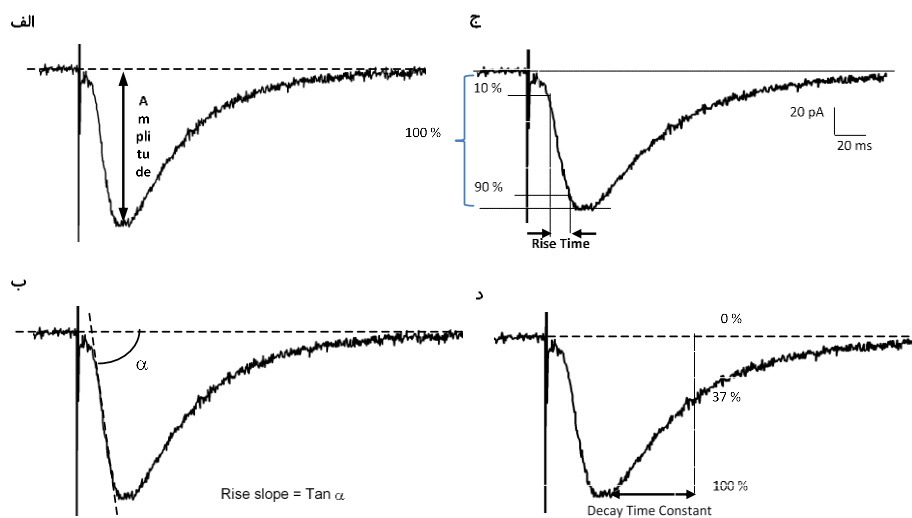
اعمال LFS در گروه کیندل نیز نتایج کاملا مشابه‌ای داشتند. به گونه‌ای که اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و در هر دو شدت یک یا ۱/۵ برابر آستانه، دامنه‌ی eIPSC ( $P < 0.001$ ) و فقط در شدت ۱/۵ برابر آستانه ثابت زمانی بازگشت eIPSC به حالت پایه ( $P < 0.001$ ) را به میزان معناداری در مقایسه با قبل از اعمال تحریک افزایش دادند (شکل-۴). اما در این گروه آزمون آنالیز واریانس سه‌طرفه و آزمون متعاقب Tukey تفاوت معناداری را بین اثرات اعمال LFS با شدت‌های یک یا ۱/۵ برابر آستانه بر کمیتهای eIPSC نشان ندادند.

آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون متعاقب Tukey نشان دادند سایر کمیتهای اندازه‌گیری شده eIPSC (شیب و مدت زمانی که جریان از ۱۰٪ به ۹۰٪ می‌رسد) تحت تأثیر اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس قرار نگرفتند ( $P > 0.05$ ). هنگامی که این الگوی LFS با شدت برابر آستانه اعمال شد، درصد تغییر میزان شیب eIPSC و مدت زمانی که eIPSC از ۱۰٪ به ۹۰٪ می‌رسد



شکل ۱: نمایی از برش کرنال مغز

سمت چپ) نمایی از برش کرنال مغزی در اطلس پاکسینوس و ناحیه هسته قاعده ای آمیگدال (BLA) (پیکان سیاه). سمت راست) پیکان سفید موقعیت الکتروود در ناحیه هسته قاعده ای آمیگدال (BLA) را نشان می دهد.



شکل ۲: نحوه اندازه گیری کمیت های مختلف eIPSC

الف) دامنه (فاصله بین قله eIPSC تا خط پایه); ب) شیب (دامنه تقسیم بر مدت زمانی که جریان از ۱۰٪ به ۹۰٪ حداکثر پاسخ می رسد); ج) مدت زمانی که جریان از ۱۰٪ به ۹۰٪ حداکثر پاسخ می رسد (rise time); د) ثابت زمانی بازگشت جریان به حالت پایه (decay time constant) (مدت زمانی که طول می کشد تا پاسخ از ۱۰۰ درصد به ۳۷ درصد مقدار اولیه برسد).

شدت‌های یک و ۱/۵ برابر شدت آستانه بر برش‌های زنده اعمال شد، تفاوت آماری معناداری بین قبل و بعد از اعمال LFS در هیچ یک از کمیت‌های eIPSC در دو گروه کنترل و کیندل وجود نداشت ( $P > 0.05$ ).

مقایسه‌ی میزان تاثیر اعمال LFS در گروه کنترل و کیندل نشان داد که اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و باشدت ۱/۵ برابر آستانه در گروه کنترل دامنه‌ی eIPSC را به طور معناداری بیشتر از گروه کیندل افزایش دادند ( $P < 0.001$ ) اما میزان اثر بخشی آن بر دامنه‌ی eIPSC در شدت برابر آستانه و بر ثابت زمانی بازگشت eIPSC به

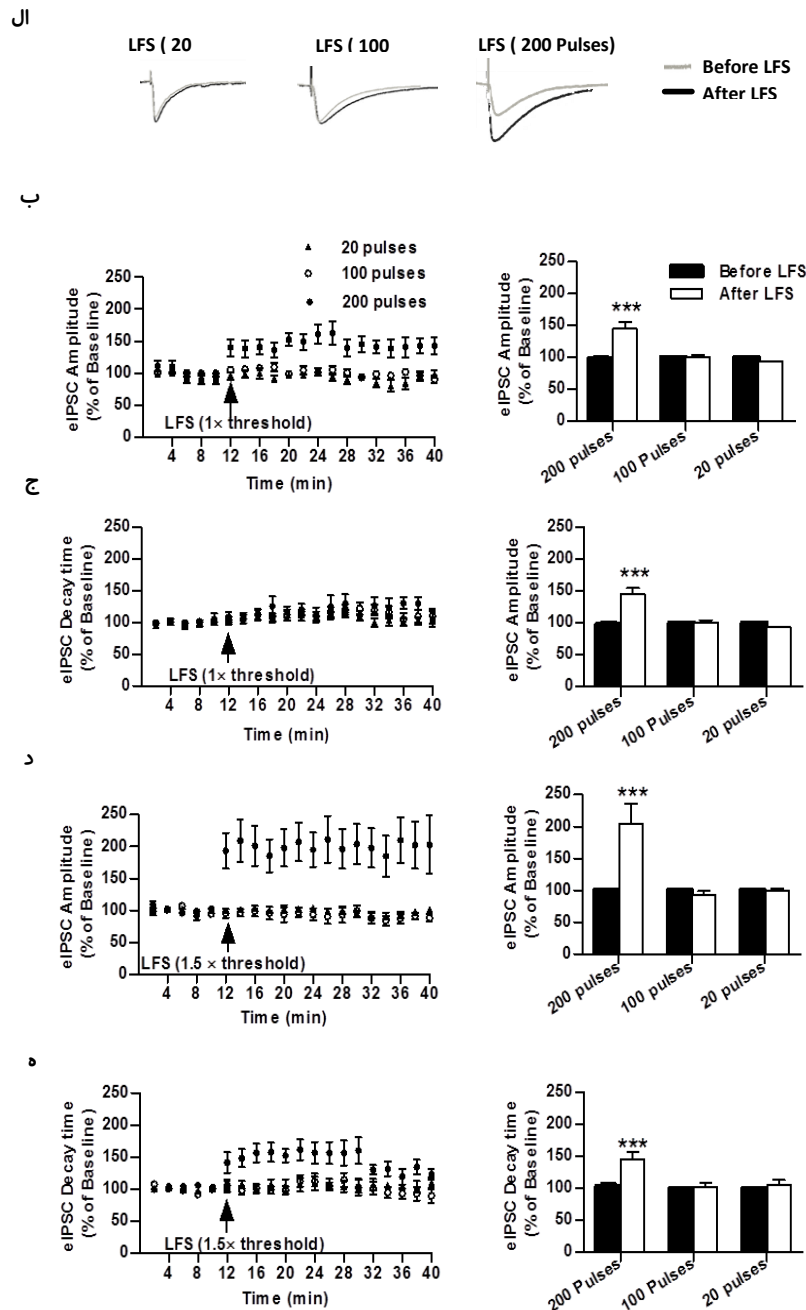
در گروه کنترل به ترتیب  $36.09 \pm 11.15$  و  $11.74 \pm 7.04$  و در گروه کیندل به ترتیب  $27.48 \pm 20.18$  و  $21.77 \pm 7.18$  از نظر آماری معنادار نبودند ( $P > 0.05$ ). به همین ترتیب، اعمال LFS باشدت ۱/۵ برابر آستانه نیز اثر معناداری بر درصد تغییر میزان شیب eIPSC و مدت زمانی که eIPSC از ۱۰٪ به ۹۰٪ می رسد (در گروه کنترل به ترتیب  $18.32 \pm 23.84$  و  $5.50 \pm 6.47$  و در گروه کیندل به ترتیب  $2.35 \pm 5.80$  و  $6.86 \pm 19.55$ ) نداشتند ( $P > 0.05$ ).

هنگامی که LFS با الگوهای ۱۰۰ و ۲۰ پالس و با

بنابراین تمامی eIPSC های ثبت شده مربوط به جریان-های گاباژریک بودند.

حالت پایه در شدت ۱/۵ برابر آستانه در دو گروه کنترل و کیندل تفاوت معناداری نداشت (شکل-۵).

افزودن بیکوکولین به محیط خارج سلولی (۲۰μM) باعث حذف کامل پاسخ های پس سیناپسی شد.



شکل ۳: دامنه و ثابت زمانی بازگشت eIPSC به حالت پایه در گروه کنترل قبل و بعد از اعمال LFS

الف) نمونه هایی از ثبت eIPSC قبل و بعد از اعمال الگوهای مختلف LFS: ب) تاثیر اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و با شدت آستانه بر دامنه eIPSC: ج) تاثیر اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و با شدت آستانه بر ثابت زمانی بازگشت eIPSC به حالت پایه: د) تاثیر اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و شدت ۱/۵ برابر آستانه بر دامنه eIPSC: ه) تاثیر اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و با شدت ۱/۵ برابر آستانه بر ثابت زمانی بازگشت eIPSC به حالت پایه. کلیه داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (Mean ± SEM) نشان داده شده است. \*\*\* نشان دهنده P < ۰/۰۰۱ در مقایسه با قبل از اعمال LFS می باشد (n=۶-۸).



## بحث

نتایج مطالعه‌ی ما نشان داد که اعمال LFS در برش‌های زنده‌ی هیپوکمپ سبب افزایش پاسخ‌های پس سیناپسی گابارژیک می‌شود. به گونه‌ای که دامنه و ثابت زمانی بازگشت جریان به حالت پایه eIPSC را زیاد می‌کند. این اثرات LFS به الگوی اعمال آن (تعداد پالس و شدت) وابسته است.

همان‌گونه که نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد افزایش تعداد پالس‌های LFS منجر به افزایش تأثیر آن بر جریان‌های گابارژیک می‌شود. این موضوع در راستای یافته‌ی قبلی است که نشان داد افزایش تعداد پالس اثرات ضد تشنجی LFS را تقویت می‌کند (۱۴). همچنین مطالعات قبلی آزمایشگاه ما نشان داد که بین الگوی اعمال LFS (فرکانس، مدت پالس، شدت پالس، مدت زمان اعمال) و اثرات ضد تشنجی آن ارتباط وجود دارد (۱۲، ۱۳). جهان‌شاهی و همکاران (۱۱) نیز با بررسی سه فرکانس ۱، ۵/۰ و ۵ هرتز مشاهده کردند که LFS در الگوی فرکانس ۱ هرتز بیشترین تأثیر بازدارندگی را بر پارامترهای تشنجی دارد. قربانی و همکاران (۱۲) نیز در فرکانس ۱ هرتز بیشترین تأثیر را مشاهده کردند که مشابه با فرکانس مورد استفاده در مطالعه‌ی حاضر می‌باشد. در همین راستا گزارش شده که هرچه تعداد پالس LFS قبل از تحریک تتانیک بیشتر باشد، اثر مهارتی آن بر القا LTP بیشتر است (۱۷).

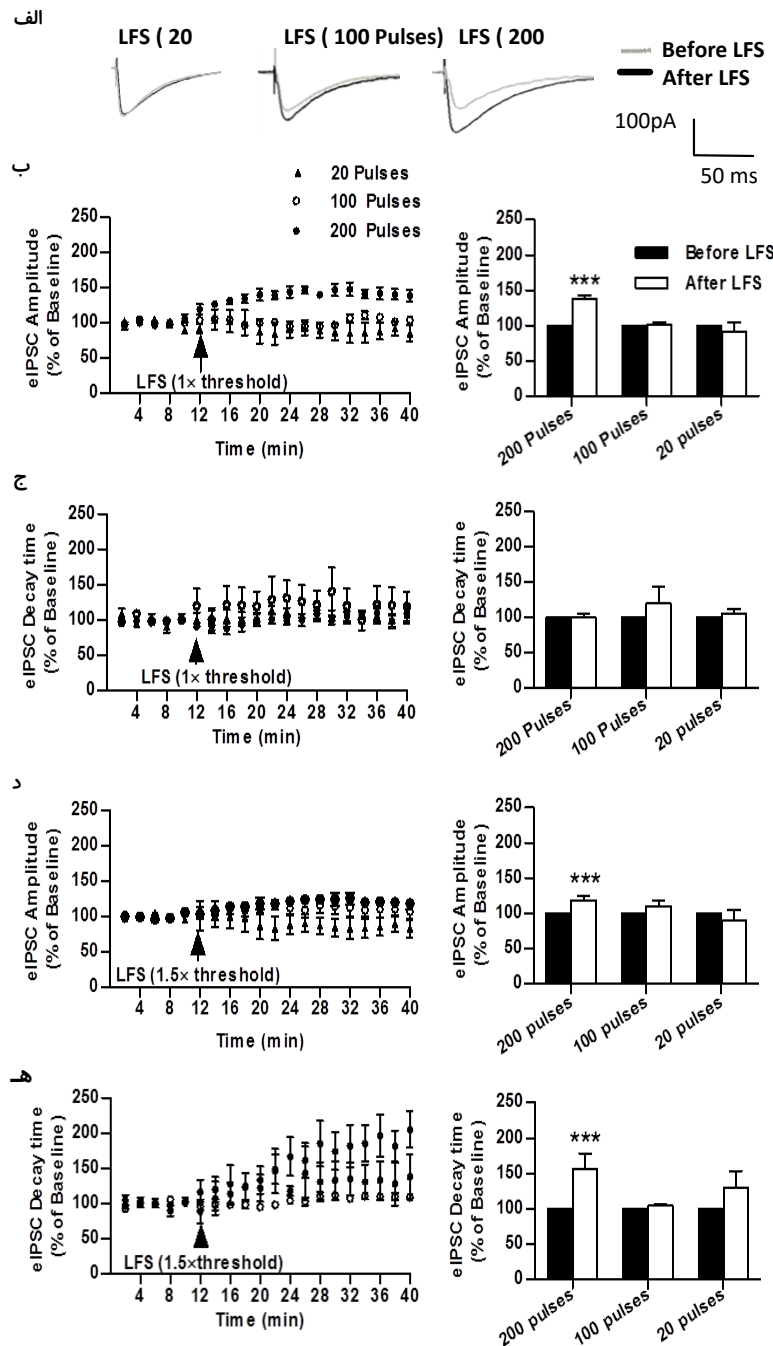
نظر به اهمیت بالقوه‌ی هیپوکمپ در انتشار امواج تشنجی در طی کیندلینگ آمیگدال، در این تحقیق LFS در این ناحیه‌ی اعمال شد تا تأثیر آن بر جریان‌های گابارژیک بررسی شود. در بین نواحی مختلف مغز، هیپوکمپ یک مکان مهم برای گسترش و تقویت امواج تشنجی است و در صرع لوب گیجگاهی تغییرات زیادی در فعالیت نورون‌های آن مشاهده می‌شود (۱). علاوه بر این، این ناحیه به صورت آناتومیکی (۱۸-۲۰) و عملکردی (۲۱، ۲۲) با آمیگدال ارتباط دارد و مشخص شده که به دنبال کیندلینگ

آمیگدال، متابولیسم گلوکز در هیپوکمپ افزایش می‌یابد (۱۸، ۲۳، ۲۴). بر اساس این مشاهدات، پیشنهاد شده است که هیپوکمپ یک ساختار مهم در شروع، ادامه و احتمالاً خاتمه‌ی تشنجات ناشی از کیندلینگ آمیگدال است (۲۳).

با وجود مشاهده‌ی اثرات ضد تشنجی LFS در حیوانات آزمایشگاهی و بیماران صرعی (برای مطالعه‌ی بیشتر به مقالات مروری مراجعه شود) (۲۵، ۲۶) مکانیسم دقیق عمل LFS مشخص نشده است. با این حال، به نظر می‌رسد که مکانیسم اثر ضد تشنجی LFS مشابه با مکانیسم‌های دخیل در LTD و یا تضعیف پس از تقوی (Depotiation) باشد (۷، ۲۷). مطالعات قبلی نشان داده است که اعمال LFS باعث مهار LTP می‌شود و پدیده‌ی تضعیف پس از تقویت را به وجود می‌آورد (۸، ۲۷). بنابراین با توجه به اثرات مهارتی LFS بر LTP و مشابهت LTP با تقویت سیناپسی ناشی از کیندلینگ، ممکن است LFS با کاهش پاسخ‌دهی سیناپسی در مدارهای صرعی از طریق مکانیسم‌هایی مثل تضعیف پس از تقویت، سبب مهار گسترش فعالیت‌های تشنجی شود. همچنین نتایج مطالعه‌ی ای دیگر نشان داده که کاربرد LFS در آمیگدال ممکن است روند صرع‌زایی را با تغییر در مدار سیستم لیمبیک مهار کند (۲۸).

از جمله مکانیسم‌های احتمالی دیگری که برای ایجاد اثرات ضد تشنجی LFS پیشنهاد شده است، افزایش فعالیت سیناپس‌های مهارتی می‌باشد (۸). بعضی از اثرات ضد صرعی LFS ممکن است از طریق فعال کردن گیرنده‌های گابا- بنزودیازپین انجام شود (۶). نشان داده شده که تحریک قشر پاراهیبوکمپ در بیماران صرعی، باعث افزایش میزان گابا در بافت مغزی می‌شود (۲۹). این اثرات ضد صرعی LFS ممکن است فعال شدن پایانه‌های گابارژیک و به دنبال آن تغییر رهاش گابا را در برداشته باشد (۳۰، ۳۱). به علاوه، پیشنهاد شده که اثرات درمانی تحریک الکتریکی در صرع موضعی نیز ممکن است به دلیل



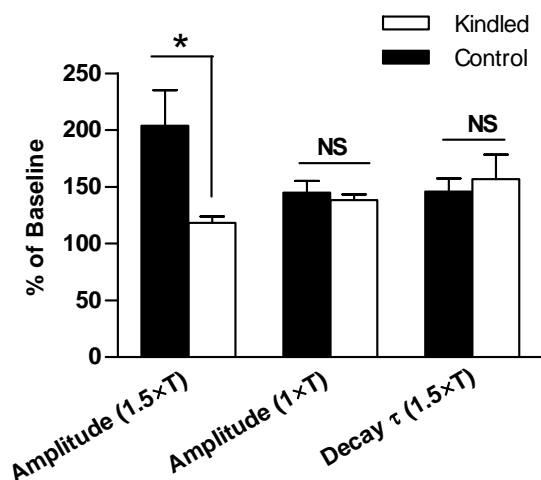


شکل ۴: دامنه و ثابت زمانی بازگشت جریان به حالت پایه پتانسیل های پس سیناپسی برانگیخته در گروه کیندل قبل و بعد از اعمال LFS (الف) نمونه هایی از ثبت eIPSC قبل و بعد از اعمال الگوهای مختلف LFS؛ (ب) تاثیر اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و با شدت آستانه بر دامنه eIPSC؛ (ج) تاثیر اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و با شدت آستانه بر ثابت زمانی بازگشت eIPSC به حالت پایه؛ (د) تاثیر اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و شدت ۱/۵ برابر آستانه بر دامنه eIPSC؛ (ه) تاثیر اعمال LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و با شدت ۱/۵ برابر آستانه بر ثابت زمانی بازگشت eIPSC به حالت پایه. کلیه داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (Mean ± SEM) نشان داده شده است. \*\*\* نشان دهنده  $P < 0.001$  در مقایسه با قبل از اعمال LFS می باشد (n=6-8).

افزایشی LFS بر جریان های گاباژریک می باشد، یافته های فوق را تأیید می نماید.

در این مطالعه، اثر افزایشی LFS بر جریان های گاباژریک با افزایش دامنه eIPSC و طولانی شدن ثابت

هایپرپلاریزاسیون ناشی از گابا در شبکه های قشری هیپوکمپ (که در شروع و توسعه تشنجات تونیک-کلونیک شرکت می کنند)، ایجاد شود (۳۲). نتایج حاصل از مطالعه حاضر، که در واقع نخستین گزارش در مورد اثر



شکل ۵: مقایسه تأثیر LFS با الگوی ۲۰۰ پالس (شدت یک برابر یا ۱/۵ برابر آستانه) بر کمیت‌های eIPSC در دو گروه کنترل و کیندل LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و شدت ۱/۵ برابر آستانه دامنه eIPSC را در گروه کنترل بیشتر از گروه کیندل افزایش داد. کلیه داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین (Mean  $\pm$  SEM) نشان داده شده است (n=6). \* نشان دهنده  $P < 0.05$  می‌باشد (شدت آستانه = T؛ عدم تفاوت معنی دار = NS). (Decay  $\tau$  = Decay time constant)

فاکتورهای پیش و پس سیناپسی، از جمله: الف) تغییرات غلظت گابا در شکاف سیناپسی در طول زمان که تحت تاثیر دانسیته‌ی حامل‌های گابا و میزان رهایش گابای پیش سیناپس است (۳۸، ۳۹)، ب) تعداد گیرنده‌ی پس سیناپسی گابا A (۴۰) و ج) ترکیب (۴۱) و میزان فسفریلاسیون زیر واحدهای گیرنده‌های سیناپسی گابا A (۴۲)، تعیین می‌شود.

کنتیک باز شدن کانال کلری گیرنده‌ی پس سیناپسی گابا A نیز به وسیله‌ی اندازه‌گیری مدت زمانی eIPSC از ۱۰٪ به ۹۰٪ پاسخ رسید و شیب آن ارزیابی شد. نتایج نشان داد که هیچ‌کدام از الگوهای اعمال شده بر این کمیت‌ها موثر نبود. بنابراین، می‌توان این احتمال را مطرح کرد که اعمال LFS بر کنتیک باز شدن کانال کلر اثر ندارد.

هرچند اعمال تحریک الکتریکی با فرکانس بالا هم دارای اثرات ضد تشنجی می‌باشد، اما امروزه سعی بر این است که در درمان صرع مقاوم به دارو از LFS، که آسیب بافتی کمتری نسبت به تحریکات الکتریکی با فرکانس بالا ایجاد می‌کند، استفاده شود. در بررسی انجام شده توسط Albensi و همکارانش نشان داده شد که تحریکات الکتریکی با فرکانس کم و زیاد هر دو می‌توانند باعث

زمانی بازگشت eIPSC به حالت پایه همراه بود. افزایش دامنه‌ی IPSC ممکن است در نتیجه‌ی افزایش رهایش گابا از نورون پیش سیناپسی (۳۳)، یا افزایش گیرنده‌های پس سیناپسی گابا (۳۴) و یا تغییر در خصوصیات گیرنده‌ی گابا A (که ناشی از تغییر در ترکیب زیر واحدهای گیرنده و یا فسفریلاسیون گیرنده است)، ایجاد شود (۳۵-۳۷). در این مطالعه LFS با الگوی ۲۰۰ پالس با شدت یک برابر و ۱/۵ برابر شدت آستانه توانست دامنه‌ی پاسخ را افزایش دهد، ولی مشخص نیست که این افزایش ناشی از تغییرات پیش سیناپسی می‌باشد یا تغییرات پس سیناپسی.

ثابت زمانی بازگشت eIPSC به حالت پایه‌ی شاخصی از کنتیک بسته شدن کانال کلری گیرنده‌ی گابا A و نشان دهنده‌ی مدت زمانی است که کانال باز مانده است. بیشتر بودن ثابت زمانی بازگشت جریان به حالت پایه، نشان دهنده‌ی آهسته تر بودن کنتیک بسته شدن کانال می‌باشد. بنابراین افزایش این کمیت در مطالعه‌ی ما به این مفهوم است که LFS با الگوی ۲۰۰ پالس و شدت ۱/۵ برابر آستانه باعث شده است کانال مدت زمان بیشتری بازماند و در نتیجه ورود کلر افزایش یافته و شدت مهار نورون بیشتر شود. در واقع کمیت ثابت زمانی بازگشت جریان به حالت پایه، در سیناپس‌های مهارتی به وسیله‌ی

در این مطالعه این نکته که LFS با چه مکانیسم پیش و یا پس سیناپسی اثر کرده است، مشخص نیست. اما مشخص شد که LFS از طریق عمل کردن بر کنتیک بسته-شدن کانال اثر خود را اعمال می‌کند.

### تشکر و قدردانی

حمایت مالی این تحقیق توسط مرکز علوم اعصاب کرمان و معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس صورت گرفته است. بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر خود را از این مراکز اعلام می‌دارند.

از بین رفتن تخلیه‌های بین حمله‌ای در برش‌های زنده‌ی هیپوکمپ شود. حذف تحریکات الکتریکی با فرکانس زیاد موجب بازگشت مجدد تخلیه‌های بین حمله‌ای شد. این درحالی است که حذف LFS موجب بازگشت آن‌ها نشد (۴۳).

به‌طور کلی، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اعمال LFS به‌طور وابسته به تعداد پالس و شدت باعث افزایش جریان‌های مهارى گابارژیک می‌شود و این افزایش می‌تواند یکی از مکانیسم‌های احتمالی اثرات مهارى LFS در مدل‌های آزمایشگاهی ایجاد تشنج (مانند کیندلینگ) و در بیماران صرعى باشد.

### References

1. Loscher W. Animal models of intractable epilepsy. *Progress in neurobiology*. 1997;53(2):239-58.
2. Schmidt D, Loscher W. New developments in antiepileptic drug resistance: an integrative view. *Epilepsy Curr*. 2009;9(2):47-52.
3. McNamara JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci*. 1994;14(6):3413-25.
4. Speer AM, Kimbrell TA, Wassermann EM, D Repella J, Willis MW, Herscovitch P, et al. Opposite effects of high and low frequency rTMS on regional brain activity in depressed patients. *Biol Psychiatry*. 2000;48(12):1133-41.
5. Tergau F, Naumann U, Paulus W, Steinhoff BJ. Low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves intractable epilepsy. *Lancet*. 1999;353(9171):2209.
6. Lopez-Meraz ML, Neri-Bazan L, Rocha L. Low frequency stimulation modifies receptor binding in rat brain. *Epilepsy Res*. 2004;59(2-3):95-105.
7. Wu DC, Xu ZH, Wang S, Fang Q, Hu DQ, Li Q, et al. Time-dependent effect of low-frequency stimulation on amygdaloid-kindling seizures in rats. *Neurobiol Dis*. 2008;31(1):74-9.
8. Goodman JH, Berger RE, Tchong TK. Preemptive Low-frequency Stimulation Decreases the Incidence of Amygdala-kindled Seizures. *Epilepsia*. 2005;46(1):1-7.
9. 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(2):154-61.
10. Ghotbedin Z, Janahmadi M, Mirnajafi-Zadeh J, Behzadi G, Semnani S. Electrical Low Frequency Stimulation of the Kindling Site Preserves the Electrophysiological Properties of the Rat Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons From the Destructive Effects of Amygdala Kindling: The Basis for a Possible Promising Epilepsy Therapy. *Brain Stimul*. 2013;6(4):515-23.
11. Jahanshahi A, Mirnajafi-Zadeh J, Javan M, Mohammad-Zadeh M, Rohani R. The antiepileptogenic effect of electrical stimulation at different low frequencies is accompanied with change in adenosine receptors gene expression in rats. *Epilepsia*. 2009;50(7):1768-79.
12. Ghorbani P, Mohammad-Zadeh M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y. Effect of different patterns of low-frequency stimulation on piriform cortex kindled seizures. *Neurosci Lett*. 2007;425(3):162-6.
13. Shahpari M, Mirnajafi-Zadeh J, P Firoozabadi SM, Yadollahpour A. Effect of low-frequency electrical stimulation parameters on its anticonvulsant action during rapid perforant path kindling in rat. *Epilepsy Res*. 2012;99(1):69-77.
14. Asgari A, Semnani S, Atapour N, Shojaei A, Moradi H, Mirnajafi-Zadeh J. Combined sub-threshold dosages of phenobarbital and low-frequency stimulation effectively reduce seizures in amygdala-kindled rats. *Neurol Sci*. 2014.
15. Paxinos G, Watson CW. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York.: Academic Press; 1986.

16. Racine R, Rose PA, Burnham WM. Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. *Can J Neurol Sci.* 1977;4(4):273-8.
17. Fujii S, Kuroda Y, Miura M, Furuse H, Sasaki H, Kaneko K, et al. The long-term suppressive effect of prior activation of synaptic inputs by low-frequency stimulation on induction of long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Exp Brain Res.* 1996;111(3):305-12.
18. Collins RC, Tarse RG, Lothman EW. Functional anatomy of limbic seizures: focal discharges from medial entorhinal cortex in rat. *Brain Res.* 1983;280(1):25-40.
19. Krettek JE, Price JL. Projections from the amygdala to the perirhinal and entorhinal cortices and the subiculum. *Brain Res.* 1974;71(1):150-4.
20. Wyss JM, Swanson LW, Cowan WM. A study of subcortical afferents to the hippocampal formation in the rat. *Neuroscience.* 1979;4(4):463-76.
21. Mello LE, Tan AM, Finch DM. Convergence of projections from the rat hippocampal formation, medial geniculate and basal forebrain onto single amygdaloid neurons: an in vivo extra-and intracellular electrophysiological study. *Brain Res.* 1992;587(1):24-40.
22. Uno M, Ozawa N. Augmentation of synaptic responses in the dentate gyrus by daily electrical stimulation of the amygdala in cats. *Brain Develop.* 1986;8(4):451-3.
23. Namba H, Iwasa H, Kubota M, Hagihara Y, Yamaura A. Changes of Hippocampal Glucose Utilization Subsequent to Amygdaloid-Kindled Generalized Seizures. *Epilepsia.* 1991;32(1):27-32.
24. Wasterlain C, Masuoka D, Jonec V. Chemical kindling: a study of synaptic pharmacology. *Kindling.* 1981;2:315-27.
25. Nagel SJ, Najm IM. Deep brain stimulation for epilepsy. *Neuromodulation: Technology at the Neural Interface.* 2009;12(4):270-80.
26. Theodore WH, Fisher RS. Brain stimulation for epilepsy. *Lancet Neurol.* 2004;3(2):111-8.
27. Ozen L, Young N, Koshimori Y, Teskey G. Low-frequency stimulation reverses kindling-induced neocortical motor map expansion. *Neuroscience.* 2008;153(1):300-7.
28. Wang Y, Xu Z, Cheng H, Guo Y, Xu C, Wang S, et al. Low-frequency stimulation inhibits epileptogenesis by modulating the early network of the limbic system as evaluated in amygdala kindling model. *Brain Struct Funct.* 2014; 219(5): 1685-96.
29. Cuellar-Herrera M, Velasco M, Velasco F, Velasco AL, Jimenez F, Orozco S, et al. Evaluation of GABA system and cell damage in parahippocampus of patients with temporal lobe epilepsy showing antiepileptic effects after subacute electrical stimulation. *Epilepsia.* 2004;45(5):459-66.
30. Mantovani M, Van Velthoven V, Fuellgraf H, Feuerstein TJ, Moser A. Neuronal electrical high frequency stimulation enhances GABA outflow from human neocortical slices. *Neurochem Int.* 2006;49(4):347-50.
31. Windels F, Bruet N, Poupard A, Urbain N, Chouvet G, Feuerstein C, et al. Effects of high frequency stimulation of subthalamic nucleus on extracellular glutamate and GABA in substantia nigra and globus pallidus in the normal rat. *Eur J Neurosci.* 2000;12(11):4141-6.
32. Durand DM, Warman EN. Desynchronization of epileptiform activity by extracellular current pulses in rat hippocampal slices. *J Physiol.* 1994;480(Pt 3):527-37.
33. Frerking M, Borges S, Wilson M. Variation in GABA mini amplitude is the consequence of variation in transmitter concentration. *Neuron.* 1995;15(4):885-95.
34. Nusser Z, Hajos N, Somogyi P, Mody I. Increased number of synaptic GABA<sub>A</sub> receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature.* 1998;395(6698):172-7.
35. Banks MI, Hardie JB, Pearce RA. Development of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents in hippocampus. *J Neurophysiol.* 2002;88(6):3097-107.
36. Cherubini E, Conti F. Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends in Neurosciences.* 2001;24(3):155-62.
37. Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Höger H, et al. Structure and subunit composition of GABA<sub>A</sub> receptors. *Neurochemistry international.* 1999;34(5):379-85.
38. Hefft S, Jonas P. Asynchronous GABA release generates long-lasting inhibition at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *Nature neuroscience.* 2005;8(10):1319-28.
39. Keros S, Hablitz JJ. Subtype-specific GABA transporter antagonists synergistically modulate phasic and tonic GABA<sub>A</sub> conductances in rat neocortex. *Journal of neurophysiology.* 2005;94(3):2073-85.

40. Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR, Mody I. Perisynaptic localization of  $\delta$  subunit-containing GABAA receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *The Journal of neuroscience*. 2003;23(33):10650-61.
41. Barberis A, Mozrzymas JW, Ortinski PI, Vicini S. Desensitization and binding properties determine distinct  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  and  $\alpha 3\beta 2\gamma 2$  GABAA receptor-channel kinetic behavior. *European Journal of Neuroscience*. 2007;25(9):2726-40.
42. Poisbeau P, Cheney MC, Browning MD, Mody I. Modulation of synaptic GABAA receptor function by PKA and PKC in adult hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience*. 1999;19(2):674-83.
43. Albensi BC, Ata G, Schmidt E, Waterman JD, Janigro D. Activation of long-term synaptic plasticity causes suppression of epileptiform activity in rat hippocampal slices. *Brain research*. 2004;998(1):56-64.

# The Effect of Low-Frequency Stimulation on CA1 Neurons GABAergic Currents in Hippocampal Slices of Kindled Rats

**Azam Asgari**

PhD Student of physiology, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Saeed Semnanian**

Professor, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran,

**Nafiseh Atapour**

Professor, Neuroscience Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

Department of Medicine (Royal Melbourne Hospital), Melbourne Brain Centre, University of Melbourne, Parkville, VIC, Australia

**Amir Shojaei**

PhD Student, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Vahid Sheibani**

Professor, Neuroscience Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

**Javad Mirnajafi-Zadeh**

Professor, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received:2/01/2016, Revised:11/02/2016, Accepted:13/04/2016

## \*Corresponding author:

Javad Mirnajafi-Zadeh  
Tehran, Tarbiat Modares  
University, Faculty of Medical  
Sciences, Department of  
Physiology, Dr Javad Mirnajafi-  
Zadeh  
E-mail: mirnajaf@modares.ac.ir

## Abstract

**Background and purpose:** Low frequency stimulation (LFS) has anticonvulsant effect. However, its mechanism of action has not been completely determined. In the present study the effect of LFS on evoked inhibitory post synaptic GABAergic currents (eIPSC) is investigated in CA1 pyramidal neurons of the hippocampus in kindled rats.

**Materials and Methods:** In this experimental study animals were kindled through electrical stimulation of amygdala. 24 hours following fully kindling achievement in 20 Wistar rats, the effect of LFS on eIPSCs was assessed in hippocampal slices.

**Results:** Obtained results showed that application of LFS at 200 pulses and at the intensity of 1.5 threshold, increased the amplitude and decay time constant of eIPSCs in both control and kindled rats. When 200 pulses of LFS were administered with an intensity equal to threshold, only eIPSC amplitude was increased in both control and kindled groups significantly ( $P < 0.001$ ). Comparing the effectiveness of LFS on control and kindled groups showed that 200 pulses of LFS at the intensity of 1.5 threshold had higher effect in control than kindled group ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** Results of the present study showed that LFS application increased eIPSCs parameters in a pulse number and intensity dependent manner. This increment can be considered as a possible anticonvulsant mechanism of LFS.

**Keywords:** Epilepsy, Low-frequency stimulation, GABAergic current, Hippocampus, Kindling