

بررسی تأثیر امواج الکترومغناطیسی کم فرکانس rTMS بر روی مدل صرعی ناشی از کیندلینگ در موش صحرایی

علی یدالله پور^۱، سید محمد فیروزآبادی^{۲*}، سید جواد میر نجفی زاده^۳

۱- دانشجوی دکتری تخصصی فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲- دانشیار گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳- دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۸۷/۲/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲

چکیده

مقدمه: تحریک عصبی یک تکنیک جدید نویدبخش برای درمان تشنجهای مقاوم به درمان دارویی می‌باشد. تحریک مغناطیسی مکرر از راه مجامه ساده، غیرتهاجمی و ارزان است و کاربرد گسترده در نوروفیزیولوژی دارد. در چند مطالعه اثرات درمانی این تکنیک در فرکانس های مختلف، در درمان صرع نتایج واضحی نداشت. فرکانسهای پایین (هرتز ≤ 1) تحریک مغناطیسی مکرر خاصیت بازداری و فرونشانی فعالیت سیستم عصبی را دارا می‌باشد و تحریک‌پذیری قشر مغز را کاهش می‌دهد. در صرع، بعنوان یک بیماری شایع سیستم عصبی، تحریک‌پذیری قشر مغز افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد این تکنیک در فرکانسهای بهینه قابلیت‌های درمانی در بیماری صرع داشته باشد.

مواد و روشها: در این تحقیق اثر فرکانسهای ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ هرتز تحریک مغناطیسی از راه مجامه روی روند کیندلینگ ناحیه آمیگدال در موش صحرایی در شدت ۸۰٪ آستانه حرکتی (در حالت استراحت) و فرکانس ۱ هرتز با شدت ۹۰٪ و ۱۰۰٪ آستانه حرکتی حیوان در مختصات بهینه فضایی تحریک بررسی شد. مختصات فضایی بهینه تحریک با استفاده از بسته نرم‌افزاری MATLAB و ثبت‌های عملی بدست آمد. پروسه تحریک به مدت ۵ دقیقه حداکثر ۵ دقیقه پس از تحریک الکتریکی پروسه کیندلینگ و در هر روز، توسط کوئل مغناطیسی پروانه‌ای شکل به قطر ۲۵ میلی‌متر در مختصاتی که در آن مختصات بیشینه میدان اعمالی در ناحیه آمیگدال ایجاد شود، اعمال شد. تعداد روزهای لازم برای رسیدن به مراحل ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ کیندلینگ و امواج تخلیه متعاقب در هر روز و درصد امواج تخلیه متعاقب جمع‌ی گروه‌های درمانی با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفت. از دو گروه برای بررسی اثر شدت میدان مغناطیسی استفاده شد که با فرکانس یک هرتز و شدت ۹۰٪ و ۱۰۰٪ آستانه حرکتی حیوان پروسه تحریک با همان پارامترهای قبلی اعمال شد.

نتایج: فرکانس یک هرتز تحریک با شدت ۸۰٪ و ۹۰٪ آستانه حرکتی اثرات بازداری محسوسی در گسترش تحریک به نواحی دیگر مغز، نسبت به گروه کنترل از خود نشان دادند. افزایش شدت میدان اعمالی از ۸۰٪ به ۹۰٪ شدت آستانه اثر بازداری این تکنیک را افزایش داد، اما این افزایش روند منظمی را با افزایش شدت به ۱۰۰٪ آستانه حرکتی دنبال نکرد و اثر بازداری در این شدت به طور محسوسی کاهش پیدا کرد.

بحث و نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد فرکانس تحریک rTMS و آستانه حرکتی حیوان نقش مهمی در ایجاد اثرات فیزیولوژیکی داشته باشد. این تحقیق نشان داد که تکنیک rTMS در فرکانس و شدت‌های خاص اثرات درمانی روی بیماری صرع می‌تواند داشته باشد. (مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۴، شماره ۱۶ و ۱۷، پاییز و زمستان ۸۶: ۷۵-۸۹)

واژگان کلیدی: تحریک مغناطیسی از راه مجامه، کیندلینگ، کوئل پروانه‌ای، صرع

* نویسنده مسؤول: سیدمحمد فیروزآبادی

آدرس: گروه فیزیک پزشکی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

تهران pourmir@modares.ac.ir

تلفن: ۸۲۸۸۳۸۲۱ (۲۱) ۹۸+، شماره: ۱۳۰۱۳۰ (۲۱) ۹۸+

۷۵ / مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۴، شماره ۱۶ و ۱۷، پاییز و زمستان ۸۶

۱- مقدمه

تحریک مغناطیسی از راه مجموعه تکنیکی غیرتهاجمی برای تحریک بافت‌های تحریک‌پذیر از جمله مغز می‌باشد. در این تکنیک یک جریان خیلی قوی، در حدود ۵ کیلوآمپر، از طریق خازنهای تخلیه بار در یک کویل، با دوره دوام ۱۶۰-۲۰۰ میکروثانیه شارش می‌یابد [۱]. این عمل یک میدان مغناطیسی متغیر با زمان ایجاد کرده که این میدان متغیر با زمان بر اساس معادله سوم ماکسول و قانون القای فاراده، در محیط اطراف کویل تولید یک میدان الکتریکی می‌کند. بزرگی این میدان الکتریکی می‌تواند به اندازه‌ای باشد که چگالی جریان القایی ناشی از آن در بافت مغز، باعث ایجاد تخلیه‌های نوری و ایجاد پتانسیل عمل و در نتیجه تغییرات فیزیولوژیکی شود. تحریک مغناطیسی مکرر (rTMS) به اعمال منظم قطارهای پالس مغناطیسی فوق گفته می‌شود که برای یک دوره زمانی مشخصی تکرار می‌شوند. در حال حاضر محدوده فرکانسی اعمالی از ۰/۱ تا ۱۰۰ هرتز قابل حصول است. این تکنیک بر اساس پارامترهای فیزیکی مختلف تحریک می‌تواند سبب تحریک، اصلاح و یا اختلال عملکرد مغز شود [۲]. امروزه از این تکنیک به طور گسترده در کارهای تحقیقاتی تشخیصی و درمانی مربوط به سیستم عصبی مرکزی و محیطی استفاده می‌شود [۲-۵].

برطبق اثرات فیزیولوژیکی متفاوت، بین فرکانس کم (≥ 1 هرتز) و فرکانس زیاد (هرتز > 1) rTMS تمایز مشخصی وجود دارد [۲]. به طور کلی می‌توان گفت که فرکانسهای کم rTMS اثرات فرونشانی و مهارتی فعالیت عصبی و متابولیسمی مغز را نشان می‌دهند [۳]، اما فرکانسهای بالای rTMS اثرات فعالسازی و افزایش تحریک‌پذیری فعالیت نوری را از خود نشان می‌دهند [۴].

صرع^۲ یک بیماری سیستم عصبی است که حدود ۱/۵٪ از جمعیت بشر به آن مبتلا می‌باشند. این بیماری بوسیله انواع مختلف حملات عود کننده^۳ الکتروگرافیک مشخصه‌بندی می‌شود. این حملات از مغز منشأ می‌گیرد و به طور پیشرونده از کانون شروع به نواحی مختلف مغز و حتی به کل ناحیه مغز گسترش می‌یابد. این بیماری انواع مختلف دارد اما از لحاظ خواص الکتروفیزیولوژیکی همه آنها یک ویژگی مشترک دارند؛ در بیماری صرع تحریک‌پذیری قشری مغز افزایش می‌یابد [۶].

نشان داده شده است که rTMS با فرکانسهای کم ۰/۳ و ۰/۵ هرتز می‌تواند اثرات درمانی روی صرع داشته باشد. این تکنیک در این فرکانسها سبب فرونشانی فعالیت نوری و کاهش تحریک‌پذیری قشری مغز در انسان شد [۷،۸]. اثرات مهارتی و تحریکی ناشی از rTMS به شدت میدان، فرکانس، دوام قطار پالس اعمالی و نیز مدت زمان بین هر قطار پالس بستگی دارد که بیشترین بستگی به فرکانس اعمالی وجود دارد [۵،۷،۸،۹].

در حال حاضر از داروهای ضد تشنجی و نیز در بعضی موارد از جراحی برای مقابله با این بیماری استفاده می‌شود. هر کدام از این روشها اثرات جانبی مخصوص به خود را دارا می‌باشند. همچنین بعضی از انواع صرع مقاوم به دارو نیز وجود دارند که گزینه جراحی نیز در درمان آنها نامناسب می‌باشد. به دلیل مزیت بالای این تکنیک که بدون درد و اثرات جانبی بوده و نیز ارزان می‌باشد، بدست آوردن پارامترهای بهینه این روش شامل فرکانس، شدت، مدت اعمال پالس و نیز فاکتورهای فضایی قرارگیری کویل می‌تواند نتایج سودمندی در جایگزینی یا الحاق این روش با روشهای معمول درمان صرع که اثرات جانبی زیادی دارند، داشته باشد. بر خلاف تحریک الکتریکی که برای درمان صرع استفاده می‌شود و

2- Epilepsy
3- Seizure

1- Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation



شکل ۱- کویل تحریکی و تحریک کننده

برای بدست آوردن مختصات فضایی بهینه تحریک بنحوی که ماکزیمم تحریک اعمالی در کانون صرع (ناحیه آمیگدال) باشد، با دست داشتن پارامترهای فیزیکی کویل، معادله کویل مورد استفاده در مختصات سه بعدی بدست آمد. کویل در فضای سه بعدی در نقطه $R_{mp} = (X_0, Y_0, Z_0)$ قرار داده شد به نحوی که در جهت صفحه X-Y با جهت دهی بالهای کویل در طول محور X قرار می گیرد. مراکز بالها در نقاط $R_{W\pm} = R_{mp} \pm (X_C, 0, 0)$ می باشد به طوریکه X_C ، فاصله مرکز بال از مرکز کویل معلوم می باشد. با استفاده از معادله کلی شکل کویل (معادله ۱) و با توجه به شرایط مرزی مختصات فضایی برای هرکدام از بالها، بالهای کویل بوسیله معادله ۲ داده می شود.

$$r(\theta) = \alpha\theta + r \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \theta=0 &\rightarrow r=r_a \rightarrow r_0=r_a & \theta=2\pi*n &\rightarrow r=r_b \rightarrow \alpha=r_b-r_a/2\pi n \\ R(\theta) &= (r_b-r_a/2\pi n)\theta + r_a \\ R_p(\theta) &= R(x,y,z) \rightarrow \end{aligned}$$

$$R_{p\pm}(\theta) = (r_a \cos\theta, r_a \sin\theta, 0) + \frac{r_b-r_a}{2\pi n} \times |\theta - \theta_{0\pm}| (\cos\theta, \sin\theta, 0) + R_{W\pm} \quad (2)$$

مکان تحریک تا حد قابل قبولی معین دارد، متأسفانه در rTMS مکان تحریک به طور دقیق معلوم نیست و در تحقیقات گذشته پارامترهای مختلف تحریک (فرکانس، شدت میدان، دوره اعمال تحریک و غیره) به دقت مورد بررسی قرار نگرفته است. کیندلینگ^۱ مدلی استاندارد برای مطالعه اثرات عوامل درمانی مختلف در بیماری صرع و تشنج های ناشی از آن می باشد [۱۰]. استفاده از داروهای شیمیایی توانسته بر کمیتهای الکتروفیزیولوژیکی و رفتاری تشنج در مدل کیندلینگ اثرات قابل ملاحظه ای بگذارد [۱۰، ۱۱]. اعمال کمیت های فیزیکی نیز مانند استفاده از میدان مغناطیسی ۵۰ هرتز، اثر مهاری ضعیفی را بر فرآیند تشنج حاصل از کیندلینگ نشان داده است [۱۲]. اما تاکنون گزارشی در مورد اثرات rTMS در فرکانسها و شدتهای مختلف بر پارامترهای تحریک پذیری عصبی در حالت تشنج منتشر نشده است.

در این تحقیق اثرات درمانی فرکانسهای ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ هرتز rTMS در مختصات فضایی بهینه کویل تحریک، بر پارامترهای تشنجی در مدل صرعی کیندلینگ الکتریکی ناحیه آمیگدال بررسی شد. همچنین نقش شدت میدان اعمالی با اعمال شدت میدان ۸۰٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪ آستانه حرکتی^۲ حیوان در بروز میزان اثر بررسی شد.

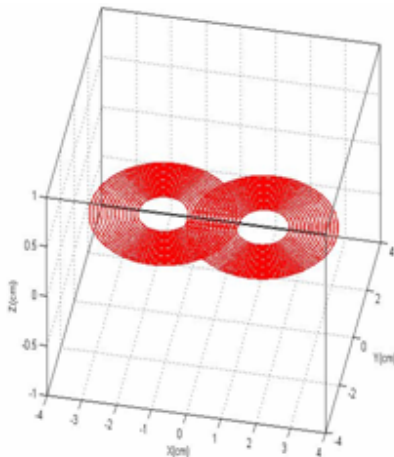
۲- مواد و روشها

۲-۱- مختصات فضایی بهینه تحریک مغناطیسی

برای اعمال تحریک مغناطیسی از تحریک کننده مغناطیسی MAGSTIM RAPID ساخت کارخانه MAGSTIM و کویل پروانه ای شکل با قطر ۲۵ میلی متر استفاده شد شکل (۱).

1- Kindling
2-Motor Threshold

دهند. طول کلی سیم پیچ برابر با L می باشد. با استفاده از نرم افزار MATLAB شکل کویل در مختصات سه بعدی کارترین شبیه سازی شد شکل (۳). میدان مغناطیسی حاصل از عبور جریان در کویل، در فضای اطراف کویل با مختصات R با استفاده از قانون بیو-ساواریت بدست آمد (معادله (۳)).



شکل ۳- کویل ۲۵ میلی متری مدل شده در مختصات کارترین

$$B(R) = \frac{\eta_0 I}{4\pi} \int_0^L \frac{dl \times (R - R_p)}{|R - R_p|^3} \quad (3)$$

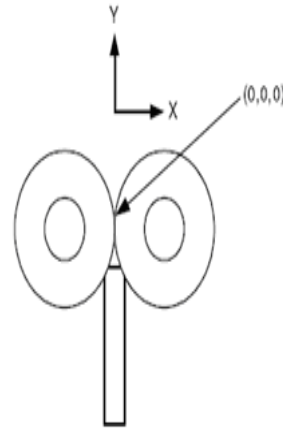
در معادله بالا η_0 تراوایی مغناطیسی فضای آزاد و I جریان الکتریکی داخل سیم پیچ کویل می باشد. با تبدیل انتگرال بالا به صورت سری و تبدیل مسیر انتگرال گیری به فواصل بسیار کوچک Δl خواهیم داشت [۱۳]:

که در معادله بالا برای مقادیر \hat{l}_i ، Δl_i ، b و c داریم:

$$\hat{l}_i = \left(\frac{R_{pi+1} - R_{pi}}{R_{pi+1} - R_{pi}} \right)$$

$$\Delta l_i = |R_{pi+1} - R_{pi}|$$

$$c = |R - R_p - l_i \hat{l}_i|^2 \quad \text{و} \quad b = -2(R - R_{pi}) \cdot \hat{l}_i$$

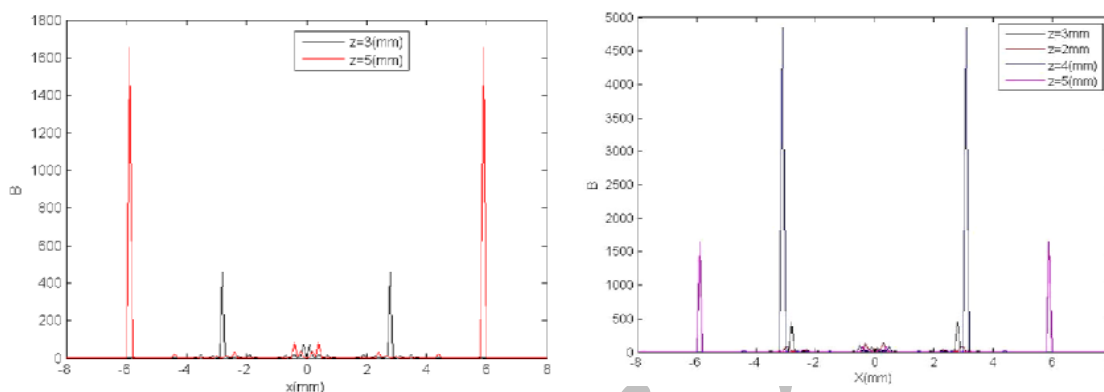


شکل ۲- مختصات قرارگیری کویل در فضای کارترین

در معادلات بالا Γ_a و Γ_b شعاع داخلی و شعاع خارجی کویل می باشد. θ زاویه قطبی بردار مختصات نقطه مورد نظر و $\theta_{0\pm}$ فاز اولیه می باشد که برای بال چپ $0 \leq \theta \leq 2\pi n_{round}$ و برای بال راست با استفاده از تقارن موجود بین دو بال $\theta_{0+} = 0$ با قرینه کردن مولفه X معادله ۱ بدست می آید. $R_{p\pm}(\theta)$ بردار مکان سیم پیچ کویل در نقطه ای با زاویه θ می باشد. با تقسیم این دامنه پارامتر به فواصل کوچک که توسط $i, i=1,2,3,..,N$ معین می شود، سیم پیچ کویل به عناصر با طول کوچک تقسیم می شود که بردارهای مکان آنها، $R_{p\pm}(\theta_i)$ ، با استفاده از معادله ۲ بدست می آید. این مجموعه بردارها ژئومتری کویل را در صفحه $X-Y$ بیان می کند. مختصات فضایی نقاط اتصال سیم پیچ در دو بال سمت چپ و راست به صورت دستی به مجموعه نقاط ژئومتری کویل $R_{p\pm}(\theta_i)$ اضافه می شود. ساختار کویل به صورتی است که نقطه انتهایی یک بال (بال چپ) به نقطه شروع (ابتدایی) بال دیگر (بال راست) وصل می شود. بنابراین هر دو بال بصورت سری به یکدیگر متصل می شوند و یک مدار مسیر جریان پیوسته را تشکیل می

امواج rTMS بر روی مدل صرعی ناشی از کیندلینگ

$$B(R) = \frac{\mu_0 I}{4\pi} \sum_{i=1}^{2N+2} \int_0^{\Delta l_i} \frac{\hat{l}_i \times (R - R_{pi})}{|R - R_p - l \hat{l}_i|^3} dl = \frac{\mu_0 I}{4\pi} \sum_{i=1}^{2N+3} \frac{2 \left[\hat{l}_i \times (R - R_p) \right]}{4c - b^2} \times \left\{ \frac{2\Delta l_i + b}{\Delta l_i^2 + b\Delta l_i + c} - \frac{b}{\sqrt{c}} \right\} \quad (4)$$



شکل ۴- توزیع میدان مغناطیسی در اطراف کویل در فواصل مختلف از سطح کویل

مغز انسان برای کویل پروانه ای شکل به گونه ای است که بیشینه میدان الکتریکی و نیز جریان الکتریکی القایی در راستای محور عمود بر محور کویل (محور Y در شکل ۲) می باشد.

$$\nabla \times E = -\frac{\partial B}{\partial t} \quad (5)$$

با استفاده از مدل‌سازیهای بالا مختصات تقریبی نقطه‌ای (نسبت به کویل) که در آن میدان القایی در مغز بیشینه می باشد را بدست آورده که با ثبت الکتروانسفالوگرام مختصات دقیق این نقطه بدست می آید.

جهت فیکس کردن حیوان به هنگام اعمال تحریک rTMS از یک فیکس کننده از جنس شیشه فشرده (پلکسی گلاس) استفاده شد، جهت ثابت نمودن سر حیوان برشهای خاصی روی فیکس کننده ایجاد شد تا حرکات سر حیوان به حداقل برسد شکل (۵).

با استفاده از بسته نرم افزاری MATLAB و روش عددی میدان مغناطیسی در اطراف کویل بدست آمد. شدت میدان در

روی خطوط موازی محور X ها و در فواصل متفاوت از سطح کویل (z=0) بدست آمد. با توجه به شکل بدست آمده میدان مغناطیسی در اطراف کویل پروانه‌ای در راستای محور موازی با صفحه کویل (محور X در شکل ۲)، و در فواصلی بین قطر داخلی و خارجی ماکزیمم می باشد. همچنین شدت میدان مغناطیسی با افزایش فاصله از سطح کویل ابتدا به سرعت افزایش یافته و سپس کاهش می یابد شکل (۴). توزیع میدان اطراف کویل به شدت تابع شکل فضایی و پارامترهای فیزیکی کویل می باشد.

میدان الکتریکی القایی ناشی از میدان مغناطیسی توسط معادله دوم ماکسول بدست می آید (معادله ۵). شکل میدان القایی در



شکل ۵- فیکس کردن حیوان جهت تحریک مغناطیسی

۲-۲- جراحی حیوان و تحریک الکتریکی

از موش صحرایی از نژاد Wistar با محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. دوره تاریکی و روشنی ۱۲ ساعته رعایت شد و غذا آزادانه در اختیار حیوان بود. برای بیهوشی، کتامین (mg/kg) (۱۰۰) و زایلازین (mg/kg) (۲۰) به صورت داخل صفاقی تزریق می‌شدند. از یک الکتروود سه قطبی از جنس فولاد زنگ نزن با روپوش تفلون برای ثبت و تحریک و از دو الکتروود تک قطبی مسی بعنوان زمین و تفاضلی استفاده شد. پس از فیکس کردن سر حیوان در دستگاه استریوتاکسی (Narishige, Japan) و مشخص کردن نقطه برگما^۱، بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون، مختصات قشر آمیگدال (میلی متر $Ap = +2/5$ ، میلی متر $L = \pm 4/5$ و میلی متر $V = 7/5$) نسبت به پرده سخت شامه) که محل قرار گیری نوک الکتروود سه قطبی است تعیین شده [۱۳] و الکتروود سه قطبی در این مختصات با سیمان دندان پزشکی فیکس شد. دو الکتروود تک قطبی بوسیله پیچ های متصل به آنها به سطح مجموعه محکم می‌شدند. در پایان کار گذاری الکتروودها، پین های متصل به آنها داخل مادگی سوکت مخابراتی قرار داده می‌شد و سوکت توسط سیمان دندان پزشکی بر روی

سر حیوان متصل می‌گردد و پوست سر در سمت پس سری بخیه زده می‌شد. پس از جراحی، یک هفته تا ده روز به حیوان جهت ترمیم زخم ها استراحت داده می‌شد. برای تعیین شدت آستانه، ابتدا حیوان توسط جریانی با شدت ۱۰ میکروآمپر تحریک می‌شد. اگر امواج تخلیه متعاقب^۲ (حداقل به مدت ۵ ثانیه) در الکتروانسفالوگرام^۳ ثبت می‌شدند، این شدت به عنوان شدت آستانه^۴ در نظر گرفته می‌شد. در غیر این صورت هر ۵ دقیقه یک بار شدت جریان ۱۰ میکروآمپر افزایش می‌یافت تا اینکه امواج تخلیه متعاقب ثبت گردد. پس از آن حیوان با شدت جریان آستانه هر ۲۴ ساعت یکبار تحریک می‌شد تا کیندل شود. در این تحقیق ملات زمان امواج تخلیه متعاقب^۵، امواج تخلیه متعاقب تجمعی^۶ و مرحله تشنج^۷ بر اساس تقسیم بندی Racine بعنوان کمتهای مورد آنالیز استفاده شد [۱۴].

- 2- After Discharge
- 3- Electroencephalogram
- 4- After Discharge Threshold
- 5- After Discharge Duration
- 6- Cumulative ADD
- 7- Seizure Stage

1-Bregma

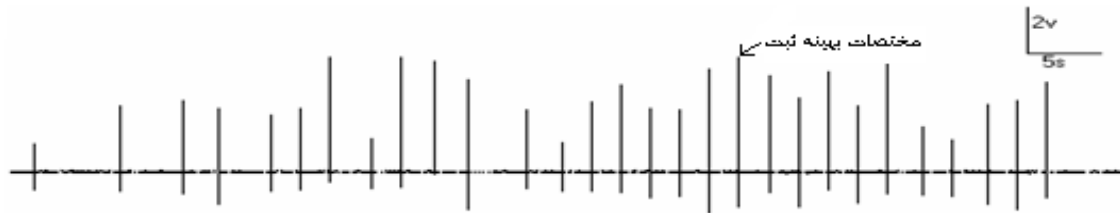
یک پالس مغناطیسی اعمال شده و دامنه میدان الکتریکی حاصله مربوط به آن ثبت می‌شد. ثبت میدان الکتریکی حاصل در هسته آمیگدال با استفاده از الکتروُد تک قطبی ثبت در این ناحیه انجام شد. الکترودهای زمین و تفاضلی کاشته شده در سر حیوان مانع از تداخل نویزهای محیطی با شرایط آزمایش می‌شد. ثبت حاصل توسط سیم شیلددار به آمپلی فایر و از آنجا توسط بورد آنالوگ به دیجیتال^۱ به کامپیوتر منتقل شده و ذخیره گردید. با حرکت کوئل در فواصل مختلف نسبت به مجموعه حیوان ثبتهای مختلف انجام شد و پیکهای الکتروانسفالوگرام حاصل از آن با هم مقایسه گردید (شکل ۶). مختصات فضایی نقطه ای که بیشترین مقدار ثبت (از لحاظ دامنه) را بدهد بدست آمد و کوئل در همان فاصله ثابت گردید. سپس با حرکت گام به گام کوئل در زوایای مختلف نسبت به صفحه موازی با سطح جمجمه حیوان روند فوق تکرار شده و دامنه های الکتروانسفالوگرام با هم مقایسه و بزرگترین دامنه انتخاب شد و در این مختصات فضایی کوئل ثابت شد (شکل ۵). این مختصات برای تمام گروههای آزمایشی ثابت بود. در این مختصات سطح کوئل به فاصله ۵ میلی متر از جمجمه حیوان و در زاویه ۴۵ درجه نسبت به خط عمودی که از سطح جمجمه حیوان می گذرد ثابت بود.

۲-۳-آزمایشها

۲-۳-۱- بدست آوردن مختصات فضایی بهینه تحریک

مغناطیسی

از یک گروه ۶ تایی حیوان برای اعتبارسنجی نتایج بدست آمده از شبیه سازی با MATLAB و بدست آوردن مختصات فضایی بهینه قرارگیری کوئل نسبت به جمجمه حیوان استفاده شد. مختصات فضایی بهینه تحریک، مختصاتی می باشد که در آن مختصات، میدان الکتریکی ایجاد شده در کانون صرع (هسته آمیگدال) نسبت به مختصات دیگر بیشینه باشد. این میدان الکتریکی بیشینه به صورت ماکزیمم دامنه امواج مغزی حیوان (EEG) تعریف شد. در واقع هدف بدست آوردن مختصاتی بود که قرار دادن کوئل در آن مختصات، بیشینه میدان الکتریکی (ماکزیمم دامنه EEG) در کانون صرع اعمال شود. این ماکزیمم میدان با مقایسه اندازه دامنه های EEG ثبت شده در نرم افزار ثبت بدست آمد (شکل ۶). در این آزمایش حیوان با دز کم کتامین بیهوش شد و در داخل نگهدارنده قرار داده شد و با استفاده از اهرمهای مخصوص سرش ثابت شده تا هیچگونه حرکتی نداشته باشد. کوئل در مختصات تقریبی بدست آمده در شبیه سازی نسبت به سطح جمجمه حیوان قرار داده شد به گونه ای که هسته آمیگدال در راستای شکاف کوئل (موازی محور Y در شکل ۲) و فاصله ای در حدود ۰/۵ سانتی متر از سطح جمجمه قرار گیرد که این فاصله، فاصله تقریبی از سطح کوئل می باشد که میدان ماکزیمم را بدست می دهد. سپس الکتروُد تک قطبی برای ثبت میدان الکتریکی القاء شده از میدان مغناطیسی در هسته آمیگدال به سر حیوان وصل شد. در این مختصات میدان مغناطیسی پالسی اعمال شد. ابتدا با تغییر گام به گام فاصله سطح کوئل از سطح جمجمه حیوان، در هر مرحله



شکل ۶- ثبت EEG جهت بدست آوردن مختصات بینه. مختصاتی که بیشترین دامنه در آن بدست آمد، بعنوان مختصات قرارگیری کوئل برای تحریک استفاده شد.

۲-۳-۲- بدست آوردن آستانه حرکتی^۱

زیر سیستم تحریک قرار داده شد، همانند گروههای آزمایشی، اما تحریک مغناطیسی اعمال نشد. در گروه دوم کنترل حیوانات به طور عادی تحریک الکتریکی کیندلینگ شده و در نگهدارنده قرار گرفتند و پارامترهای کیندلینگ مورد نظر در هر دو گروه ثبت شد. در هر گروه از شش سر موش استفاده گردید. با توجه به اینکه این دو گروه اختلاف آماری معنی داری با آماره آزمون $p < 0/5$ با هم نداشتند از گروه کنترل با اتر بعنوان گروه کنترل در آنالیز آماری استفاده شد.

۲-۳-۳-۴- گروههای درمانی

از چهار گروه آزمایشی برای بررسی اثر فرکانس تحریک در فرکانسهای ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ هرتز rTMS روی روند کیندلینگ ناحیه آمیگدال استفاده شد. به این ترتیب که هر روز پس از تحریک الکتریکی با شدت آستانه، حداکثر تا ۵ دقیقه پس از تحریک حیوانات را با دز بسیار کم اتر بیهوش کرده و در نگهدارنده فیکس کرده و به مدت ۵ دقیقه تحت تابش مغناطیسی در مختصات فضایی از پیش تعیین شده قرار گرفتند. تمام حیوانات با شدت ۸۰٪ آستانه حرکتی هر حیوان تحت تابش مغناطیسی قرار گرفتند. پارامترهای تحریک مغناطیسی نظیر فرکانس و مدت زمان توسط پورت BNC از استیمولاتور (Nihon Kodens, SEN 720, Japan) به قسمت Trigger in استیمولاتور مغناطیسی اعمال شد. نتایج بدست آمده از این گروهها با گروه کنترل مقایسه گردید (جدول ۱).

با توجه به اینکه تحریکها در تمام گروهها به صورت درصدی از آستانه حرکتی حیوان اعمال می شد، آستانه حرکتی هر حیوان به صورت رفتاری تعیین گردید. حیوانات پس از بهبودی از جراحی روزانه حدود ۱۵ دقیقه داخل محفظه نگهدارنده قرار داده می شد تا از استرسش کاسته شود و به محیط آزمایش عادت کند. پس از ۴ الی ۵ روز پس از قرار دادن حیوان در نگهدارنده، بتدریج سر حیوان فیکس می شد. پس از فیکس کردن سر حیوان کوئل تحریکی روی قشر حرکتی عضلات پشتی^۲ به نحوی قرار داده می شد که ماکزیمم میدان اعمالی در این قشر باشد. با شدتهای پائین و به صورت پالسی تحریک اعمال شده و پاسخ انقباضی عضلات پشتی حیوان بررسی شد. شدت میدان را گام به گام افزایش داده تا نقطه ای که اولین انقباض عضلانی اندام پشتی حیوان مشاهده شود. این شدت خروجی دستگاه بعنوان ۱۰۰٪ آستانه حرکتی حیوان (در حالت استراحت) در نظر گرفته می شد.

۲-۳-۳-۲- گروه کنترل

از دو گروه کنترل استفاده شد. در گروه اول حیوانات حداکثر ۵ دقیقه پس از تحریک کیندلینگ با دز بسیار کم با اتر بیهوش شده و در نگهدارنده سر حیوان فیکس شده به مدت ۵ دقیقه در

1- Resting Motor Threshold
2- Hind Limb area

امواج rTMS بر روی مدل صرعی ناشی از کیندلینگ

از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون پس از تجربه توکی از بسته نرم افزاری statistica برای آنالیز آماری استفاده شد. برای مقایسه تعداد تحریکات لازم برای ظهور مراحل یک تا پنج تشنج در گروه های آزمایش نسبت به گروه کنترل و مقایسه پارامترهای تشنجی دیگر نیز از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد.

با اتمام آزمایشات مربوط به بررسی اثر فرکانسهای مختلف، از دو گروه برای بررسی اثر شدت میدان مغناطیسی استفاده شد. بدینصورت که در فرکانسی که بیشترین اثر درمانی مشاهده گردید (فرکانس یک هرتز) با شدتهای ۹۰٪ و ۱۰۰٪ آستانه حرکتی حیوان با همان پارامترهای فیزیکی تحریک یکسان تحریک شدند و نتایج بدست آمده از این گروهها با گروه کنترل مقایسه گردید (جدول ۱).

جدول ۱- متوسط امواج تخلیه متعاقب در گروههای مختلف. دادهها بصورت میانگین می باشد.

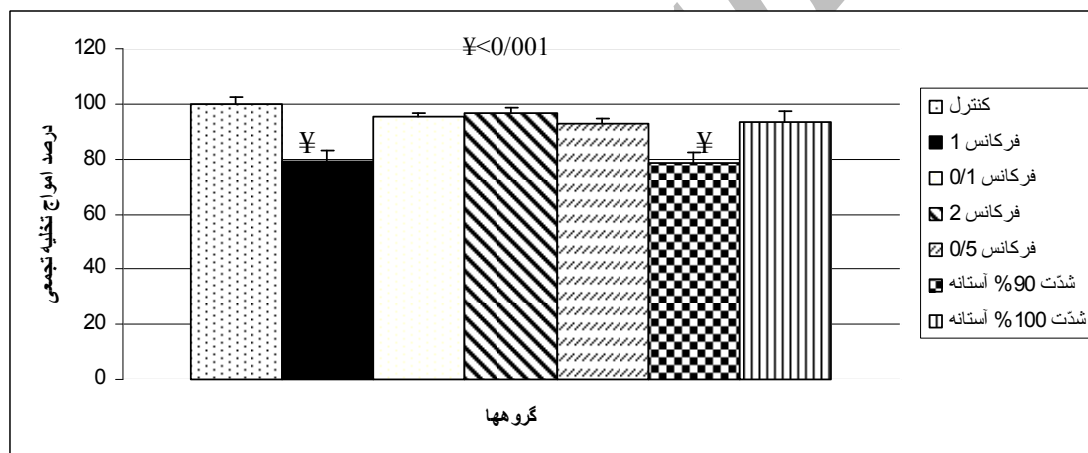
شدت ۱۰۰٪ آستانه	شدت ۹۰٪ آستانه	متوسط امواج تخلیه در روز(به ثانیه)					کنترل	گروههای آزمایشی
		فرکانس ۲	فرکانس ۰/۵	فرکانس ۰/۱	فرکانس ۱	فرکانس ۵		
۷/۵۷	۷/۷۷	۸/۱۳	۸/۸۳	۷/۹۲	۷/۲۲	۸/۲۲	روز ۱	
۱۱/۸۳	۱۰/۶۷	۱۱/۷	۱۰/۹۵	۱۱/۴	۱۱/۷۵	۱۰/۵۳	روز ۲	
۱۶/۲۸	۱۴/۶۷	۱۵/۹۲	۱۵/۵۵	۱۴/۸۵	۱۴/۶۳	۱۶/۰۸	روز ۳	
۲۰/۱۸	۱۷/۶۳	۲۰/۷۲	۱۹/۹۲	۱۸/۷۵	۱۷	۲۱/۲۸	روز ۴	
۲۵/۳۵	۲۱/۱۸	۲۴/۶	۲۲/۸۳	۲۵/۷۸	۲۰/۸	۲۵/۳۷	روز ۵	
۳۰	۲۵/۳۵	۳۳/۷۷	۲۹/۱۵	۳۰/۲۵	۲۳/۵۷	۳۳/۸۸	روز ۶	
۳۵/۲۳	۲۸/۷۲	۳۵/۸۲	۳۶/۳۳	۳۶/۲۷	۳۰/۳۳	۴۲/۰۲	روز ۷	
۳۸/۳۷	۳۲/۲۵	۳۸/۹۲	۳۹/۶۳	۳۸/۷۸	۳۳/۳۵	۴۶	روز ۸	
۴۲/۸۲	۳۴/۹۲	۴۸/۳۸	۴۴/۰۱	۴۵/۴۳	۳۷/۱۳	۴۴/۵	روز ۹	
۴۷/۳۳	۳۹/۱۵	۵۰/۸۳	۴۷/۹۵	۴۹/۱۵	۳۸/۳۳	۵۰/۴	روز ۱۰	
۵۳/۷۷	۴۲/۶۷	۵۱/۳۵	۵۲/۳	۵۴/۸۲	۴۳/۲	۵۶/۵۲	روز ۱۱	
۵۸/۴۵	۴۶/۳۳	۵۴/۸۸	۵۰/۳۷	۵۲/۸	۴۳/۷۸	۵۴/۴۵	روز ۱۲	
۶۲	۵۰/۷۵	۵۳/۵	۵۲/۷	۵۳/۴۸	۴۵/۲۵	۴۷/۴	روز ۱۳	
۶۶/۵	۵۴/۳			۵۲/۸۳	۴۷/۳۸	۵۳/۲۲	روز ۱۴	
۶۸/۹۲	۵۵/۹			۵۵/۰۵	۴۶/۵۲	۴۹/۱	روز ۱۵	
۶۹/۲۲	۵۶/۳۵			۵۳/۱۲	۴۸/۷	۵۵/۲	روز ۱۶	
	۵۸/۳			۵۴/۷	۴۴/۲	۵۴/۱۸	روز ۱۷	
	۵۹/۰۸			۵۶/۳۳		۵۴/۹	روز ۱۸	
						۵/۵۲	روز ۱۹	

۳- نتایج

۳-۱- درصد امواج تخلیه تجمعی

امواج تخلیه تجمعی در هر حیوان از روز اول تحریک تا روزی که در حیوانات گروه کنترل مرحله پنجم تشنج برای اولین بار مشاهده شد (روز دوازدهم)، محاسبه شد. برای هر گروه به صورت میانگین محاسبه شد. گروه اول درمانی با فرکانس یک هرتز و گروه کنترل اختلاف معنی داری با $p < 0/001$ را نشان دادند. همچنین گروه با شدت ۹۰٪ آستانه حرکتی اختلاف معنی

داری با $p < 0/001$ را نشان داد. اما گروههای دیگر اختلاف معنی داری را نشان ندادند شکل (۷). آماره آزمون توکی اختلاف معنی دار بیشتری را بین گروه درمانی با شدت ۹۰٪ آستانه حرکتی و فرکانس یک هرتز با گروه کنترل نسبت به گروه با شدت ۸۰٪ آستانه حرکتی و فرکانس یک هرتز با گروه کنترل نشان داد.



شکل ۷- درصد امواج تخلیه تجمعی در گروههای مختلف به صورت درصدی از مقدار مربوط به گروه کنترل. مقادیر به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین می‌باشد.

۳-۲-۳- مرحله سوم: گروه با فرکانس یک هرتز و شدت ۸۰٪ آستانه با گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان داد ($p < 0/001$). فرکانس ۰/۵ هرتز تحریک با $p < 0/01$ و گروه با شدت ۹۰٪ آستانه حرکتی و فرکانس یک هرتز با گروه کنترل اختلاف معنی داری داشتند ($p < 0/001$). اما گروههای دیگر اختلاف معنی داری با گروه کنترل نداشتند شکل (۸).

۳-۲-۴- مرحله چهارم: گروه اول و گروه چهارم با فرکانس ۰/۵ هرتز با گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان دادند

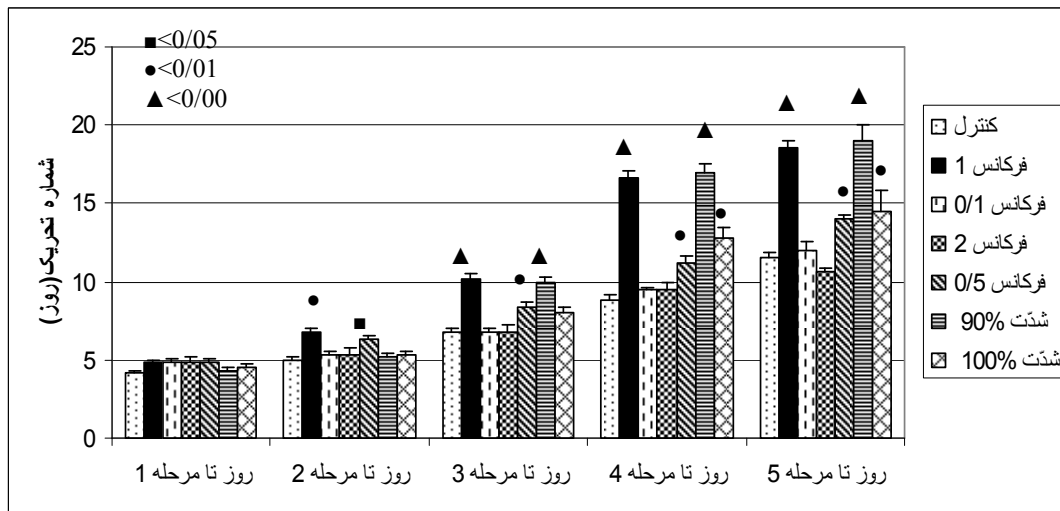
۳-۲- تعداد تحریکات لازم برای رسیدن به مراحل ۱ تا ۵ تشنج

۳-۲-۱- مرحله اول: این کمیت بین گروههای درمانی و کنترل تفاوت معنی داری را با هم نشان نداد.

۳-۲-۲- مرحله دوم: بین گروههای با فرکانس یک هرتز و آستانه ۸۰٪ و ۹۰٪ با گروه کنترل با p -value کوچکتر از ۰/۰۱ و برای گروه با فرکانس ۰/۵ (شدت ۸۰٪) با p -value کوچکتر از ۰/۰۵ با گروه کنترل اختلاف معنی داری وجود داشت. گروههای دیگر اختلافی را نشان نداد شکل (۸).

۳-۲-۵- مرحله پنجم: فرکانس ۱ و ۰/۵ هرتز با گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان دادند ($p < 0/001$ و $p < 0/01$). گروههای درمانی با شدت ۹۰٪ و ۱۰۰٪ آستانه و فرکانس یک هرتز با گروه کنترل با $p < 0/001$ و $p < 0/01$ اختلاف آماری نشان دادند.

شکل (۸). گروههای با شدت ۹۰٪ و $p < 0/001$ و $p < 0/01$ آستانه (فرکانس یک) با گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان دادند ($p < 0/001$ و $p < 0/01$). گروههای دیگر اختلاف معنی داری را نشان ندادند.

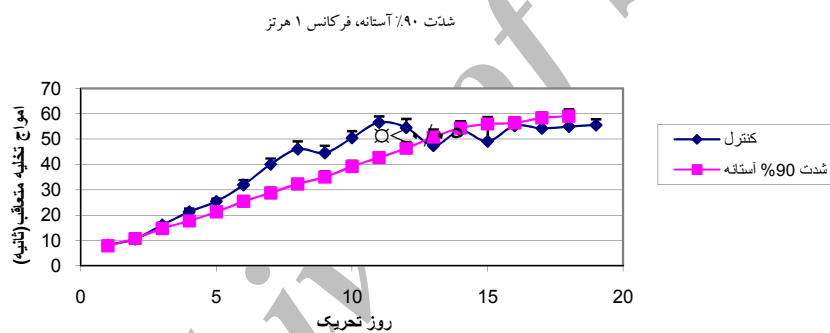
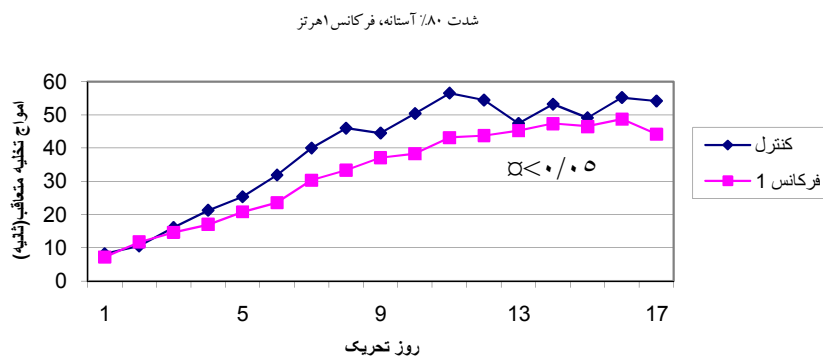


شکل ۸- تعداد تحریکات لازم (تعداد روزهای تحریک) برای بروز مراحل مختلف کیندلینگ در گروههای مختلف. مقادیر به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین می باشد.

آستانه حرکتی با گروه کنترل اختلاف آماری معنی داری داشتند ($p < 0/05$). اما گروههای درمانی دیگر اختلاف معنی داری با گروه کنترل از خود نشان ندادند (شکل (۹)).

۳-۳- امواج تخلیه متعاقب در هر روز

امواج تخلیه میانگین در هر روز تا روز دوازدهم در تمام گروهها مقایسه آماری شد. فرکانس یک هرتز با شدت ۸۰٪ و ۹۰٪



شکل ۹- میانگین امواج تخلیه در هر روز در گروه‌های مختلف. مقادیر به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین می‌باشد.

۴- بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که rTMS در فرکانسهای یک و نیم هرتز باعث کاهش روند کیندلینگ آمیگدال می‌شود که فرکانس یک هرتز اثر بهتری از خود نشان داد. این اثر بازداری برای فرکانس یک هرتز در شدتهای مختلف تغییر می‌کند با افزایش شدت از ۸۰٪ به ۹۰٪ آستانه حرکتی اثرات بازداری تا حدی افزایش پیدا کرده اما این افزایش اثر به صورت منظم نمی‌باشد و

با افزایش شدت به ۱۰۰٪ آستانه حرکتی اثرات بازداری آن به طور محسوسی کاهش پیدا کرد. به نظر می‌رسد که آستانه حرکتی حیوان مقدار بحرانی در بروز اثرات فرونشانی فعالیت سیستم عصبی برای شدتهای مختلف می‌باشد که البته نیاز به انجام آزمایشات بیشتر در شدتهای بالای آستانه حرکتی برای بررسی این نظریه می‌باشد. با افزایش فرکانس تحریک از ۰/۵ به یک هرتز اثر فرونشانی به طور محسوسی افزایش پیدا کرد. به

مطالعه حاضر متفاوت بود. با توجه به موارد بالا می‌توان ادعا کرد که تابش rTMS باعث ترشح و افزایش غلظت مواد شبه افیونی در مایع مغزی-نخاعی می‌شود. این مواد شبه افیونی دارای خاصیت ضدتشنجی می‌باشند و این افزایش غلظت آنها می‌تواند تا چندین دقیقه بعد از اتمام تابش rTMS به طول بکشد [۱۸]. در مورد مکانیسمهای عمل این تکنیک نظریه‌های دیگری نیز مطرح می‌باشد از جمله این که میدان مغناطیسی متغیر با زمان در بعضی فرکانسها و شدتها باعث آزاد شدن ملاتونین که یک ترکیب ضد صرعی می‌باشد در بافت مغز می‌شود [۱۹، ۲۰]. از جمله مکانیسمهایی که با استفاده از اثرات داروهای ضد تشنجی روی متغیرهای rTMS در بیماران مبتلا به انواع مختلف صرع و نیز در نمونه‌های سالم پیشنهاد شد، مدولاسیون کانالهای یونی سدیم وابسته به ولتاژ [۲۱-۲۳] و نیز مدولاسیون در آزادسازی و یا مهار انتقال‌دهنده‌های عصبی^۲ وابسته به نورونهای رابط ناحیه قشری مغز و ناحیه قشری-نخاعی [۲۶-۲۴] را می‌توان ذکر کرد. اما به دلیل معین نبودن دقیق تمام خواص فیزیکی و فیزیولوژیکی ایجاد شده از این تکنیک در بافت مغز و نیز اثرات بین شبکه‌ای نقاط مختلف مغز روی هم مکانیسمهای ایجاد شده توسط این تکنیک در مغز به طور دقیق معلوم نیست و لزوم شبیه‌سازیهای دقیق پارامترهای فیزیکی میدان الکتریکی ایجاد شده در بافت مغز و انجام آزمایشات در سطح مولکولی برای روشن شدن این مکانیسمها به چشم می‌خورد. با توجه به مزیت‌های خوب این تکنیک بدست آوردن پارامترهای بهینه تحریک برای درمان صرع در بیماران مبتلا می‌تواند گامی در جهت بالینی کردن این تکنیک باشد.

نظر می‌رسد که فرکانس تحریک مغناطیسی در این تکنیک فاکتور مهمی باشد و تاثیر محسوسی روی مقدار اثر درمانی دارد. اما روند منظمی بین افزایش (کاهش) فرکانس با افزایش (کاهش) اثر درمانی مشاهده نشد. می‌توان از فرکانس ۱ به عنوان فرکانس بهینه در این محدوده فرکانسی (۰/۱ تا ۲ هرتز) و شدت (۸۰٪ تا ۱۰۰٪ آستانه حرکتی) نام برد. اگرچه در بعضی مطالعات تاثیر فاکتورهای دیگر نظیر مدت زمان اعمال تحریک و فرکانسهای دیگر و نوع تکنیک تحریکی نیز گزارش شدند [۱۵-۱۷] که در این تحقیق مورد بررسی قرار نگرفتند. در مطالعه‌ای مقدماتی که توسط انشل و همکاران^۱ صورت گرفت [۱۸] نشان داده شد که rTMS فرکانس یک هرتز اثر ضدتشنجی دارند. در آزمایش مذکور تزریق مایع مغزی-نخاعی بیماران افسرده تابش شده با rTMS یک هرتز به داخل شکمچه مغز موشهای صحرایی آهنگ کیندلینگ را با افزایش آستانه تشنج کاهش داد. مدت زمان اعمال تحریک rTMS به مدت هشت روز، روزانه و به مدت ۲۶/۶ دقیقه در هر جلسه بود. شدت تحریک ۹۰٪ آستانه حرکتی شخص بود. همین پروتکل برای فرکانس ۱۰ هرتز rTMS نیز انجام گرفت. ۲۰ قطار پالس هرکدام به مدت ۸ ثانیه و فاصله زمانی بین قطار پالس ۲۲ ثانیه با زمان کلی تابش ۲۲ دقیقه اعمال شد. نتایج نشان دادند که فرکانس ۱۰ هرتز بر خلاف فرکانس ۱ هرتز آستانه تشنج را کاهش می‌دهند. نتایج آزمایش فوق با مطالعه حاضر از این جهت که فرکانس یک هرتز rTMS سبب مهار و فرونشانی فعالیت‌های نورونی می‌شود در تطابق است. اگرچه مدت زمان اعمال تحریک و نیز نوع پروتکل، تزریق مایع مغزی-نخاعی از نمونه تابش دیده به نمونه مورد آزمایش، با

منابع

1. Barker AT, Jalinous R, Freeston IL, Jarratt JA. Magnetic stimulation of the human brain and peripheral nervous system: an introduction and the results of an initial clinical evaluation. *Neurosurgery* 1987; 20(1): 100-110.
2. Wassermann EM, Lisanby SH. Therapeutic application of repetitive transcranial magnetic stimulation: a review. *Clin Neurophysiol* 2001; 112:1367-77.
3. Maeda F, Keenan JP, Tormos JM, Topka H, Pascual-leone A. Modulation of corticospinal excitability by repetitive transcranial magnetic stimulation. *Clin Neurophysiol* 2000; 111:800- 805.
4. Hoffman RE, Cavus I. Slow transcranial magnetic stimulation, long-term depotentiation, and brain hyperexcitability disorders. *Am J Psychiatry* 2002; 159: 1093- 1102.
5. Hallett M. Transcranial magnetic stimulation and the human brain. *Nature* 2000; 406:147-150.
6. Principles of neural science. Kandel E, Schwartz J, M.Jessell Th. The Howard Hughes Medical Institute. London and New York: William Heinemann and Harvard University Press. 1923.
7. Steinhoff BJ, Stodieck SR, Paulus W, Witt TN. Transcranial stimulation. *Neurology* 1992; 42:1429-30.
8. Menkes DL, Gruenthal M. Slow-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation in a patient with focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 2000; 41: 240-242.
9. McLean M., Engstrom S., Holcomb R. Magnetic field therapy for epilepsy. *Epilepsy Behav* 2001;2:81-87.
10. Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Porgholami MH. Intra peritoneal and intraamygdala N6-cyclohexyladenosine suppress hippocampal kindled seizure in rats. *Brain Res* 2000;858:48-54.
11. Mirnajafi-Zadeh J, Porgholami MH, Palizvan MR, Rostampour M, Fallahi M. Anticonvulsant action of 2-chloroadenosine injected focally into the perirhinal cortex in amygdaloid kindled rats. *Epilepsy Res* 1999; 37: 430-437
12. Psychiatric Neuroimaging Group at the [University Hospital Bern](http://pni.unibe.ch/PNI/TMSgrafs.htm). available from[online]: <http://pni.unibe.ch/PNI/TMSgrafs.htm>
13. Paxinos G, Watson C. The rat Brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, 1986.
14. Nadeem M, Thorlin TH, Gandhi OP, Persson M. Computation of Electric and Magnetic Stimulation in Human Head Using the 3-D Impedance Method. *Life Fellow, IEEE Trans Biomed Eng* 2003;50:900-7.
15. Tergau F, Naumann U, Paulus W, Steinhoff BJ. Low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves intractable epilepsy. *Lancet* 1999; 353:2209.

16. Brasil-Neto JP, De Araújo DP, Teixeira WA, Araújo VP, Boechat-Barros R. Experimental therapy of epilepsy with transcranial magnetic stimulation; lack of additional benefit with prolonged treatment. *Arq. Neuro - Psiquiatr* 2004; 62(1): 21-25
17. Theodore WH, Hunter K, Chen R, Vega-Bermudez F, Borojerdi B, Reeves-Tyer P, et al. Transcranial magnetic stimulation for the treatment of seizures. *Neurology* 2002; 59:560-2.
18. Ansel DJ, Pascual-Leone A, Holmes, GL. Anti-kindling effect of slow repetitive transcranial magnetic stimulation in rats. *Neurosci Lett* 2003; 351: 9-12.
19. Wilson BW, Wright CW, Morris JE. Evidence for an effect of ELF electromagnetic fields on human pineal gland function. *J Pineal Res* 1990; 9:259-269.
20. Lerchl, A, Nonaka KO, Stokkan KA, Reiter RJ. Marked rapid alterations in nocturnal pineal serotonin metabolism in mice and rats exposed to weak intermittent magnetic fields. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 169:102-108.
21. Mavroudakakis N, Caroyer JM, Brunko E, De Beyl ZD. Effects of diphenylhydantoin on motor potentials evoked with magnetic stimulation. *Electroenceph clin Neurophysiol* 1994;93:428-433.
22. Ziemann U, Lönnecker S, Steinhoff BJ, Paulus W. Effects of antiepileptic drugs on motor cortex excitability in humans: a transcranial magnetic stimulation study. *Ann Neurol* 1996; 40:367-378.
23. Borojerdi B, Battaglia F, Muellbacher W, Cohen LG. Mechanisms influencing stimulus-response properties of the human corticospinal system. *Clin Neurophysiol* 2001; 112:931-937.
24. Ziemann U, Lönnecker S, Paulus W. Inhibition of human motor cortex by ethanol. A transcranial magnetic stimulation study. *Brain* 1995;118: 1437-1446.
25. Werhahn KJ, Kunesch E, Noachtar S, Benecke R, Classen J. Differential effects on motorcortical inhibition induced by blockade of GABA uptake in humans. *J Physiol (Lond)* 1999;517:591-597.
26. Palmieri MG, Iani C, Scalise A, Desiato MT, Loberti M, Telera S, et al. The effect of benzodiazepines and flumazenil on motor cortical excitability in the human brain. *Brain Res* 1999;815: 192-199.