Physiology and Pharmacology, 11(1), 10 - 18
Spring 2007 [Article in Persian]

Physiology
and
Pharmacology

The role of galanin receptors in anticonvulsant effect of low frequency stimulations on acquisition of perforant path kindled seizures in rats

Mehdi Sadegh[1], Javad Mirnajafi-Zadeh[1*], Mohammad Javan[1], Yaghoub Fathollahi[1], Mohammad Mohammad-Zadeh[1], Ali Jahanshahi[1], Ali Eslamifar[2], Zahra Deljo[2]

1- Dept. Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares Univ., Tehran, Iran.
2- Clinical Research Group, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iarn. mirnajaf@modares.ac.ir.

Abstract

Introduction: Low-frequency stimulation (LFS) has a delaying effect on kindled seizures acquisition. In the present study we examined the role of galanin receptors in the inhibitory effects of LFS on kindled seizures induced by electrical stimulation of perforant path.

Methods: Animals were stimulated daily at the AD threshold intensity with a rapid kindling procedure. LFS was applied immediately after cessation of each kindling stimulation. M35 (0.5 and 1.0 nM per site), a nonselective galanin receptor antagonist, was microinjected daily into the dentate gyrus before the beginning of stimulation protocol and behavioral seizure stages and afterdischarge durations were recorded.

Results: LFS application had a suppressive effect on the kindling rate. It significantly increased the number of stimulations needed to reach seizure stages 3, 4 and 5. LFS also decreased the cumulative afterdischarge duration during the days of stimulation. Intra-dentate gyrus microinjection of M35 reduced the inhibitory effect of LFS on kindling rate, significantly.

Conclusion: These data indicate that galanin receptors may have a role in mediating part of the inhibitory effects of LFS on perforant path kindled seizures.

Keywords: Seizure, Low frequency stimulation, Galanin, Dentate gyrus, Rapid kindling.

* Corresponding Author Email: mirnajaf@modares.ac.ir
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۱ (۱)، ۱۰ - ۱۸
بهار ۱۳۸۶

فیزیولوژی و فارماکولوژی

نقش گیرنده‌های گالانین در اثرات مهاری تحریک با فرکانس پایین بر اکتساب تشنج‌های ناشی از کیندلینگ مسیر پرفورنت در موش صحرایی

مهدی صادق[۱]، سید جواد میرنجفی‌زاده[۱*]، محمد جوان[۱]، یعقوب فتح‌الهی[۱]، محمد محمدزاده[۱]، علی جهانشاهی[۱]، علی اسلامی‌فر[۲]، زهرا دلجو[۲]
۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲- گروه تحقیقات بالینی، انستیتو پاستور ایران، تهران

دریافت: بهمن ۸۵ بازبینی: اردیبهشت ۸۶ پذیرش: خرداد ۸۶

چکیده

مقدمه: تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (LFS) در موضع کیندلینگ دارای اثرات تاخیری در روند صرع زایی می‌باشد. در تحقیق حاضر ما نقش گیرنده‌های گالانین در اثرات مهاری LFS بر تشنجهای کیندلینگ ایجاد شده توسط تحریک الکتریکی مسیر پرفورنت را مورد بررسی قرار دادیم.

روش‌ها: حیوانات به صورت روزانه با شدت آستانه و با استفاده از پروتکل کیندلینگ سریع تحریک می‌شدند. LFS بلافاصله پس از تحریکات کیندلینگ اعمال می‌گردید. M35 (۰/۵ و ۱ نانومولار در موضع)، آنتاگونیست غیر اختصاصی گیرنده‌های گالانین، هر روز قبل از شروع پروتکل تحریک به داخل ژیروس دندانه دار حیوانات تزریق می‌شد و مراحل رفتاری تشنج و مدت زمان تخلیه متعاقب ثبت می‌گردید.

یافته‌ها: استفاده از LFS باعث اثرات مهاری در روند کیندلینگ شد. LFS بطور معنی داری تعداد تحریکات لازم برای رسیدن به مراحل ۳، ۴ و ۵ تشنج را افزایش داد. LFS همچنین مجموع تخلیه‌های متعاقب طی روزهای تحریک را بصورت معناداری کاهش داد. تزریق M35 به داخل ژیروس دندانه دار اثرات مهاری LFS بر روند کیندلینگ را به طور معنی داری کاهش داد.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان می‌دهد که گیرنده‌های گالانین می‌توانند به عنوان واسطه بخشی از اثرات مهاری LFS بر تشنجات ناشی از کیندلینگ مسیر پرفورنت عمل کنند.

واژه‌های کلیدی: تشنج، تحریک الکتریکی با فرکانس پایین، گالانین، ژیروس دندانه دار، کیندلینگ سریع.

مقدمه

گالانین نوروپپتدی متشکل از ۲۹ اسید آمینه (در انسان ۳۰ اسید آمینه) است که دارای توزیع گسترده‌ای در سیستم عصبی مرکزی و محیطی می‌باشد [۱۴]. این نوروپپتید به صورت کوترانسمیتر همراه با نوروترانسمیترهای اصلی (مثل گلوتامات و GABA) در پایانه‌های سیناپسی رها می‌شود و نقش مهمی در تنظیم بسیاری از اعمال فیزیولوژیک و پاتولوژیک از جمله صرع ایفا می‌کند [۱۹]. مطالعات نشان داده است که گالانین یک نوروپپتید بسیار القاء پذیر بوده و به دنبال آسیبهای عصبی و بیماریهای نورودژنراتیو مزمن بیان آن سریعا افزایش می‌یابد [۳،۳۹].

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: mirnajaf@modares.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

هیپوکمپ، به عنوان یک ساختار مهم در ایجاد و گسترش صرع لوب گیجگاهی، دارای ورودیهای گالانینرژیک فراوانی است که از سپتوم میانی و لوکوس سرلئوس منشأ می‌گیرند [۲۶،۱۲،۲۴،۳۸]. فراوانی این نوروپپتید مهاری و گیرنده‌هایش در هیپوکمپ بیانگر این است که گالانین در تعدیل فعالیت و تحریک پذیری این ناحیه نقش مهمی ایفا می‌کند. حاصل این اثرات مهاری به صورت تضعیف حافظه، یادگیری و LTP و همچنین کاهش حملات صرعی بروز می‌کند [۲،۴،۱۹]. گالانین اثراتش را از طریق حداقل سه نوع گیرنده G-پروتیینی ایفا می‌کند که عبارتند از: GalR1، GalR2 وGalR3 [۵،۱۹]. GalR1 وGalR3 از طریق مهار آدنیلیل سیکلاز و باز کردن کانالهای پتاسیمی سبب بروز اثرات مهاری می‌شود در حالیکه GalR2 از طریق افزایش کلسیم داخل سلولی و فعال کردن PLC عمل می‌کند [۳۰،۳۵]. گزارشهای زیادی مبنی بر نقش مهاری گالانین در صرع وجود دارد [۲۱،۱۶،۱۷،۲۰].

با توجه به اینکه هنوز حدود ۳۰٪ بیماران صرعی به داروهای ضد صرع موجود مقاوم هستند تحقیقات زیادی برای یافتن روش درمانی موثری برای این گروه از بیماران در حال انجام است [۱۱،۲۹]. در این تحقیقات از مدلهای آزمایشگاهی مختلفی از جمله کیندلینگ استفاده می‌شود. کیندلینگ مدلی مناسب برای مطالعه صرع لوب گیجگاهی است. در این مدل که اولین بار توسط Goddard و همکارانش [۹] معرفی شد تحریکات الکتریکی تکراری در نواحی خاصی از مغز جلویی نظیر آمیگدال یا هیپوکمپ بتدریج سبب بروز رفتارهای تشنجی و در نهایت سبب ایجاد تشنجات عمومی می‌شود.

طی سالهای اخیر تحریک الکتریکی نواحی خاص از مغز به عنوان روش درمانی جدید برای این گروه از بیماران مورد استفاده آزمایشگاهی و کلینیکی قرار گرفته است [۱۰]. تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین (LFS ؛ ۳-۱ Hz)، نظیر آنچه باعث ایجادLTD در محیط in vitro می‌شود، می‌تواند سبب اثرات مهاری و حفاظتی در مقابل روند گسترش فعالیت صرعی شود [۷،۳۶،۳۷]. نشان داده شده است که LFS باعث تاخیر و حتی مهار گسترش روند صرع زایی ناشی از کیندلینگ آمیگدال می‌شود [۱۰]. هر چند مکانیسم‌هایی که LFS از طریق آنها اثرات ضد تشنجی خود را اعمال می‌کند هنوز روشن نشده است، اما شواهدی وجود دارد که بیان می‌کند LFS از طریق ایجاد LTD یا ایجاد Depotentiation باعث ایجاد نوعی پلاستیسیتی سیناپسی منفی می‌شود [۳۶،۳۷] بعلاوه شواهد موجود بیانگر این است که LFS از طریق افزایش رهایش ترانسمیترهای مهاری و نورومودولاتورها (مثل GABA، آدنوزین، دوپامین و ...) سبب ایجاد LTD یا Deponentiation می‌شود [۶،۱۳،۳۲،۳۷].

در این مطالعه برای بررسی نقش نوروپپتید گالانین و گیرنده‌هایش به عنوان واسطه اثرات مهاری LFS بر روند صرع زایی، اثر آنتاگونیست غیراختصاصی گیرنده‌های گالانین (M35) را بر این اثرات مهاری در مدل کیندلینگ مسیر پرفورنت بررسی نمودیم.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موش صحرایی نر نژاد Wistar با وزن ۳۰۰-۲۷۰ گرم (خریداری شده از انیستیتو پاستور کرج) استفاده شد. بیهوشی توسط تزریق داخل صفاقی سدیم پنتوباربیتال (۶۰ mg/kg) انجام می‌شد [۲]. پس از بیهوش کردن، حیوان درون دستگاه استریوتاکسی قرار می‌گرفت و با استفاده از اطلس Paxinos و [Watson۲۵] موقعیت مسیر پرفورنت (برحسب میلی متر: ۶/۹ عقبتر و ۴/۱ به سمت راست نسبت به برگما و ۳/۳ به سمت پایین نسبت به سطح استخوان جمجمه) و ژیروس دندانه دار (برحسب میلی متر: ۳/۸ عقبتر و۲/۰ به سمت راست نسبت به برگما و ۳/۲ به سمت پایین نسبت به سطح استخوان جمجمه) در سطح جمجمه علامت گذاری می‌شد. سپس با استفاده از مته دندانپزشکی، جمجمه در آن نقطه سوراخ شده، یک الکترود دو قطبی در مسیر پرفورنت و یک الکترود تک قطبی به همراه یک کانول (۲۳G) در ژیروس دندانه دار قرار داده می‌شد. دو الکترود تک قطبی نیز به عنوان Earth و Differential توسط پیچ بر روی جمجمه قرار می‌گرفت. پس از بستن پیچ‌های لنگرگاه، حیوان برای ثبت به قفسه فارادی انتقال می‌یافت. با استفاده از

استیمولاتور، تحریک الکتریکی با شدت ۴۰۰ تا ۸۰۰ میکروآمپر از طریق الکترود تحریک به مسیر پرفورنت اعمال می‌گردید. در صورت قرار داشتن الکترودهای ثبت و تحریک در محل مناسب، پتانسیل تحریکی پس سیناپسی تجمعی (pEPSP) توسط نرم افزار ثبت می‌گردید. در غیر این صورت الکترودهای تحریک و ثبت آنقدر تغییر داد می‌شد تا pEPSP با حداکثر دامنه ثبت شود. سپس با سیمان دندانپزشکی الکترودها و پیچ روی جمجمه حیوان ثابت می‌شدند. پس از پایان کارگذاری الکترودها و کانولها، پین‌های متصل به الکترودها وارد مادگی سوکت مخابراتی شده و سوکت بوسیله سیمان دندانپزشکی روی سطح جمجمه متصل می‌گردید. در پایان جراحی یک سر سوزن ۳۰G به طول مناسب بریده شده و در داخل کانول قرار می‌گرفت تا از انسداد آن جلوگیری کند.

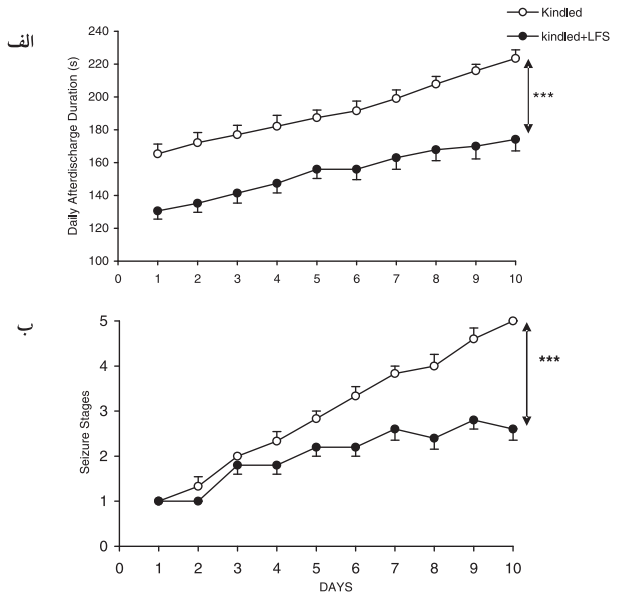
حداقل ده روز پس از جراحی، از شدت آستانه برای تحریک حیوانات استفاده می‌شد. برای به دست آوردن شدت آستانه، ابتدا حیوان توسط جریانی به شدت ۳۰ میکروآمپر تحریک می‌گردید. در صورتیکه امواج تخلیه متعاقب (حداقل به مدت۱۰ ثانیه) ثبت می‌شدند، این شدت جریان به عنوان شدت جریان آستانه شناخته می‌شد [۹]. در غیر این صورت، با فواصل ۵ دقیقه‌ای شدت جریان هر بار ۱۰ میکروآمپر بیشتر شده تا آستانه تحریک بدست آید. سپس حیوانات با شدت جریان آستانه تحریک می‌شدند تا مراحل مختلف تشنج را نشان دهند. این مراحل عبارتند [۲۸] از: مرحله ۱، حرکات دهان و صورت؛ مرحله ۲، حرکت سر به بالا و پایین؛ مرحله ۳، کلونوس اندام جلویی طرف مقابل نسبت به محل تحریک؛ مرحله ۴، کلونوس اندام‌های 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 شد [۲۲]. 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 می‌شدند. هر حیوان در هر روز ۶ بار (با فواصل ۱۰ دقیقه) توسط این امواج تحریک می‌شد. در گروهی از حیوانات که تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین (LFS) دریافت می‌کردند بلا فاصله بعد از اتمام تحریکات کیندلینگ LFS به مدت ۵۹۵ ثانیه در تمام فواصل بین تحریکات کیندلینگ به حیوان اعمال می‌شد و اثر آن بر کمیت‌های تشنجی بررسی 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 گروههایی که LFS دریافت نمی‌کردند در تمام فواصل بین تحریکات سوکت روی سر حیوان قرار داشت.

کمیت‌های تشنجی اندازه‌گیری شده عبارت بودند از: ۱- مدت زمان تخلیه‌های متعاقب (Cumulative ADD): مجموع زمانهای تخلیه‌های متعاقب از شروع تحریکات تا کیندل شدن حیوان؛ ۲- مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه (Daily ADD) و۳- تعداد روزهای لازم برای رسیدن به هر یک از مراحل پنجگانه تشنجی.

در این تحقیق از M35 (شرکت Sigma-Aldrich، آلمان) به عنوان آنتاگونیست غیر اختصاصی هر سه گیرنده گالانین استفاده شد. این دارو در نرمال سالین حل شد و با دو دوز ۰/۵ و ۱ نانومولار مورد استفاده قرار گرفت [۲۷،۴۱،۲]. قبل از ساختن دارو pH نرمال سالین توسط محلول یک نرمال HCl یا NaOH در محدوده ۷/۳ تا ۷/۴ تنظیم می‌شد. برای تزریق دارو به داخل ژیروس دندانه دار، از لوله پلی اتیلنی PE-20 (شرکت Stoelting، امریکا) که یک سر آن به سرسوزن G ۳۰ و سر دیگر آن به سرنگ هامیلتون ۱۰ میکرو لیتر متصل بود، استفاده گردید. قبل از تزریق دارو، لوله و سرسوزن با نرمال سالین استریل شستشو داده می‌شدند. سپس سرنگ هامیلتون در محل مخصوص روی پمپ تزریق Pump (Microsyringe شرکت Stoelting، امریکا) قرار می‌گرفت و دارو با سرعت ۰/۵ µl/۵min به حیوان تزریق می‌شد، سپس حیوان برای اجرای پروتکل تحریک به قفس فارادی انتقال می‌یافت.

در آزمایش اول برای بررسی تاثیر LFS بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت دو گروه آزمایشی مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه اول حیوانات فقط تحریکات با فرکانس پایین دریافت می‌کردند. در گروه دوم حیوانات فقط تحریکات تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند و در گروه دوم حیوانات در فواصل بین تحریکات کیندلینگ، تحریکات با فرکانس پایین دریافت می‌کردند.



شکل ۱- اثر اعمال LFS بر مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه و مراحل رفتاری تشنج: الف) LFS باعث کاهش مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه طی روند کیندلینگ مسیر پرفورنت می‌گردد. با استفاده از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس از نوع Repeated Measures و آزمون LSD کاهش معنی داری در میزان تخلیه‌های متعاقب روزانه در گروهی که همراه تحریکات کیندلینگ LFS دریافت می‌کردند (Kindled + LFS) نسبت به گروهی که تنها تحریکات کیندلینگ را دریافت می‌کردند (Kindled) مشاهده می‌شود (P<۰/۰۰۱). ب) تاثیر LFS بر بروز مراحل رفتاری تشنج طی روند کیندلینگ مسیر پرفورنت. آزمونMann-Whitney کاهش معنی داری را در تعداد روزهای لازم برای رسیدن به مراحل مختلف رفتاری تشنج در گروهی که همراه تحریکات کیندلینگ LFS دریافت می‌کردند (Kindled + LFS) نسبت به گروهی که تنها تحریکات کیندلینگ را دریافت می‌کردند (Kindled) نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۱). در هر دو نمودار اعداد نشان دهنده میانگین ± خطای معیار میانگین می‌باشند (n=۶) .

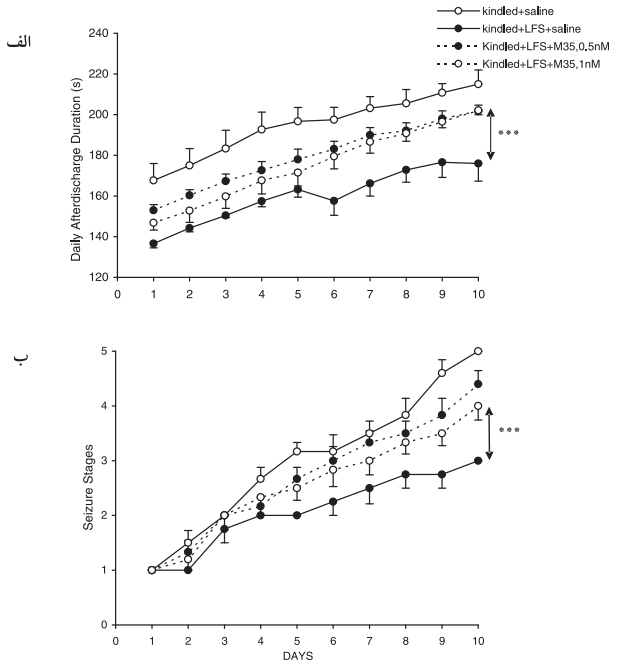
در آزمایش دوم برای بررسی نقش نوروپپتید گالانین طی اثرات مهاری LFS برروند کیندلینگ مسیر پرفورنت، شش گروه آزمایشی مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه اول به حیوانات هر روز ابتدا نرمال سالین تزریق می‌شد و سپس در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می‌گرفتند. در گروه دوم به حیوانات هر روز ابتدا نرمال سالین تزریق شده و سپس این حیوانات تحریکات کیندلینگ به همراه LFS دریافت می‌کردند. در حیوانات گروه سوم هر روز ابتدا M35 (با دوز ۰/۵ nM) به داخل ژیروس دندانه دار تزریق می‌شد و سپس آنها در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می‌گرفتند. به حیوانات گروه چهارم هر روز ابتدا M35 (با دوز ۰/۵ nM) تزریق شده و سپس تحریکات کیندلینگ به همراه LFS دریافت می‌کردند. حیوانات گروه پنجم مشابه گروه سوم آزمایش می‌شدند و تنها بجای دوز ۰/۵ دوز ۱ نانومولار استفاده می‌شد. گروه ششم نیز مشابه گروه چهارم آزمایش می‌شد و فقط بجای دوز ۰/۵ دوز ۱ نانومولار تزریق می‌شد. تعداد حیوانات در هر گروه حداقل ۶ بود.

پس از پایان هر آزمایش جهت اطمینان از قرار داشتن الکترود و کانول در جایگاه صحیح، به محل الکترود ثبت و کانول رنگ Methylene Blue (۰/۵µl/min) تزریق و محل الکترود تحریک نیز با جریان الکتریکی مستقیم با شدت ۱ mA و مدت ۵ ثانیه تخریب می‌گردید. سپس مغز حیوانات خارج شده و در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده می‌شد. آنگاه از محل الکترود و کانول برش‌گیری به عمل آمده تا محل الکترود و کانول مشخص شود. علاوه بر این با انجام رنگ آمیزی نیسل، میزان تخریب نورونی در محل ثبت مورد بررسی قرار می‌گرفت. در همه آزمایشها، فقط موشهایی که جایگاه الکترود و کانول درست بود، مورد ارزیابی نهایی قرار می‌گرفت.

تفاوت آماری در میزان امواج تخلیه متعاقب طی روند صرع زایی بین گروههای آزمایشی توسط آزمون تجزیه و تحلیل واریانس از نوع Repeated Measures و آزمون LSD محاسبه گردید. برای مقایسه وقوع مراحل ۵ گانه تشنجی بین گروههای آزمایشی نیز از آزمون غیرپارامتریک Mann-Withney استفاده شد. برای بررسی داده‌ها بین دو گروه مختلف آزمون t غیر زوجها مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها به صورت (میانگین ± خطای معیار میانگین) ارائه شده اند. P<۰/۰۵ به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آزمونهای بافت شناسی نشان داد که محل الکترود و کانول در ژیروس دندانه دار می‌باشد. همچنین با استفاده از رنگ آمیزی نیسل مشاهده شد که اعمال تحریکات کیندلینگ و LFS سبب تخریب ساختاری در محل تحریک و یا تزریق نمی‌شود.



شکل ۲- تاثیر تزریق M35 به ژیروس دندانه دار بر اثرات مهاری LFS بر کمیتهای تشنجی. الف) تزریق M35 در گروهی که همراه تحریکات کیندلینگ LFS دریافت می‌کردند(Kindled + LFS + M35) اثرات کاهشی LFS بر مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه را نسبت به گروهی که ابتدا نرمال سالین و سپس تحریکات کیندلینگ همراه LFS دریافت می‌کردند (Kindled + LFS + Saline) را به طور معنی داری کاهش داد (P<۰/۰۰۱). ب) تزریق M35 در گروهی که همراه تحریکات کیندلینگ LFS دریافت می‌کردند (Kindled + LFS + M35) اثرات کاهشی LFS بر تعداد روزهای لازم برای رسیدن به مراحل مختلف رفتاری تشنج را نسبت به گروهی که ابتدا نرمال سالین و سپس تحریکات کیندلینگ همراه LFS دریافت می‌کردند (Kindled + LFS + Saline) را به طور معنی داری کاهش داد (P<۰/۰۰۱). تفاوت معنی داری بین دوزهای بکار رفته M35 از نظر مهار اثرات LFS مشاهده نشد. در هر دو نمودار اعداد نشان دهنده میانگین ± خطای معیار میانگین می‌باشند (n=۶) .

میانگین ADD پس از اولین تحریک تفاوت معنی داری را در گروه اول (که فقط تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند) ۱۵/۳۳±۰/۸۴ ثانیه و در گروه دوم (که حیوانات در فواصل بین تحریکات کیندلینگ، تحریکات با فرکانس پایین نیز دریافت می‌کردند) ۱۶/۳۳±۰/۴۹ ثانیه بود و از نظر آماری تفاوت معنی داری نداشتند (P>۰/۰۵). بعلاوه، میانگین شدت تحریکات آستانه برای شروع تخلیه‌های متعاقب در گروههای مختلف نیز تفاوت معناداری را با هم نشان نداد (P>۰/۰۵) و این بدان معناست که در حیوانات دو گروه تفاوت معنی داری در استعداد ابتلا به تشنج وجود نداشت.

آزمون تجزیه و تحلیل واریانس و آزمون LSD نشان داد که تحریک الکتریکی مسیر پرفورنت توسط LFS در فواصل بین تحریکات کیندلینگ کاهش معنی داری در مجموع تخلیه‌های متعاقب روزانه نسبت به گروه اول نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۱) (شکل ۱- الف؛ برای محاسبه مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه ADDهای بدست آمده پس از ۶ تحریک روزانه با هم جمع می‌شد). بعلاوه، مجموع کل تخلیه‌های متعاقب از روز اول تا روز نهم در گروه دریافت کننده LFS نسبت به گروه اول کاهش معنی داری را نشان داد و از ۱۶۹۸/۶۰±۴۶/۶۰ ثانیه به ۱۳۶۷/۴۰±۵۲/۰۰ ثانیه رسید (P<۰/۰۰۱).

استفاده از آزمونMann-Withney کاهش معنی داری را در بروز مراحل رفتاری ۴ و ۵ تشنجی در گروه LFS نسبت به گروه اول نشان داد. بعلاوه تعداد روزهای تحریکی لازم برای رسیدن به این مراحل را افزایش داد (P<۰/۰۰۱) (شکل ۱- ب)؛ در حالیکه در تعداد روزهای تحریکی لازم برای رسیدن به مراحل ۱ تا ۳ تغییری ایجاد نکرد.

تزریق سالین نرمال قبل از اجرای پروتکل تحریک تاثیری بر کمیتهای اندازه‌گیری شده نداشت. تزریق M35 با دوزهای ۱ و ۰/۵ نانومولار تغییرات معنی داری در پارامترهای تشنجی گروه اول (گروهی که ابتدا سالین دریافت می‌کردند و سپس در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می‌گرفتند) ایجاد نکرد. اما تزریق آن در گروهی که LFS دریافت می‌کردند از کاهش کمیتهای تشنجی توسط LFS جلوگیری کرد. در گروههای چهارم و ششم (که به دنبال تزریق M35 تحریکات کیندلینگ و LFS دریافت می‌کردند) تزریق دوزهای ۰/۵ و ۱ نانو مولار M35 در گروه دریافت کننده LFS افزایش معنی داری در مجموع تخلیه‌های متعاقب روزانه نسبت به گروه دوم (گروهی که بدنبال نرمال سالین و تحریکات کیندلینگ، LFS دریافت می‌کردند) ایجاد کرد (P<۰/۰۰۱) (شکل ۲- الف). همچنین مجموع کل تخلیه‌های متعاقب از روز اول تا روز نهم در گروههای چهارم و ششم نسبت به گروه دوم افزایش معنی داری را نشان داد (P<۰/۰۰۱) (جدول ۱).

تزریق M35 در گروههای چهارم و ششم اثرات کاهشی LFS بر تعداد روزهای لازم برای رسیدن به

جدول ۱– مجموع کل تخلیه های متعاقب از روز اول تا روز نهم در گروههای آزمایشی مختلف.

گروههای آزمایشی	مجموع کل تخلیه های متعاقب از روز ۱ تا ۹ (ثانیه)
گروه اول (اعمال تحریکات کیندلینگ به همراه تزریق سالین)	۱۶۹۷/۱۶ ± ۳۱/۹۵***
گروه دوم (اعمال تحریکات کیندلینگ و LFS به همراه تزریق سالین)	۱۴۲۵/۰۰ ± ۵۵/۹۸
گروه چهارم (اعمال تحریکات کیندلینگ و LFS به همراه تزریق دوز ۰/۵ نانومولار M35)	۱۵۹۴/۶۰ ± ۴۶/۸۰***
گروه ششم (اعمال تحریکات کیندلینگ و LFS به همراه تزریق دوز ۱ نانومولار M35)	۱۵۸۰/۲۰ ± ۴۲/۴۰***

اعداد نشان دهنده میانگین ± خطای معیار میانگین می باشند (n = ۶). *** نشان دهنده P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه دوم با استفاده از آزمون t– غیر زوجها می باشد.

مراحل مختلف رفتاری تشنج را نسبت به گروه دوم (که ابتدا نرمال سالین و سپس تحریکات کیندلینگ همراه LFS دریافت می‌کردند)، به طور معنی داری کاهش داد (P<۰/۰۰۱). تفاوت معنی داری در کمیتهای تشنجی اندازه‌گیری شده به دنبال تزریق دو دوز M35 بین گروههای چهارم و ششم مشاهده نشد.

بحث

مطالعات گذشته نشان داده بود که به کار بردن LFS (با فرکانس ۱ Hz و به مدت ۱۵ دقیقه) بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ، سبب تاخیر و حتی مهار روند صرع زایی می‌شود. بعلاوه این اثرات با افزایش آستانه تشنجی همراه بود [۳۶،۳۷]. بنابراین احتمالا LFS به نحوی تحریک پذیری نورونها را کاهش می‌دهد. با این وجود مکانیسم اثرات LFS هنوز نامشخص است. یافته‌های ما اثرات مهاری LFS برروند کیندلینگ مسیرپرفورنت را نشان داده و برای اولین بار این احتمال را مطرح می‌کند که گالانین را می‌توان بعنوان یکی از واسطه‌های اثرات مهاری LFS در نظر گرفت زیرا مهار غیراختصاصی گیرنده‌های گالانین در ژیروس دندانه دار اثرات مهاری LFS بر روند کیندلینگ را به صورت معنی داری کاهش می‌دهد.

در این تحقیقLFS با مدت پالس ۱ میلی ثانیه و شدتی برابر شدت آستانه تحریکات کیندلینگ اثرات مهاری بر روند کیندلینگ داشت. این تاثیر مهاری نمی‌تواند ناشی از تخریب نورونی بوسیله LFS باشد زیرا مطالعات بافت شناسی هیچگونه تخریب نورونی را نشان نداد. همچنین حجم داروی تزریق شده در ناحیه ژیروس دندانه دار ۰/۵ میکرولیتر بود که با سرعت ۰/۱ میکرولیتر در دقیقه تزریق می‌شد و نمی‌توانست تخریب نورونی ایجاد کند.

بکار بردن تحریکات کیندلینگ سبب افزایش دائمی تحریک پذیری نورونها در مدارهای نورونی مسئول گسترش فعالیت تشنجی می‌شود و این افزایش تحریک پذیری مسئول پیشرفت روند صرع زایی ناشی از کیندلینگ است [۸،۲۳]. یکی از مکانیسمهای احتمالی که ممکن است در پیشرفت روند صرع نقش داشته باشد ایجاد تقویت طولانی مدت (LTP) است؛ در واقع LTP شباهتهای آناتومیک و فیزیولوژیک زیادی را با صرع نشان می‌دهد که پیشنهاد می‌کند LTP یکی از مکانیسمهای دخیل در روند صرع زایی است [۳۳]. از طرفی مطالعات قبلی نشان می‌دهد که LFS باعث مهار LTP ایجاد شده در محیط هر دو محیط in vivo و in vitro می‌شود. بنابراین با توجه به اثرات مهاریLFS بر LTP و احتمال وقوع LTP در حین کیندلینگ، ممکن است LFS با کاهش پاسخ دهی سیناپسی در مدارهای صرعی از طریق مکانیسم هایی مثل تضعیف طولانی مدت (LTD) و تضعیف پس از تقویت، سبب مهار روند گسترش فعالیتهای تشنجی شود. برخی مطالعات پیشنهاد می‌کند که LFS از طریق القای LTD، LTP ایجاد شده طی کیندلینگ را معکوس می‌کند و سبب مهار روند صرع زایی می‌شود [۳۲،۳۷]. نتایج ما نشان داد که اعمال LFS در مسیر پرفورنت بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ سبب مهار چشمگیر کمیتهای تشنجی می‌شود، بطوریکه از نخستین روز شروع تحریکات مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه در گروهی که به همراه تحریکات کیندلینگ، LFS دریافت می‌کردند نسبت به گروهی که فقط تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند کاهش معنی

داری نشان داد (شکل ۱- الف). بروز چنین تفاوتی از همان روز نخست مربوط به پروتکل تحریکی مورد استفاده می‌باشد. باید به این نکته توجه شود که در این تحقیق تخلیه‌های متعاقب حاصل از ۶ تحریک روزانه با هم جمع شده‌اند و بعنوان مقادیر Daily Afterdischarge Duration در شکلهای ۱- الف و ۲- الف استفاده شده اند. به هر حال تحلیل داده‌های حاصل از روز آستانه‌گیری (Afterdischarge Threshold) و همچنین بررسی مدت زمان تخلیه‌های متعاقب به دنبال اولین تحریک در گروههای مختلف اختلاف معناداری را بین گروههای آزمایشی نشان نداد که بیانگر آن است که حیوانات هر دو گروه از نظر استعداد ابتلا به تشنج یکسان بودند. یافته‌های ما همچنین نشان داد که هر چند LFS تغییر معناداری در تعداد تحریکات لازم برای رسیدن به مراحل ۱ و ۲ تشنج ایجاد نمی‌کند اما تعداد تحریکات لازم برای رسیدن به مراحل ۳، ۴ و ۵ تشنج را به صورت معناداری می‌افزاید (شکل ۱- ب). مراحل پنجگانه تشنجات کیندلینگ را می‌توان به دو دوره تقسیم کرد: دوره کانونی شدن تشنجات که شامل مراحل ۱ تا ۳ می‌شود و دوره عمومی شدن تشنجات که شامل مرحله ۴ و ۵ است [۲۸]، با توجه به داده‌های ما شاید بتوان گفت که نقش اصلی LFS مهار مرحله گذر از تشنجات کانونی به تشنجات عمومی است.

مشخص شده که LFS می‌تواند سبب تغییر غلظت بعضی از نورومودولاتورها و نوروترانسمیترها در مغز شود. به عنوان مثال، اعمال LFS در برش‌های زنده هیپوکمپ باعث آزاد شدن آدنوزین می‌گردد [۶]. همچنین گزارش شده است که اِعمال LFS بصورت طولانی مدت، تغییراتی را در میزان رسپتور بایندینگ گیرنده‌های بنزودیازپینی و اپیوئیدی μ ایجاد می‌کند [۱۳]. احتمال دارد که LFS از طریق ایجاد تغییراتی مشابه آنچه که ذکر شد، در نهایت سبب تقویت سیستم‌های مهاری شود. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که مهار گیرنده‌های گالانین (که یک نوروپپتید مهاری در مغز است) [۱۴] باعث کاهش اثرات مهاری LFS می‌شود. بنابراین می‌توان این احتمال را مطرح نمود که گیرنده‌های گالانین مسئول حداقل بخشی از اثرات ضد تشنجی LFS هستند.

مطالعات گذشته توزیع گسترده گیرنده‌های گالانین را در هیپوکمپ و ژیروس دندانه دار و اثرات ضد تشنجی این گیرنده‌ها را نشان داده است همچنین بررسی‌های مختلف در محیط in vitro و in vivo نشان می‌دهد که گالانین به عنوان یک ضد تشنج درونزاد قوی از انتهای فیبرهای نورآدنرژیک ورودی به هیپوکمپ آزاد می‌شود و از طریق تضعیف تقویت سیناپسی و یا کاهش رهایش نورترانسمیترهای تحریکی نظیر گلوتامات باعث اثرات ضد تشنجی می‌شود [۱۹،۴۰،۴۱]. بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد که گالانین یک مهار کننده موثر LTP در هر دو محیط in vitro و in vivo است [۲،۱۹،۲۷]. مطالعه روی برشهای هیپوکمپ موشهایی که ژن گالانین آنها حذف شده بود نشان داد که رهایش گلوتامات از پایانه‌های سیناپسی آنها ۶ تا ۹ برابر افزایش می‌یابد. بعلاوه، پایانه‌های سیناپسی در برشهای هیپوکمپ موشهایی که دچار افزایش بیان ژن گالانین شده بودند قادر به رهایش گلوتامات نبودند [۱۹] که تایید می‌کند گالانین از طریق مهار رهایش گلوتامات مانع از تقویت سینایسی می‌شود. بنابراین گالانین می‌تواند به عنوان یک ماده ضد تشنجی درونزاد در بعضی شرایط وارد عمل شود. در این مطالعه تزریق نرمال سالین در گروهی که به همراه تحریکات کیندلینگ، LFS دریافت می‌کردند تغییر معناداری را اثرات LFS ایجاد نکرد (داده‌ها نشان داده نشده) بنابراین اثرات مشاهده شده از M35 ناشی از حجم تزریقات نیست بعلاوه استفاده از دو دوز ۰/۵ و ۱/۰ نانومولار M35 نشان داد که هر چند تفاوت دو دوز بکار رفته معنادار نیست اما دوز ۰/۵ دارای اثر بیشتری است. اگرچه مطالعات قبلی اثرات آنتاگونیستی این دوز را برای M35 اثبات کرده [۲،۱۶] اما گزارشهایی مبنی بر اینکه M35 در دوزهای بالاتر از ۱/۰ نانومولار اثرات آگونیستی بروز می‌دهد [۱،۵] وجود دارد به هر حال این احتمال وجود دارد که M35 با دوزهای پایین تر اثرات آنتاگونیستی موثرتری را اعمال کند.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا اعمال LFS بدنبال تحریکات کیندلینگ باعث رهایش گالانین به عنوان یک عامل مهاری شده و این نوروپپتید مهاری حداقل مسئول بخشی از اثرات مهاری LFS طی پدیده کیندلینگ است اما بجز گالانین عوامل دیگری هم می‌توانند در اعمال اثرات مهاری LFS نقش داشته باشند که برای شناسایی این عوامل و مکانیسمهای اثر ضد تشنجی LFS به مطالعات بیشتری نیاز است.

منابع

[1] Branchek TA, Smith KE, Gerald C, Walker MW, Galanin receptor subtypes. ***Trends Pharmacol Sci*** 21 (2000) 109–117.

[2] Coumis U, Davies CH, The effects of galanin on long-term synaptic plasticity in the CA1 area of rodent hippocampus. ***Neuroscience*** 112 (2002) 173–182.

[3] Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD, De Lacalle S, Mufson EJ, Galanin in Alzheimer disease. ***Mol Interv*** 3 (2003) 137–156.

[4] Crawley JN, Minireview, Galanin-acetylcholine interactions: Relevance to memory and Alzheimer's disease. ***Life Sci*** 58 (1996) 2185–2199.

[5] Floren A, Land T, Langel U, Galanin receptor subtypes and ligand binding. ***Neuropeptides*** 34 (2000) 331–337.

[6] Fuji S, Kuroda Y, Ito K, Yoshioka M, Kaneko K, Yamazaki Y, Sasaki H, Kato H, Endogenous adenosine regulates the effects of low-frequency stimulation on the induction of long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. ***Neurosci Lett*** 279 (2000) 121-124.

[7] Gaito J, Gaito ST, Prior treatment with 1 Hz stimulation retards the development of kindling induced by 60-Hz stimulation. ***Bull Psychonom Soc*** 15 (1980) 351–353.

[8] Gean PW, Shinnick-Gallagher P, Anderson AC Spontaneous epileptiform activity and alteration of GABA- and of NMDA-mediated neurotransmission in amygdala neurons kindled in vivo. ***Brain Res*** 494 (1989) 177–181.

[9] Godard GV, McIntyre DC, Leech CK, A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. ***Exp Neurol*** 25 (1969) 295-330.

[10] Goodman JH, Berger RE, Techeng TK, Preemptive low frequency stimulation decreases the incidence of amygdala-kindled seizures. ***Epilepsia*** 46 (2005) 1–7.

[11] Hauser WA, Hesdorffer DH, editors. ***Epilepsy: frequency, causes and consequences***. New York: Demos Press, 1990.

[12] Kuteeva E, Calza L, Holmberg K, Theodorsson E, Ögren SO, Hokfelt T, Distribution of galanin and galanin transcript in the brain of a galanin-overexpressing transgenic mouse. ***J Chem Neuroanat*** 28 (2004) 185–216.

[13] Lopez-Meraz ML, Neri-Bazan L, Rocha L, Low-frequency stimulation modifies receptor binding in rat brain. ***Epilepsy Res*** 59 (2004) 95-105.

[14] Lundkvist J, Land T, Kahl U, Bedecs K, Bartfai T, cDNA sequence, ligand binding, and regulation of galanin/GMAP in mouse brain. ***Neurosci Lett*** 200 (1995) 121–124.

[15] Lundstro¨m L, Elmquist A, Bartfai T, Langel U, Galanin and its receptors in neurological disorders. ***Neuromol Med*** 7 (2005) 157–180.

[16] Mazarati A, Lu X, Kilk K, Langel U, Wasterlain C, Bartfai T, Galanin type 2 receptors regulate neuronal survival, susceptibility to seizures and seizure-induced neurogenesis in the dentate gyrus. ***Eur J Neurosci*** 19 (2004a) 3235–3244.

[17] Mazarati A, Lu X, Shinmei S, Badie-Mahdavi H, Bartfai T, Patterns of seizures, neruonal injury and neurogensis in three models of status epilepticus in galanin receptor type 1 (GalR1) knockout mice. ***Neuroscience*** 128 (2004b) 431–441.

[18] Mazarati A, Wasterlain CG, Anticonvulsant effects of four neuropeptides in the rat hippocampus during self-sustaining status epilepticus. ***Neurosci Lett*** 331 (2002) 123–127.

[19] Mazarati AM, Hohmann JG, Bacon A, Liu H, Sankar R, Steiner RA, Wynick D, Wasterlain CG, Modulation of hippocampal excitability and seizures by galanin. ***J Neurosci*** 20 (2000) 6276–6281.

[20] Mazarati AM, Liu H, Soomets U, Sankar R, Shin D, Katsumori H, Langel U, Wasterlain CG, Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus. ***J Neurosci*** 18 (1998) 10070–10077.

[21] Mazarati AM, Halaszi E, Telegdy G, Anticonvulsive effects of galanin administered into the central nervous system upon the picrotoxin-kindled seizure syndrome in rats. ***Brain Res*** 589 (1992) 164–166.

[22] McIntyre DC, Wong RK, Modification of local neuronal interactions by amygdala kindling examined in vitro. ***Exp Neurol*** 88 (1985) 529–537.

[23] McIntyre DC, Wong RK, Cellular and synaptic properties of amygdala-kindled pyriform cortex in vitro. ***J Neurophysiol*** 55 (1986) 1295– 1307.

[24] Miller MA, Kolb PE, Leverenz JB, Peskind ER, Raskind MA, Preservation of noradrenergic neurons in the locus

[34] Wasterlain, CG, Mazarati AM, Shirasaka Y, Thompson KW, Penix L, Liu H, Katsumori H, Seizure-induced hippocampal damage and chronic epilepsy: a hebbian theory of epileptogenesis. ***Adv Neurol*** 79 (1999) 829–843.

[35] Wang S, Hashemi T, Fried S, Clemmons AL, Hawes BE, Differential intracellular signaling of the GalR1 and GalR2 galanin receptor subtypes. ***Biochemistry*** 37 (1998) 6711–6717.

[36] Weiss SR, Xiu-Li L, Noguera EC, Rosen B, He L, Heynen T, Post RM, Quenching: Persistent alterations in seizure and afterdischarge threshold following low frequency stimulation. In: Corcoran E, Moshe, SL, editors. ***Kindling.*** New York and London, Adv Behav Biol Plenum Press, 1998, p. 101–119.

[37] Weiss SR, Li XL, Rosen JB, Heynen T, Post RM, Quenching: inhibition of development and expression of kindled seizures with low frequency stimulation. ***Neuroreport*** 6 (1995) 2171–2176.

[38] Xu ZQ, Shi TJ, Ho¨ kfelt T, Galanin/GMAP- and NPY-like immunoreactivities in locus coeruleus and noradrenergic nerve terminals in the hippocampal formation and cortex with notes on the galanin-R1 and -R2 receptors. ***J Comp Neurol*** 392 (1998) 227–251.

[39] Zhang X, Verge VM, Wiesenfeld-Hallin Z, Piehl F, Hokfelt T, Expression of neuropeptides and neuropeptide mRNAs in spinal cord after axotomy in the rat, with special reference to motoneurons and galanin. ***Exp Brain Res*** 93 (1993) 450–461.

[40] Zini S, Roisin MP, Armengaud C, Ben-Ari Y, Effects of potassium channels modulators on the release of glutamate induced by ischaemic-like conditions in rat hippocampal slices. ***Neurosci Lett*** 153 (1993a) 202–205.

[41] Zini S, Roisin M, Langel U, Bartfai T, Ben-Ari Y, Galanin reduces release of endogenous excitatory amino acids in the rat hippocampus. ***Eur J Pharmacol*** 245 (1993b) 1–7.

ceruleus that coexpress galanin mRNA in Alzheimer's disease. ***J Neurochem*** 73 (1999) 2028–2036.

[25] Paxinos G, Watson C, editors. ***The rat Brain in stereotaxic coordinates***. Academic Press, New York, 1986.

[26] Perez SE, Wynick D, Steiner RA, Mufson EJ, Distribution of galaninergic immunoreactivity in the brain of the mouse. ***J Comp Neurol*** 434 (2001) 158–185.

[27] Sakurai E, Maeda T, Kaneko S, Akaike A, Satoh M, Galanin inhibits long-term potentiation at Schaffer collateral-CA1 synapses in guinea-pig hippocampal slices. ***Neurosci Lett*** 212 (1996) 21–24.

[28] Sato M, Racine RJ, McIntyre DC, Kindling: basic mechanisms and clinic validity. ***Electroencephalogr Clin Neurophysiol*** 76 (1990) 459–472.

[29] Sillanpaa M, Jalava M, Kaleva O, Shinnar S, Long-term prognosis of seizures with onset in childhood. ***N Engl J Med*** 338 (1998) 1715–1722.

[30] Smith KE, Forray C, Walker MW, Jones KA, Tamm JA, Bard J, Branchek TA, Linemeyer DL, Gerald C, Expression cloning of a rat hypothalamic galanin receptor coupled to phosphoinositide turnover. ***J Biol Chem*** 272 (1997) 24612–24616.

[31] Sollenberg UE, Lundström L, Bartfai T, Langel T, M871-A novel peptide antagonist selectively recognizing the galanin receptor type 2. ***Int J Pept Res Ther*** 12 (2006) 115–119.

[32] Velisek L, Veliskova J, Stanton PK, Low-frequency stimulation of the kindling focus delay basolateral amygdala kindling in immature rats. ***Neurosci Lett*** 326 (2002) 61-63.

[33] Wasterlain CG, Mazarati AM, Naylor D, Niquet J, Liu H, Suchomelova L, Baldwin R, Katsumori H, Shirasaka Y, Shin D, Sankar R, Short-term plasticity of hippocampal neuropeptides and neuronal circuitry in experimental status epilepticus. ***Epilepsia*** 43 (2002) Suppl 5: 20–29.