

## Effect of low frequency stimulation of perforant path on kindling acquisition and synaptic transmission in the dentate gyrus in rats

Mohammad Mohammad-Zadeh, Javad Mirnajafi-Zadeh\*, Yaghoub Fathollahi, Mohammad Javan, Parviz Ghorbani

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

### Abstract

**Introduction:** Previous studies have shown that low frequency stimulation (LFS) has an inhibitory effect on kindling acquisition. However, the mechanism of this effect has not been completely determined. In the present study, the effect of LFS of the perforant path on seizures induced by rapid perforant path kindling was investigated.

**Methods:** Animals were kindled by electrical stimulation of perforant path. One group of animals (n=6) received LFS (0.1 ms pulses at 1 Hz, 200 pulse, and 50-150  $\mu$ A) after termination of each kindling stimulations. In control groups, animals received only kindling stimulations (n=8) or LFS (n=4). Basal field potential recording and paired pulse stimulations were done every day, before kindling stimulations.

**Results:** Application of LFS significantly retarded the kindling acquisition and increased the number of stimulations to achieve different seizure stages [F(4,60)=10.9, P<0.0001]. LFS also prevented increment of slope of field excitatory postsynaptic potentials and population spike amplitude during kindling (P<0.001) (There was 88.6 $\pm$ 1.7% increment in fEPSP and 94 $\pm$ 2.3% increment in PS in kindled group and 3.5 $\pm$ 0.05% increment in fEPSP and 12.3 $\pm$ 0.1% decrease in PS in kindled+LFS group). In addition, LFS significantly prevented the marked increase in early (10-50 ms intervals) and late (300-1000 ms intervals) paired pulse depression induced by kindling (P<0.01).

**Conclusion:** According to obtained results, it may be suggested that LFS of perforant path has a significant antiepileptogenic effect on perforant path kindled seizures through inhibition of synaptic transmission in dentate gyrus. Meanwhile, LFS prevents compensatory increase in the paired pulse depression during kindling acquisition.

**Keywords:** Kindling, Low frequency stimulation, Dentate gyrus, Perforant path, Seizure

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

## تأثیر تحریک الکتریکی با فرکانس پایین بر اکتساب کیندلینگ و انتقال سیناپسی در شکنج دنداندار موش صحرایی

محمد محمدزاده، سیدجواد میرنجفی زاده\*، یعقوب فتح‌اللهی، محمد جوان، پرویز قربانی  
گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.  
دریافت: بهمن ۸۵ بازبینی: خرداد ۸۶ پذیرش: خرداد ۸۶

### چکیده

**مقدمه:** مطالعات قبلی نشان داده است که تحریک الکتریکی با فرکانس پایین اثر مهارى بر روند کیندلینگ دارد، اما مکانیسم این پدیده هنوز به درستی مشخص نیست. در مطالعه حاضر اثر تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (LFS) مسیر پرفورنت بر تشنجات القا شده توسط کیندلینگ مسیر پرفورنت، بر فعالیت سیناپسی ناحیه ژيروس دنداندار مورد بررسی قرار گرفت.

**روش‌ها:** حیوانات با تحریک الکتریکی مسیر پرفورنت کیندل شدند. در گروهی از حیوانات ( $n=6$ ) پس از هر بار تحریک کیندلینگ، تحریک با فرکانس پایین (۲۰۰ پالس با فرکانس ۱ Hz که مدت زمان هر پالس ۰/۱ ms و شدت بین ۱۵۰-۵۰ میکروآمپر بود) اعمال می‌شد. حیوانات گروه کنترل فقط تحریکات کیندلینگ ( $n=8$ ) و یا LFS ( $n=4$ ) دریافت می‌کردند. در تمام حیوانات، پتانسیل‌های میدانی و تحریکات زوج پالس هر روز قبل از شروع تحریکات کیندلینگ ثبت می‌شدند.

**یافته‌ها:** اعمال تحریک با فرکانس پایین به مسیر پرفورنت به طور معنی داری روند کیندلینگ را به تعویق انداخت و تعداد تحریکات لازم برای رسیدن به مراحل مختلف تشنج را افزایش داد ( $F_{(۳,۶)}=10/9, P<0/001$ ). اعمال تحریک الکتریکی با فرکانس پایین از افزایش شیب پتانسیل‌های میدانی برانگیخته و دامنه اسپایک‌های تجمعی نیز جلوگیری کرد ( $P<0/001$ )، ( $1/7 \pm 8/6\%$  افزایش شیب پتانسیل‌های میدانی و  $2/3 \pm 94\%$  افزایش دامنه اسپایک‌های تجمعی در گروه کیندل و  $0/5 \pm 2/5\%$  افزایش شیب پتانسیل‌های میدانی و  $0/1 \pm 12/3\%$  کاهش دامنه اسپایک‌های تجمعی در گروه کیندل LFS+ ایجاد شد). به علاوه، تحریک الکتریکی با فرکانس پایین به طور معنی داری از افزایش یافتن میزان تضعیف زوج پالس (paired pulse depression) توسط کیندلینگ، جلوگیری کرد ( $P<0/01$ ).

**نتیجه‌گیری:** براساس نتایج این تحقیق، پیشنهاد می‌شود که تحریک الکتریکی با فرکانس پایین مسیر پرفورنت اثر ضد تشنجی معنی داری بر تشنجات القا شده توسط کیندلینگ مسیر پرفورنت دارد و این اثر از طریق مهار انتقال سیناپسی در ناحیه شکنج دنداندار صورت می‌گیرد. همچنین تحریک الکتریکی با فرکانس پایین از افزایش جبرانی در تضعیف زوج پالس در طی روند کیندلینگ جلوگیری می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** کیندلینگ، تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین، ژيروس دنداندار، مسیر پرفورنت، تشنج.

### مقدمه

درصد مردم دنیا را درگیر خود کرده است [۲۸]. روش‌های درمانی اخیر، به طور کامل موفقیت آمیز نبوده و به روش‌های درمانی جدید نیاز می‌باشد. پیشرفتهای اخیر در درمان اختلالات حرکتی [۹] با استفاده از تحریک الکتریکی، محققین را تشویق نمود تا از این روش برای درمان صرع نیز استفاده کنند. تحریک الکتریکی با فرکانس پایین

صرع یکی از رایج‌ترین اختلالات عصبی است که بیش از یک

mirnajaf@modares.ac.ir  
www.phypha.ir/ppj

\* نویسنده مسئول مکاتبات:  
وبگاه مجله:

تسهیل وجود دارد این فاز نسبت به فاز اولیه مهار ضعیف تر است و به جریان‌های پتاسیمی القا شده توسط کلسیم نسبت داده می‌شود. این مرحله دوم مهار در فواصل زمانی ۱۵۰ تا ۱۰۰۰ میلی ثانیه بین دو پالس اتفاق می‌افتد [۱۹].

هر چند مطالعات زیادی وجود دارد که مکانیسم‌های اثر LFS را در تولید LTD یا تضعیف پس از تقویت مورد بررسی قرار داده اند، اما گزارشی در مورد مکانیسم اثرات ضد تشنجی LFS در تشنجات القا شده توسط کیندلینگ وجود ندارد. بنابراین، در مطالعه حاضر سعی بر این بود تا با استفاده از پروتکل کیندلینگ سریع مسیر پرفورنت، اثرات LFS بر کمیت‌های رفتاری تشنجهای ناشی از کیندلینگ و فعالیت سیناپسی ناحیه شکنج دنداندار مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین با بررسی پاسخهای زوج پالس در این ناحیه، تغییرات احتمالی ایجاد شده در سیستم مهاري ناحیه شکنج دنداندار پس از اعمال LFS، در طی کیندلینگ مسیر پرفورنت مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

## مواد و روشها

۳۶ موش صحرایی نر (۳-۴ ماهه) که از انستیتو پاستور خریداری شده بود در حیوانخانه با شرایط مناسب نور (۱۲ ساعت نور-۱۲ ساعت تاریکی) و در قفسهای منفرد که آزادانه به آب و غذا دسترسی داشته باشند، نگهداری می‌شدند. تمامی آزمایشها در یک زمان (قبل از ظهر) انجام می‌شد تا دوره‌های زمانی شبانه روز اثری بر نتیجه آزمایشها نداشته باشد.

به منظور جراحی، حیوانات با سدیم پنتوپاربتال (۵۰ mg/kg) داخل صفاقی بیهوش شده و در دستگاه استریوتاکس قرار داده می‌شدند. یک الکترود دو قطبی در مسیر پرفورنت (با مختصات: ۶/۹- میلی متر قدامی خلفی و ۴/۱- میلی متر جانبی نسبت به برگما و ۲/۵- میلی متر به سمت پایین نسبت به سخت شامه) و یک الکترود تک قطبی در شکنج دنداندار (با مختصات: ۲/۸- میلی متر قدامی خلفی و ۱/۸ میلی متر جانبی نسبت به برگما و ۳-۲/۵ میلی متر به سمت پایین نسبت به سخت شامه) قرار می‌گرفت [۳۰]. عمق الکترودهای تحریک و ثبت به گونه‌ای تنظیم می‌شد که بهترین و بزرگترین پاسخ از شکنج دنداندار گرفته شود. الکترودها (از جنس فولاد ضدزنگ با پوشش تفلون، قطر ۱۲۷ میکرومتر، شرکت A.M آمریکا) در تمام طولشان (بجز نوک)، عایق بودند. دو الکترود

(Low frequency stimulation; LFS، ۱ تا ۳ هرتز) همانطور که باعث القای تضعیف طولانی مدت [۱۵] و تضعیف پس از تقویت طولانی مدت (depotiation) می‌شود [۲۳]، تأثیر محافظتی بلند مدتی بر فعالیت صرعی دارد. از لحاظ بالینی، مشاهده شده که در بیماران مبتلا به صرع لوب گیجگاهی، LFS تعداد اسپایک‌های بین حمله‌ای را کاهش می‌دهد [۳۹، ۱۷، ۱۶]. همچنین نشان داده شده است که با استفاده از الکترودهای گذاشته شده در زیر سخت شامه بیماران با صرع غیر قابل درمان، تحریک قشر با فرکانس پایین اثر متوقف کننده‌ای بر تولید اسپایک‌های صرعی دارد [۴۰].

اعمال LFS اثرات مهاری بر کانون صرع در حیوانات بالغ و غیر بالغ آزمایشگاهی نیز داشته است [۳۹]. تحریک نواحی عمقی مغز در کاهش شدت تشنجات القاء شده به وسیله مدل‌های مختلف آزمایشگاهی، مانند کیندلینگ، مؤثر است و نشان داده شده است که در موشهای آزمایشگاهی کیندل شده تحریک الکتریکی با فرکانس پایین اثر مهاری بر کانون صرع دارد [۳۸، ۳۷، ۲۴، ۱۶].

در میان نواحی مختلف مغز، شکنج دنداندار نقش مهمی در صرع لوب گیجگاهی دارد و یکی از نواحی حساس برای ایجاد کیندلینگ است [۷، ۲۹]. کیندلینگ باعث تقویت مدارهای مهاری و تحریک در شکنج دنداندار می‌شود [۲۵، ۲۰، ۱۲، ۵]. به طور مثال نشان داده شده است که کیندلینگ شیب پتانسیل‌های پس سیناپسی میدانی و دامنه اسپایک‌های دسته جمعی را افزایش می‌دهد [۳۳، ۳۲]. علاوه بر این، کیندلینگ در ناحیه شکنج دنداندار تضعیف اولیه زوج پالس (۵۰-۱۰ میلی ثانیه) و تضعیف تأخیری زوج پالس (۱۰۰-۱۵۰) را تقویت می‌کند، که ممکن است ناشی از تقویت در انتقال سیناپسی نرونهای مهاری باشد. کیندلینگ تسهیل زوج پالس (۷۰-۱۰۰ میلی ثانیه) را نیز در این ناحیه کاهش می‌دهد [۱۹].

تحریک زوج پالس برای ارزیابی فعالیت سیناپسی مدارهای مهاری در شکنج دنداندار مورد استفاده قرار می‌گیرد. با تحریک مسیر پرفورنت به شکل زوج پالس می‌توان تخمینی از مهار راجعه را به دست آورد. اگر پالس دوم در محدوده زمانی پتانسیلهای مهاری پس سیناپسی پاسخ اول قرار گیرد (کمتر از ۵۰ میلی ثانیه)، مقدار تضعیف پالس دوم نسبت به پالس اول معیاری از مهار اولیه است [۳۶، ۱۲، ۵]. در فواصل زمانی طولانی تر بین زوج پالس، اسپایک تجمعی دوم نسبت به اول بزرگتر خواهد بود و پدیده تسهیل مشاهده می‌شود. اما یک فاز دوم مهاری نیز پس از مرحله

فواصل زمانی ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۳۹، ۵۰، ۷۰، ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی ثانیه تست شدند. این فواصل زمانی به صورت تصادفی مورد آزمایش قرار می‌گرفتند و هر زوج پالس با فاصله ۱۰ ثانیه (فرکانس ۰/۱ Hz) اعمال می‌شد. شاخص زوج پالس توسط نسبت دامنه اسپایک تجمعی تحریک دوم به دامنه اسپایک تجمعی تحریک اول به دست می‌آمد. آزمون‌های زوج پالس در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ در طی دوره کیندلینگ انجام می‌شد. در هر روز، پاسخهای زوج پالس قبل از تحریکات کیندلینگ ثبت می‌شد.

حیوانات به چهار گروه تقسیم‌بندی شدند: ۱- گروه کنترل، ۲- گروه کیندل، ۳- گروه کیندل + LFS و ۴- گروه LFS. حیوانات گروه کیندل بر اساس پروتکل کیندلینگ سریع، تحریک داده می‌شدند و پارامترهای کیندلینگ ثبت می‌شد. پارامترهای پتانسیل میدانی نیز به مدت ۲۰ دقیقه قبل از تحریکهای کیندلینگ ثبت می‌شدند. همانطور که قبلاً گفته شد، شاخص زوج پالس نیز در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ قبل از تحریکهای کیندلینگ ثبت می‌شد. در گروه کیندل + LFS، همان پروتکل تحریکات کیندلینگ اعمال می‌شد، اما در فاصله ۵ دقیقه بین تحریکات کیندلینگ (به مدت ۲۰۰ ثانیه)، از تحریک با فرکانس پایین (۱ Hz) نیز استفاده می‌شد. شروع این الگوی تحریک، ۶۰ ثانیه بعد از هر بار تحریک کیندلینگ بود. در گروه LFS، حیوانات فقط تحریکات LFS را دریافت می‌کردند و در گروه کنترل به حیوانات هیچ گونه تحریکی اعمال نمی‌شد. در هر گروه آزمایشی پس از حذف نمونه‌های بد بافتی ۴ تا ۸ حیوان به کار برده شد. در پایان هر آزمایش حیوان توسط اتر، کاملاً بیهوش شده و پس از پرفیوژن با سالین و فرمالین، مغز آن خارج شده و به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰٪ قرار می‌گرفت. آنگاه از محل الکترود برش‌گیری به عمل می‌آمد تا محل الکترود 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 در آنها درست بود، مورد ارزیابی نهایی قرار می‌گرفت.

داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین (SEM) بیان شده‌اند. در مورد ثبت پتانسیلهای میدانی پایه، هر نقطه بیانگر میانگین ۱۲ پاسخ و برای آزمایشهای زوج پالس و منحنی شدت/پاسخ هر نقطه بیانگر میانگین ۶ پاسخ ثبت شده بود. در روز اول از ۱۲۰ پاسخی که در مدت ۲۰ دقیقه در پاسخ به تحریکات با فرکانس ۰/۱ Hz (به عنوان ثبت پایه) بدست می‌آمد، میانگین

تک قطبی نیز به وسیله پیچ‌های متصل به آنها به سطح مجمله در لوب پیشانی محکم می‌شدند. در پایان کارگذاری الکترودها، بین‌های متصل به آنها در داخل مادگی سوکت مخابراتی قرار داده می‌شد و سوکت توسط سیمان دندانپزشکی به روی سر حیوان متصل می‌گردید.

به منظور ثبت پتانسیل‌های میدانی، برای به دست آوردن شدت جریانی که در تمامی مراحل آزمایش از آن استفاده شود، منحنی شدت- پاسخ باید به دست می‌آمد. برای این کار، پالسهای تک فازی مربعی ۰/۱ میلی ثانیه‌ای که توسط استیمولاتور تولید می‌شود، هر ۱۰ ثانیه در شدت‌های مختلف (۱۰۰ تا ۸۰۰ میکروآمپر) به مسیر پرفورنت اعمال و پتانسیل‌های سیناپسی برانگیخته از شکنج دنداندار ثبت می‌شدند. سپس، ۱۲ پاسخ برانگیخته سیناپسی میانگین‌گیری می‌گردید و شیب و دامنه پتانسیلهای پس سیناپسی اندازه‌گیری می‌شد. برای هر حیوان منحنی شدت پاسخ تعیین می‌شد و شدتی را که ۵۰ درصد پاسخ ماکزیمم تولید می‌کرد به عنوان شدت آزمون (test pulse intensity) مشخص می‌شد. پاسخ‌های برانگیخته شده و دیجیتالیزه شده (در ۱۰ کیلو هرتز) و ۱۰۰ برابر تقویت می‌شد.

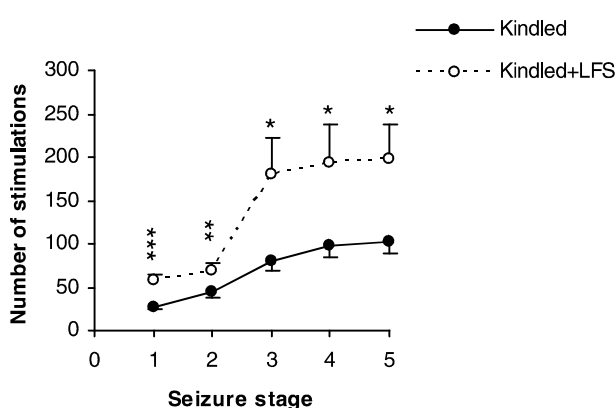
برای ایجاد کیندلینگ سریع، حداقل ۱۰ روز پس از جراحی، حیوانات با شدت آستانه، تحریک می‌شدند. برای بدست آوردن شدت آستانه، ابتدا حیوان مورد نظر توسط جریانی با شدت ۳۰ میکروآمپر تحریک می‌گردید. فرکانس و مدت زمان تحریک به ترتیب ۵۰ هرتز و ۵ ثانیه و مدت زمان هر پالس ۱ میلی ثانیه بود. در صورتیکه امواج متعاقب (حداقل به مدت ۱۰ ثانیه) ثبت می‌شدند، این شدت جریان به عنوان شدت جریان آستانه شناخته می‌شد. در غیر این صورت، به تدریج شدت جریان با فواصل ۵ دقیقه‌ای، هر بار ۱۰ میکروآمپر افزایش داده می‌شد، تا اینکه اولین امواج تخلیه متعاقب ثبت گردد. سپس حیوانات با این شدت جریان هر روز ۱۲ بار با فاصله زمانی ۵ دقیقه تا کیندل شدن کامل تحریک داده می‌شدند. مدت زمان تخلیه‌های متعاقب و مدت زمان لازم برای رسیدن به مراحل مختلف تشنج (مراحل ۱ تا ۵ بر اساس تقسیم‌بندی Racine [۳۱]) اندازه‌گیری می‌شد.

به دنبال دوره بهبودی آزمایشهای زوج پالس نیز یک روز در میان انجام می‌شد. شدت تحریک برای آزمایشهای زوج پالس همان پالس آزمون بود (۵۰۰-۱۰۰  $\mu$ A). ۱۰ زوج پالس با

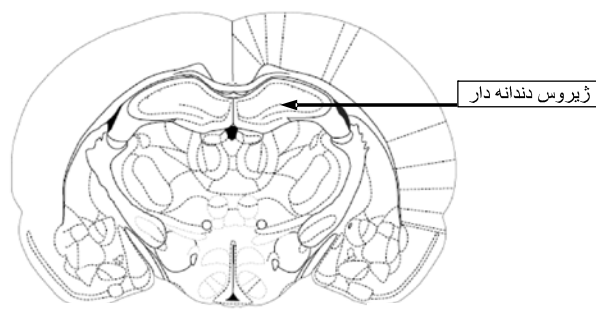
نشان نداد [F(۶,۵۶)=۰/۱, P=۰/۹۸]. شدت پالس آزمون (بر حسب میکروآمپر) برای گروههای کنترل، کیندل، کیندل+LFS و LFS، به ترتیب، ۲۷۶±۲۶، ۲۸۶±۲۸، ۲۹۷±۲۰ و ۲۴۰±۳۱ بود. آزمون ANOVA یک طرفه تفاوت معنی داری را بین این کمیتها نشان نداد، به عبارت دیگر تحریک پذیری سیناپسی در گروههای مختلف در شروع آزمایشها یکسان بود.

به کار بردن LFS باعث کند شدن روند کیندلینگ شد. آزمون ANOVA دو طرفه و آزمون Tukey نشان داد که تعداد متوسط تحریک برای کیندل شدن (مرحله ۵) یا مراحل دیگر تشنج به طور معنی داری در گروه کیندل+LFS نسبت به گروه کیندل (شکل ۲) افزایش یافت (P<۰/۰۰۱). علاوه بر این، اندازه گیری و مقایسه امواج تخلیه متعاقب تجمعی اختلاف معنی داری بین دو گروه نشان نداد.

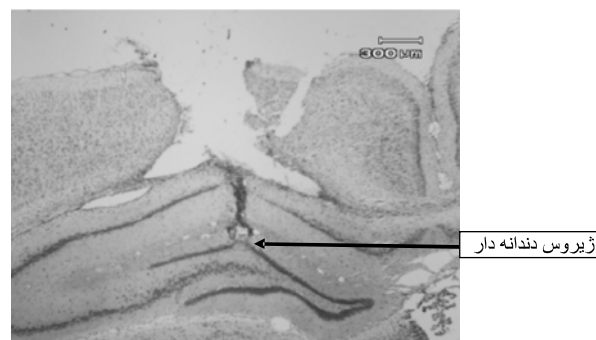
در طی روند کیندلینگ انتقال سیناپسی، همانند روند ایجاد LTP، تقویت می شود. با گذشت زمان شیب پتانسیلهای میدانی و دامنه اسپایکهای تجمعی افزایش می یابد (شکل ۳). شکل ۳ نشان می دهد که در طی ۷ روز اول روند کیندلینگ در گروه کیندل شیب پتانسیلهای میدانی ۱/۷±۰/۸۸٪ و دامنه اسپایکهای تجمعی ۲/۳±۰/۹۴٪ افزایش را نشان می دهد. اعمال LFS، از اثرات تقویتی کیندلینگ بر انتقال سیناپسی به طور آشکار جلوگیری کرد، بطوری که در گروه کیندل+LFS تغییر معنی داری در ثبت پتانسیلهای میدانی در ۷ روز اول روند کیندلینگ مشاهده نشد (شیب پتانسیلهای میدانی ۰/۵±۰/۳۱٪ افزایش و دامنه اسپایکهای تجمعی ۰/۱±۰/۱۲٪ درصد کاهش را نشان داد) (شکل ۳).



شکل ۲- اعمال LFS باعث کند شدن روند کیندلینگ شد. آزمون ANOVA دو طرفه و آزمون Tukey نشان داد که تعداد متوسط تحریک برای کیندل شدن (مرحله ۵) یا مراحل دیگر تشنج به طور معنی داری در گروه کیندل+LFS (n=۶) نسبت به گروه کیندل (n=۸) افزایش می یابد. \* نشان دهنده P<۰/۰۵، \*\* نشان دهنده P<۰/۰۰۱ و \*\*\* نشان دهنده P<۰/۰۰۱ است.



Bregma -2.8

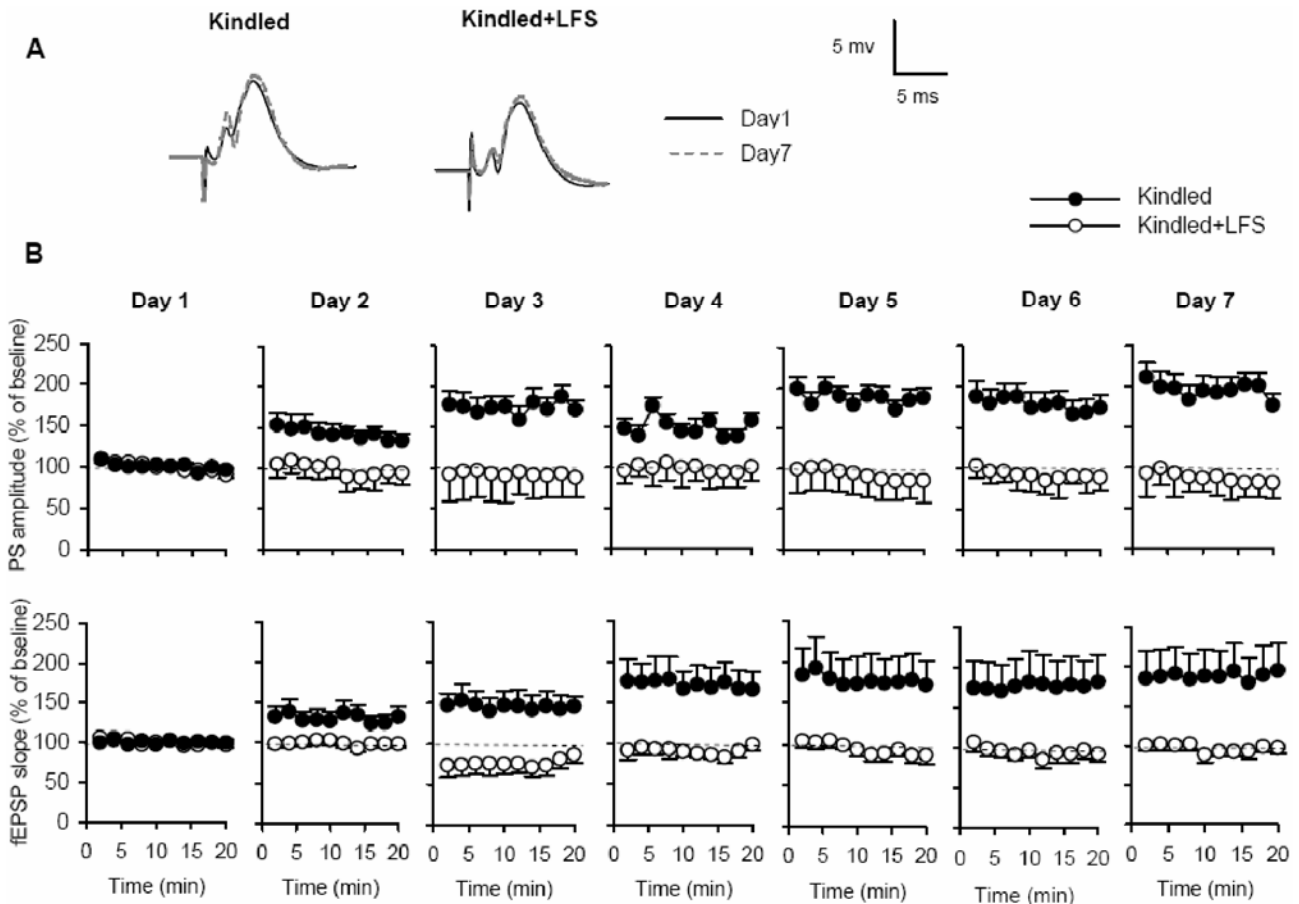


شکل ۱- (A) نمایی از برش کرومال در ناحیه شکنج دنداندار از اطلس پاکسینوس و واتسون [۲۰]. (B) تصویر میکروسکوپ نوری از ناحیه شکنج دنداندار پس از رنگ آمیزی نیسل، همانطور که نشان داده شده الکتروثبت در ناحیه گرانولی شکنج دنداندار است.

گرفته می شد و سپس ۱۲۰ پاسخ به ۱۰ گروه ۱۲ تایی تقسیم می گردید، به طوری که در شکل ۲ هر نقطه بیانگر میانگین ۱۲ پاسخ است. میانگین هر ۱۲ پاسخ در روز اول و روزهای بعد نسبت به میانگین کل ۱۲۰ پاسخ روز اول مقایسه می شدند. از آزمون ANOVA یک طرفه یا دو طرفه و آزمون Tukey برای مقایسه پارامترها در گروههای مختلف در روزهای مختلف مورد استفاده قرار می گرفت. در هر مورد سطح معنی دار آماری P<۰/۰۵ می باشد.

## یافته ها

ارزیابی بافت شناسی نشان داد که الکترودها در موقعیت خود (شکنج دنداندار) قرار داشتند (شکل ۱) و در محل تحریک هیچ گونه آسیب بافتی مشاهده نشد. اندازه گیری پارامترهای سیناپسی در گروه کنترل نشان داد که هیچ اختلاف معنی داری بین روزهای مختلف وجود ندارد. علاوه بر این، به کار بردن LFS اثر معنی داری بر این پارامترها نداشت (داده ها نشان داده نشده است. n=۴). آزمون ANOVA دو طرفه اختلاف معنی داری بین دو گروه شم و LFS و داخل گروهی



**شکل ۳- (A)** میانگین ۱۲ ثبت در روزهای ۱ و ۷ در دو گروه کیندل و گروه کیندل+LFS. همانطور که مشاهده می‌شود، بر خلاف گروه کیندل، افزایشی در دامنه اسپایکهای تجمعی روز ۷ نسبت به روز ۱ در گروه کیندل+LFS وجود نیامده است. **(B)** نمودارهای زمانی تغییرات بوجود آمده در دامنه اسپایکهای تجمعی و شیب پتانسیلهای میدانی در گروه کیندل (n=۶) و گروه کیندل+LFS (n=۸) در طی روند کیندلینگ (۷ روز). هر نمودار پاسخهای ثبت شده از شکنج دنداندار (۲۰ دقیقه) را پس از تحریک مسیر پرفورنت نشان می‌دهد که هر روز قبل از تحریک کیندلینگ انجام می‌گرفت. آزمون ANOVA دو طرفه نشان داد که اعمال LFS از تقویت ایجاد شده در نتیجه تحریکهای کیندلینگ جلوگیری می‌کند [ $F(۶,۸۴)=۶, P<۰/۰۰۱$ ]. مقادیر بر اساس میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین بیان شده‌اند.

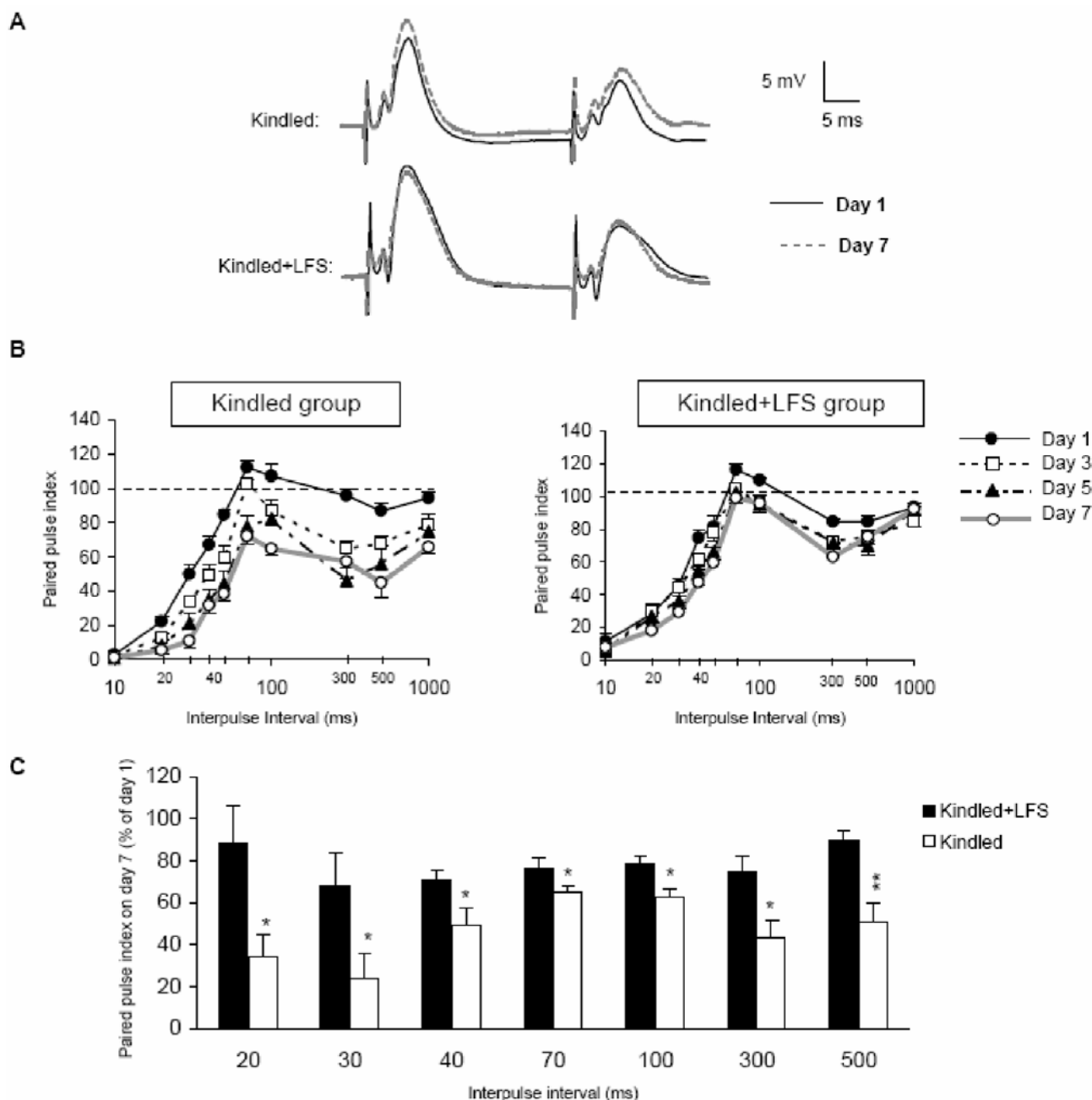
### بحث

نتایج ما نشان داد که اعمال LFS در طی روند کیندلینگ باعث به تعویق انداختن مراحل مختلف رفتاری تشنج و جلوگیری از تقویت پاسخهای سیناپسی می‌شود. اعمال LFS از افزایش شیب پتانسیل‌های میدانی و دامنه اسپایکهای تجمعی ناشی از کیندلینگ جلوگیری می‌کند. ارزیابی‌های بافت شناسی نشان داد که اثر تضعیفی LFS بر کیندلینگ ناشی از تخریب بافت نمی‌باشد.

مطالعات قبلی نشان داده است که اعمال LFS (۱-۳ Hz) در روند کیندلینگ آمیگدال تداخل ایجاد می‌کند [۱۶، ۱۷] و از تقویت طولانی مدت در انتقال سیناپسی آمیگدال توسط کیندلینگ جلوگیری می‌کند [۳، ۴]. علاوه بر این، اعمال LFS به

منحنی‌های زوج پالس در فواصل زمانی مختلف در همه گروهها بر اساس دامنه اسپایکهای تجمعی ترسیم شدند. شکل ۳A نمونه‌ای از ثبت زوج پالس در گروههای کیندل و کیندل+LFS در فواصل زمانی مختلف زوج پالس را نشان می‌دهد. همانطور که قبلاً گزارش شده [۱۲، ۲۵]، کیندلینگ تضعیف زوج پالس اولیه و ثانویه را در ناحیه ژيروس دنداندار افزایش می‌دهد (شکل ۴). اعمال LFS به همراه تحریکات کیندلینگ، از این افزایش جلوگیری کرد. همچنین، اعمال LFS به همراه تحریکات کیندلینگ، از ایجاد کاهش در تقویت زوج پالس (paired pulse facilitation)، توسط کیندلینگ، جلوگیری می‌کند.

به کار بردن LFS به تنهایی اثری بر روی پتانسیلهای میدانی نداشت (داده‌ها نشان داده نشده اند، n=4).



شکل ۴- (A) نمونه‌ای از پاسخهای زوج پالس ثبت شده از شکنج دنداندار در گروه کیندل و کیندل+LFS در فواصل زمانی بین پالسی ۳۰ میلی ثانیه. اعمال LFS باعث جلوگیری از افزایش تضعیف زوج پالس شده است. (B) نمودار شاخص زوج پالس، مقادیر به دست آمده برای فواصل زمانی متفاوت بین زوج پالس در گروه کیندل (چپ؛ n=۸) و کیندل+LFS (راست؛ n=۶). تقویت بوجود آمده در تضعیف زوج پالس اولیه و ثانویه و تضعیف بوجود آمده در تسهیل زوج پالس در نتیجه کیندلینگ با اعمال LFS مهار می‌شود. (C) در صد تغییرات در شاخص زوج پالس در روز ۷ نسبت به روز ۱ برای ۶ فاصله زمانی بین زوج پالس. همانطور که شکل نشان می‌دهد اختلاف معنی داری در تمامی فواصل زمانی بین زوج پالس‌ها وجود دارد. مقادیر بر اساس میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین بیان شده‌اند. \* نشان دهنده  $P < 0.05$  و \*\* نشان دهنده  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه کیندل است.

طور مستقیم به کانون صرع در انسان اثرات ضد تشنجی دارد [۴۰] و تعداد اسپایکهای بین حمله‌ای را در بیماران دارای صرع لوب گیجگاهی کاهش می‌دهد [۴۰].

نتایج آزمایشهای ما تأیید کننده مطالعاتی است که نشان دادند اعمال LFS باعث تأخیر در روند کیندلینگ می‌شود و تعداد تحریکات برای رسیدن به هر مرحله از تشنجات را افزایش می‌دهد. این اثر ضد تشنجی LFS هم بر مراحل تشنجی ۱ تا ۳ (Partial) و مراحل تشنجی ۴ و ۵ (generalized) مؤثر بود. مشابه با این نتیجه در تحقیقی نشان داده شده است که اعمال LFS در بخش مرکزی قشر پیریفورم در کیندلینگ آمیگدال، از

شکل ۴- (A) نمونه‌ای از پاسخهای زوج پالس ثبت شده از شکنج دنداندار در گروه کیندل و کیندل+LFS در فواصل زمانی بین پالسی ۳۰ میلی ثانیه. اعمال LFS باعث جلوگیری از افزایش تضعیف زوج پالس شده است. (B) نمودار شاخص زوج پالس، مقادیر به دست آمده برای فواصل زمانی متفاوت بین زوج پالس در گروه کیندل (چپ؛ n=۸) و کیندل+LFS (راست؛ n=۶). تقویت بوجود آمده در تضعیف زوج پالس اولیه و ثانویه و تضعیف بوجود آمده در تسهیل زوج پالس در نتیجه کیندلینگ با اعمال LFS مهار می‌شود. (C) در صد تغییرات در شاخص زوج پالس در روز ۷ نسبت به روز ۱ برای ۶ فاصله زمانی بین زوج پالس. همانطور که شکل نشان می‌دهد اختلاف معنی داری در تمامی فواصل زمانی بین زوج پالس‌ها وجود دارد. مقادیر بر اساس میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین بیان شده‌اند. \* نشان دهنده  $P < 0.05$  و \*\* نشان دهنده  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه کیندل است.

کمتری به سیستم مهارى وجود دارد.

همچنین آزمایشهای ما نشان داد که اعمال LFS به تنهایی اثر معنی داری بر انتقال سیناپسی و شاخص زوج پالس در طی هفت روز اول کیندلینگ نداشت. به نظر می رسد که این یافته ها با نتایج قبلی متفاوت است، در آن گزارشها آمده است که دامنه اسپایکهای جمعی در شکنج دنداندار به دنبال تحریک با فرکانس پایین (۱ Hz) مسیر پرفورنت دچار تضعیف [۱۱،۶] و همچنین پتانسیلهای پس سیناپسی مهارى دچار کاهش می شوند [۳۵،۲۷،۱۳]. اما باید دقت داشت که در همه گزارشهای قبلی، ثبت های داخل سلولی یا میدانی بلافاصله پس از اعمال LFS انجام می شد. در حالیکه ثبت های گرفته شده در آزمایشهای ما یک روز پس از اعمال LFS انجام صورت گرفت. علاوه بر این، همانطور که Burdette و Masukawa [۱۱] در مورد آن بحث کرده اند، این تغییرات ممکن است ناشی از تفاوت در ثبتهای داخل سلولی و میدانی باشد یا ناشی از تفاوت هایی باشد که در قدرت تضعیف زوج پالس در شرایط *in vitro* یا *in vivo* وجود دارد.

بررسی و مطالعه LFS بر انتقال سیناپسی ابتدا در مدل تقویت طولانی مدت (LTP) صورت گرفت. اعمال LFS باعث برگرداندن تقویت ایجاد شده توسط تحریک با فرکانس بالا شد (depotential) [۲۳]. کیندلینگ نیز با تسهیل طولانی مدت انتقال سیناپسی همراه است و از برخی لحاظ شبیه LTP می باشد [۸]. بنابراین مکانیسمهای مشابهی ممکن است توجیه کننده اثرات مهارى LFS بر LTP و کیندلینگ باشد. مکانیسم دقیقی که LFS ممکن است باعث کاهش شدت تشنجات شود هنوز ناشناخته است. ممکن است مکانیسم اثر مهارى LFS بر تشنج مشابه اثر مهارى LFS بر LTP باشد، یا مشابه حالتی باشد که LTD ایجاد می کند. با در نظر گرفتن این حقیقت که القای Depotential در حیوانات بالغ آسانتر از القای LTD است، پیشنهاد می شود که اعمال LFS بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ مشابه با Depotential باشد [۳۹]. علاوه بر این، القای LTD در شکنج دنداندار نسبتاً موفقیت آمیز نبوده است [۱۰،۱]. نوع تحریکات LFS در آزمایشهای ما مشابه تحریکاتی بوده است که قادر نبود LTD در شکنج دنداندار ایجاد کند، بنابراین احتمالاً اعمال LFS در

ظهور مراحل ۴ و ۵ تشنج جلوگیری می کند [۴۱]. اگرچه، اعمال LFS اثر معنی داری بر مدت زمان امواج تخلیه متعاقب ناشی از کیندلینگ نداشت. این عدم ارتباط بین مراحل حمله و امواج تخلیه متعاقب، نشان دهنده این است که احتمالاً مکانیسمهای مستقلی در کنترل رفتارهای تشنجی و الکتروفیزیولوژیک نقش دارند [۲۰،۱۸].

ثبت های پتانسیل میدانی به دست آمده تأیید کننده گزارشهای قبلی بود که نشان دادند کیندلینگ باعث تقویت پتانسیلهای میدانی در ناحیه شکنج دنداندار می شود [۳۳،۳۲]. به کار بردن LFS بعد از تحریکهای کیندلینگ از این تقویت در طی ۷ روز اول روند کیندلینگ جلوگیری کرد.

در راستای گزارشهای قبلی، مشاهده شد که کیندلینگ تضعیف زوج پالس اولیه و ثانویه را در شکنج دنداندار افزایش می دهد که ممکن است ناشی از تقویت مدارهای نورونی مهارى در این ناحیه باشد [۲۵،۱۲]. اما اعمال LFS از افزایش و تقویت در این مدارهای نورونی مهارى جلوگیری به عمل آورد.

مدارهای نورونی مهارى در شکنج دنداندار در طی روند کیندلینگ تقویت می شوند [۲۵،۲۰،۱۲]. سیستمهای مهارى به وسیله تحریک مسیر پرفورنت با زوج پالس با فواصل زمانی متغیر می تواند ارزیابی شود. در فواصل زمانی کوتاه بین دو پالس زوج (که کمتر از ۵۰ میلی ثانیه است)، تضعیف شدیدی در پاسخ به تحریک دوم مشاهده می شود (تضعیف زوج پالس اولیه) که ناشی از مهار راجعه (فیدبکی) است. این مدار فیدبکی به واسطه کانالهای کلری گابا (GABA<sub>A</sub>) باعث مهار سلولهای گرانولی و تولید پتانسیل پس سیناپسی مهارى می شوند [۳۶،۵]. تضعیف زوج پالس ثانویه یا تأخیری در فواصل زمانی نسبتاً بیشتر (بیشتر از ۱۵۰ میلی ثانیه) اتفاق می افتد. این تضعیف ممکن است ناشی از مدارهای نورونی فیدفوروارد باشد [۱۱۶]. این تضعیف در نتیجه فعال شدن گیرنده های GABA<sub>B</sub> یا هیپریپلاریزاسیون وابسته به کلسیم ایجاد می شود [۳۴،۶].

بر خلاف آنچه انتظار می رود، LFS نتوانست موجب تقویت سیستم مهارى GABA در طی روند کیندلینگ شود. افزایش قدرت سیستم مهارى گابا یک مکانیسم جبرانی است که در طی روند کیندلینگ اتفاق می افتد [۲۶]. از آنجاییکه اعمال LFS از تقویت سیناپسی ناشی از کیندلینگ جلوگیری کرد، می توان این احتمال را مطرح کرد که احتمالاً به دنبال اعمال LFS نیاز



- action in the dentate area. *Epilepsia* 22 (1981) 205-215.
- [6] Alger BE, Characteristics of a slow hyperpolarizing synaptic potential in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J Neurophysiol* 52 (1984) 892-910.
- [7] Ang CW, Carlson GC, Coulter DA, Massive and specific dysregulation of direct cortical input to the hippocampus in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 26 (2006) 11850-11856.
- [8] Baudry M, Long-term potentiation and kindling: similar biochemical mechanisms *Adv Neurol* 44 (1986) 401-410.
- [9] Benabid AL, Koudsie A, Benazzouz A, Piallat B, Krack P, Limousin-Dowsey P, Lebas JF, Pollak P, Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Adv Neurol* 86 (2001) 405-412.
- [10] Bramham CR, Srebro B, Induction of long-term depression and potentiation by low- and high-frequency stimulation in the dentate area of the anesthetized rat: magnitude, time course and EEG. *Brain Res* 405 (1987) 100-107.
- [11] Burdette LJ, Masukawa LM, Stimulus parameters affecting paired-pulse depression of dentate granule cell field potentials. II. Low-frequency stimulation. *Brain Res* 680 (1995) 63-72.
- [12] de Jonge M, Racine RJ, The development and decay of kindling-induced increases in paired-pulse depression in the dentate gyrus. *Brain Res* 412 (1987) 318-328.
- [13] Deisz RA, Prince DA, Frequency-dependent depression of inhibition in guinea-pig neocortex in vitro by GABAB receptor feed-back on GABA release. *J Physiol* 412 (1989) 513-541.
- [14] Dudek SM, Bear MF, Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992) 4363-4367.
- [15] Fujii S, Saito K, Miyakawa H, Ito K, Kato H, Reversal of long-term potentiation (depotentiation) induced by tetanus stimulation of the input to CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Brain Res* 555 (1991) 112-122.
- [16] Gaito J, The effect of variable duration one hertz interference on kindling. *Can J Neurol Sci* 7 (1980) 59-64.
- [17] Gaito J, Nobrega JN, Gaito ST, Interference effect of 3 Hz brain stimulation on kindling behavior induced by 60 Hz stimulation. *Epilepsia* 21 (1980) 73-84.
- [18] Gilbert ME, The NMDA antagonist MK-801 suppresses

آزمایشهای ما از طریق Depotentiation اثرات ضد تشنجی ایجاد کرده است. اما با این حال مکانیسمهای دیگر مانند القای LTD هم ممکن است نقش داشته باشند. به عنوان مثال، LFS در هیپوکمپ [۱۴]، قشر انتورینال [۲۲]، و قشر حرکتی [۲۱] باعث القای LTD می شود. به این نکته نیز باید اشاره کرد که هرچند الگوی خاصی از LFS که می تواند LTD یا Depotentiation در CA1 ایجاد کند، قادر به ایجاد اثرات مهارى در سیناپس مسیر پرفورنت-شکنج دنداندار نیست [۲]، اما این موضوع نمی تواند تأیید کننده این باشد که این مسیر به هیچ عنوان تحت تأثیر LFS مهار نمی شود.

بنابراین با توجه به اثرات مهارى LFS بر پتانسیلهای میدانی و مهار تضعیف زوج پالس توسط آن می توان این احتمال را مطرح کرد که اثرات مهارى LFS بر روند تشنجات ناشی از کیندلینگ، جلوگیری از ایجاد تقویت سیناپسی است، اما برای پی بردن به مکانیسمهای LFS و اثرات درمانی آن بر صرعهای غیر قابل درمان نیاز به تحقیق بیشتری است.

## منابع

- [1] Abraham WC, Bliss TV, An analysis of the increase in granule cell excitability accompanying habituation in the dentate gyrus of the anesthetized rat. *Brain Res* 331 (1985) 303-313.
- [2] Abraham WC, Mason-Parker SE, Logan B, Low-frequency stimulation does not readily cause long-term depression or depotentiation in the dentate gyrus of awake rats. *Brain Res* 722 (1996) 217-221.
- [3] Adamec R, Young B, Neuroplasticity in specific limbic system circuits may mediate specific kindling induced changes in animal affect-implications for understanding anxiety associated with epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* 24 (2000) 705-723.
- [4] Adamec RE, Evidence that limbic neural plasticity in the right hemisphere mediates partial kindling induced lasting increases in anxiety-like behavior: effects of low frequency stimulation (quenching) on long term potentiation of amygdala efferents and behavior following kindling. *Brain Res* 839 (1999) 133-152.
- [5] Adamec RE, McNaughton B, Racine R, Livingston KE, Effects of diazepam on hippocampal excitability in the rat:

- stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32 (1972) 281-294.
- [32] Robinson GB, Scwabassi RJ, Berger TW, Kindling-induced potentiation of excitatory and inhibitory inputs to hippocampal dentate granule cells. I. Effects on linear and non-linear response characteristics. *Brain Res* 562 (1991) 17-25.
- [33] Ruthrich H, Grecksch G, Krug M, Development of long-lasting potentiation effects in the dentate gyrus during pentylenetetrazol kindling. *Int J Dev Neurosci* 19 (2001) 247-254.
- [34] Thalmann RH, Ayala GF, A late increase in potassium conductance follows synaptic stimulation of granule neurons of the dentate gyrus. *Neurosci Lett* 29 (1982) 243-248.
- [35] Thompson SM, Gahwiler BH, Activity-dependent disinhibition. I. Repetitive stimulation reduces IPSP driving force and conductance in the hippocampus in vitro. *J Neurophysiol* 61(1989) 501-511.
- [36] Tuff LP, Racine RJ, Adamec R, The effects of kindling on GABA-mediated inhibition in the dentate gyrus of the rat. I. Paired-pulse depression. *Brain Res* 277 (1983) 79-90.
- [37] Velisek L, Veliskova J, Stanton PK, Low-frequency stimulation of the kindling focus delays basolateral amygdala kindling in immature rats. *Neurosci Lett* 326 (2002) 61-63.
- [38] Weiss SR, Eidsath A, Li XL, Heynen T, Post RM, Quenching revisited: low level direct current inhibits amygdala-kindled seizures. *Exp Neurol* 154 (1998) 185-192.
- [39] Weiss SR, Li XL, Rosen JB, Li H, Heynen T, Post RM, Quenching: inhibition of development and expression of amygdala kindled seizures with low frequency stimulation. *Neuroreport* 6 (1995) 2171-2176.
- [40] Yamamoto J, Ikeda A, Satow T, Takeshita K, Takayama M, Matsuhashi M, Matsumoto R, Ohara S, Mikuni N, Takahashi J, Miyamoto S, Taki W, Hashimoto N, Rothwell JC, Shibasaki H, Low-frequency electric cortical stimulation has an inhibitory effect on epileptic focus in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 43 (2002) 491-495.
- [41] Yang LX, Jin CL, Zhu-Ge ZB, Wang S, Wei EQ, Bruce IC, Chen Z, Unilateral low-frequency stimulation of central piriform cortex delays seizure development induced by amygdaloid kindling in rats. *Neuroscience* 138 (2006) 1089-96.
- behavioral seizures, augments afterdischarges, but does not block development of perforant path kindling. *Epilepsy Res* 17 (1994) 145-156.
- [19] Gilbert ME, Perforant path kindling, NMDA antagonism, and late paired pulse depression. In: Corcoran M, Moshe S editors. *Kindling 5*. New York: Plenum Press, 1998, p. 421-433.
- [20] Gilbert ME, Potentiation of inhibition with perforant path kindling: an NMDA-receptor dependent process. *Brain Res* 564 (1991) 109-116.
- [21] Hess G, Donoghue JP, Long-term depression of horizontal connections in rat motor cortex. *Eur J Neurosci* 8 (1996) 658-665.
- [22] Kirkwood A, Dudek SM, Gold JT, Aizenman CD, Bear MF, Common forms of synaptic plasticity in the hippocampus and neocortex in vitro. *Science* 260 (1993) 1518-1521.
- [23] Kulla A, Reymann KG, Manahan-Vaughan D, Time-dependent induction of depotentiation in the dentate gyrus of freely moving rats: involvement of group 2 metabotropic glutamate receptors. *Eur J Neurosci* 11 (1999) 3864-3872.
- [24] Lopez-Meraz ML, Neri-Bazan L, Rocha L, Low frequency stimulation modifies receptor binding in rat brain. *Epilepsy Res* 59 (2004) 95-105.
- [25] Maru E, Goddard GV, Alteration in dentate neuronal activities associated with perforant path kindling. I. Long-term potentiation of excitatory synaptic transmission. *Exp Neurol* 96 (1987) 19-32.
- [26] Maru E, Kanda M, Ashida H, Functional and morphological changes in the hippocampal neuronal circuits associated with epileptic seizures. *Epilepsia* 43 (Suppl 9) (2002) 44-49.
- [27] McCarren M, Alger BE, Use-dependent depression of IPSPs in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J Neurophysiol* 53 (1985) 557-571.
- [28] McNamara JO, Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 399 (1999) A15-22.
- [29] Morimoto K, Fahnstock M, Racine RJ, Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* 73 (2004) 1-60.
- [30] Paxinos G, Watson C, editors. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press, 1986.
- [31] Racine RJ, Modification of seizure activity by electrical