مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۸، فروردین ۱۳۹۸، ۵۴-۴۳

اثر والپروات سدیم و تحریک الکتریکی با فرکانس کم بر فعالیت حرکتی در روند کیندلینگ سریع ناحیه CA1 هیپوکمپ در موش صحرایی بالغ نر: یک مطالعه تجربی

رها زال‌خانی[۱]، احمدعلی معاضدی[۲]، زهره قطب‌الدین[۳]، مهدی پورمهدی بروجنی[۴]

دریافت مقاله: ۹۷/۴/۲۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۷/۲۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۹/۲۴ پذیرش مقاله: ۹۷/۹/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: صرع یک اختلال عصبی مزمن است که نیاز به روش‌های درمانی طولانی با عوارض جانبی کمتر دارد. بنابراین این مطالعه با هدف تعیین اثر داروی والپروات سدیم و تحریک الکتریکی مغز با فرکانس کم (LFS)، بر فعالیت حرکتی موش صحرایی نر در روند کیندلینگ سریع هیپوکامپ انجام شد.

مواد و روش: در این مطالعه تجربی، ۵۶ سر موش صحرایی نر بالغ به طور تصادفی به ۸ گروه تقسیم شدند: کنترل، شم، گروه‌های سالین-کیندل و دارو-کیندل که سالین یا دارو را ۱۵ دقیقه قبل از تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند و گروه‌های سالین-کیندل-LFS یا دارو-کیندل-LFS که سالین یا دارو را ۱۵ دقیقه قبل از کیندلینگ و LFS را بلافاصله پس از پایان تحریکات کیندلینگ دریافت کردند. سپس فعالیت حرکتی حیوانات با استفاده از آزمون میدان باز در روز ششم ارزیابی شد و داده‌ها توسط آنالیز آماری واریانس یک‌طرفه و پس آزمون Tukey تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج: نتایج آزمون میدان باز افزایش معنی‌داری در تعداد حرکات گروه کیندل ($p=۰/۰۰۷$) در مقایسه با گروه شم (شاهد جراحی) نشان داد. اما فعالیت حرکتی در گروه سالین_ کیندل_LFS ، دارو-کیندل و دارو-کیندل-LFS در مقایسه با گروه شم اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد که تزریق والپروات سدیم و اعمال تحریک الکتریکی به ناحیه هیپوکمپ، بتواند بیش فعالی ناشی از تحریکات کیندلینگ را در موش صحرایی نر بالغ کاهش دهد.

واژه های کلیدی: والپروات سدیم، تحریک الکتریکی با فرکانس کم، میدان باز، کیندلینگ، موش صحرایی

۱- دانشجوی دکترای فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز
۲- استاد فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۳- (نویسنده مسئول) استادیار فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
تلفن: ۳۳۳۳۰۰۱۵-۰۶۱، دورنگار: ۳۳۳۶۰۸۰۷-۰۶۱، پست الکترونیکی: ghotbeddiny2010@gmail.com
۴- دانشیار اپیدمیولوژی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران

مقدمه

تشنج به تخلیه ریتمیک و همزمان جمعی از نورون‌ها گفته می‌شود و چنان‌چه این تشنج‌ها تکراری شوند، بیماری صرع نامیده می‌شود. صرع از اختلالات رایج سیستم عصبی با میزان شیوع ۲-۱ درصد در جهان می‌باشد [۱]. نتایج متفاوتی از اثر صرع بر فعالیت حرکتی در مدل‌های حیوانی گزارش شده است و روند صرع‌زایی را با کاهش یا افزایش فعالیت حرکتی نشان داده‌اند [۲-۵]. کیندلینگ یک مدل آزمایشگاهی بررسی روند صرع‌زایی و ایجاد صرع لوب گیجگاهی است و به پدیده‌ای اشاره می‌کند که طی آن اعمال مکرر محرک الکتریکی یا شیمیایی با شدت زیرآستانه‌ای، باعث ایجاد فعالیت تشنجی شده و در نهایت منجر به بروز تشنج عمومی می‌شود [۶]. هیپوکمپ یکی از حساس‌ترین نواحی سیستم لیمبیک برای ایجاد کیندلینگ می‌باشد. کیندلینگ با ایجاد تغییراتی در شکل و عملکرد نورون‌ها مانند جوانه‌زنی نابجای فیبرهای هیپوکمپ، باعث کاهش آستانه تشنج‌ها و تقویت مدارهای تحریک‌پذیری نورون‌ها می‌شود. کیندلینگ آهسته هیپوکمپ به صورت یک تحریک در روز، ۴ هفته طول می‌کشد اما کیندلینگ سریع هیپوکمپ با محرک‌هایی با فاصله زمانی‌کم‌تر (۱۲ تحریک در روز)، سبب دست‌یابی سریع‌تر (یک هفته) به یک مدل قوی جهت ارزیابی فرآیند صرع‌زایی و اختلالات رفتاری می‌شود.

اختلالات رفتاری ایجاد شده در روند صرع‌زایی می‌تواند ناشی از به هم خوردن تعادل سیستم‌های نوروترانسمیتری و نورومدولاتوری باشد. دوپامین یکی از نوروترانسمیترهای مهم سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد که از پایانه نورون‌های دوپامینرژیک آزاد می‌شود و در حرکت نقش دارد. بیشتر انواع صرع لوب گیجگاهی مانند صرع ایجاد شده با پیلوکارپین همراه با افزایش تخلیه نورون‌های دوپامین‌رژیک و افزایش میزان دوپامین می‌باشند [۱]. علاوه بر تأثیر تشنج‌ها بر میزان دوپامین و فعالیت حرکتی، روش‌های درمانی مورد استفاده در این بیماران نیز می‌تواند این سیستم ها را تحت تأثیر قرار دهد [۷]. صرع لوب گیجگاهی یکی از شایع‌ترین صرع‌ها در بالغین است و علیرغم کشف داروهای جدید ضدصرع، ۳۰٪ بیماران مقاوم به دارو هستند و علاوه بر دارو نیاز به درمان‌های دیگر از قبیل جراحی و تحریک عمقی مغز دارند [۶]. دارو درمانی رایج‌ترین روش درمانی بیماران صرعی می‌باشد که در بیش از ۷۰ درصد بیماران صرعی، مؤثر است. یکی از پرمصرف‌ترین داروهای ضدصرعی در جهان والپروات (۲-پروپیل پنتانوئیک) می‌باشد. این دارو عملکرد فارماکولوژی خود را از طریق مکانیسم‌های مختلفی از قبیل تقویت سیستم گابا، کاهش فعالیت تحریکی القاء شده توسط گیرنده‌های گلوتامات، مهار کانال‌های سدیم دریچه‌دار ولتاژی، کنترل سیستم دپامین-رژیک اعمال می‌کند [۹-۷]. یکی از روش‌های درمانی دیگر صرع ، تحریک عمقی مغز با فرکانس‌های مختلف است که علاوه بر صرع در درمان بیماری‌های دیگر از جمله بیماری‌های حرکتی، روانی، درد مزمن به‌کار می‌رود [۱۰]. تحریک الکتریکی جایگاه‌های مختلف مغز با کاهش تحریک پذیری نورون‌های شبکه صرعی، اثر مهاری بر تشنج اعمال می‌کند و منجر به افزایش سطح گابا و کاهش دوپامین می‌شود [۱۱-۶].

از آنجایی‌که ترکیب تحریک الکتریکی مغز با مقادیرکم داروهای تقویت‌کننده‌ی سیستم گابا، سبب اثرات ضد تشنجی مؤثرتری در صرع مقاوم به درمان می‌شود [۱۳-۱۲،۷] و نیز به دلیل تأثیر تشنج بر سیستم حرکتی، مطالعه حاضر جهت تعیین اثر جداگانه و ترکیبی والپروات سدیم و تحریک الکتریکی با فرکانس کم بر فعالیت حرکتی در مدل صرع لوب گیجگاهی القاء شده توسط کیندلینگ سریع هیپوکمپ در موش صحرایی نر بالغ انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ۵۶ سر موش صحرایی نر بالغ ویستار با وزن تقریبی ۲۰±۲۰۰ گرم، تهیه شده از خانه حیوانات دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز، استفاده شد. تمام مراحل آزمایش بر اساس دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه شهید چمران اهواز به شماره EE/97.3.24.49755/scu.ac.ir طراحی و اجرا شد. حیوانات در دمای ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰-۴۰ درصد و در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند.

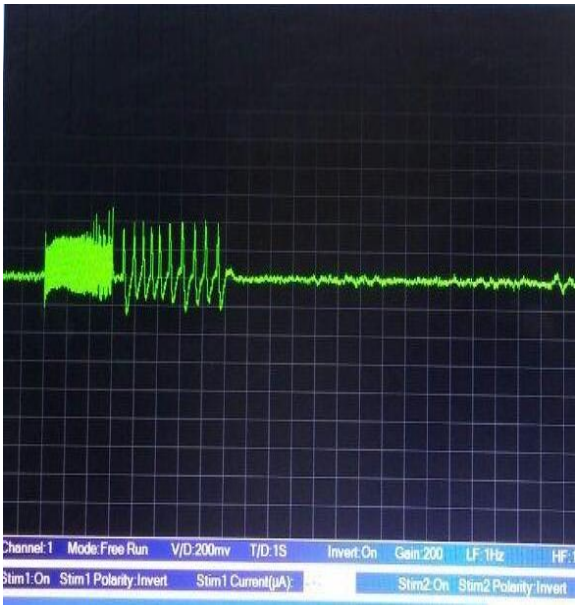
حیوانات، به طور تصادفی به ۸ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. گروه‌های مورد مطالعه شامل: کنترل، شم، گروه های سالین-کیندل و دارو-کیندل که سالین یا دارو را ۱۵ دقیقه قبل از دریافت تحریکات کیندلینگ به طور روزانه دریافت می‌کردند، گروه‌های سالین-کیندل-تحریک الکتریکی با فرکانس کم و دارو-کیندل-تحریک الکتریکی با فرکانس کم که سالین یا دارو را ۱۵ دقیقه قبل و LFS را بلافاصله پس از پایان از دریافت تحریکات کیندلینگ دریافت کردند. کلیه آزمایش‌ها در زمان روشنایی، بین ساعت ۸ صبح الی ۴ بعد از ظهر در گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفت. جهت خو گرفتن حیوانات به محل، یک ساعت قبل از شروع آزمون به آزمایشگاه منتقل شدند [۱۴].

برای بی‌هوشی حیوان،کتامین و زایلازین به ترتیب به مقدار ۱۰۰ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی تزریق شد. سپس سر حیوان در دستگاه استریوتاکس (Stoelting Co., USA) ثابت گردید. پس از ایجاد برش در پوست سر، ناحیه برگما شناسایی شده و براساس مختصات ذکر شده در اطلس پاکسینوس ناحیه مربوط به CA1 هیپوکمپ (۲/۵ میلی‌متر به سمت عقب و ۱/۸ میلی‌متر به سمت راست نسبت به برگما و ۲/۸ میلی‌متر زیر جمجمه) علامت‌گذاری شد [۱۳].

با استفاده از مته دندان‌پزشکی در محل علامت‌گذاری شده بر روی جمجمه، منفذی ایجاد گردید. سپس یک الکترود سه قطبی جهت تحریک و ثبت، درون ناحیه CA1 هیپوکمپ کار گذاشته شد. یک الکترود مسی هم به عنوان اتصال به زمین، با استفاده از پیچ لحیم شده به آن بر روی جمجمه متصل شد. دو پیچ کوچک دیگر جهت استحکام سیمان روی نقاط دیگری از جمجمه وصل‌گردید. مجموعه الکترودها و پیچ‌ها توسط سیمان دندان‌پزشکی روی سطح جمجمه ثابت شدند. آن‌گاه پین‌های متصل به الکترودهای سه قطبی و تک قطبی درون بخش مادگی سوکت مخصوص قرار داده شد. سپس سوکت با استفاده از سیمان دندان‌پزشکی بر روی جمجمه محکم گردید [۱۴].

بعد از دوره بهبودی ۷ روزه، با استفاده از دستگاه الکتروماجول (Electromodule)، حداقل شدت تحریک

حیوان محاسبه گردید. به این ترتیب که به حیوان، جریانی به شدت ۳۰ میکروآمپر اعمال می‌شد. اگر امواج تخلیه متعاقب (حداقل به مدت ۸ ثانیه) ثبت شدند، این شدت جریان به عنوان شدت جریان آستانه شناخته می‌شد. در صورت عدم مشاهده‌ی امواج تخلیه متعاقب، هر بار شدت جریان ۱۰ میکروآمپر به فواصل ۵ دقیقه افزایش داده شد تا وقتی‌که امواج تخلیه متعاقب ثبت گردد. (شکل ۱) [۱۴].



شکل ۱- ثبت امواج مغزی توسط دستگاه الکتروماجول. مرحله آستانه‌گیری و ثبت امواج تخلیه متعاقب.

یک روز بعد از آستانه‌گیری، حیوان با روش کیندلینگ سریع، با موج مربعی تک فازی به مدت ۱ میلی ثانیه، فرکانس ۵۰ هرتز، شدت آستانه تولید امواج تخلیه متعاقب، به مدت ۳ ثانیه و ۱۲ بار در روز، به فاصله‌ی ۱۰ دقیقه‌ای و به مدت ۵ روز تحریک شدند و بیش از سه مرتبه مرحله ۴ و ۵ تشنج را نشان دادند. در زمان اعمال تحریکات کیندلینگ، امواج الکتریکی مغزی توسط الکترود ثبات به دستگاه الکتروماجول منتقل و توسط برنامه کامپیوتری eprobe اندازه‌گیری شدند (Sciencebeam Co., Tehran, Iran). این دستگاه جهت ثبت پتاسیل عمل، پتانسیل میدانی، الکتروانسفالوگرام و اعمال تحریک الکتریکی به مغز به کار می‌رود [۱۴].

شدت تشنج بر اساس معیارهای Racine به این ترتیب محاسبه گردید: مرحله۱: انقباض عضلات صورت، مرحله۲: حرکت دادن سر به طرف بالا و پایین ، مرحله ۳: کلونوس یکی از اندام‌های جلویی، مرحله ۴: ایستادن روی هر دو پا توأم با کلونوس هر دو اندام جلویی، مرحله ۵: ایستادن روی هر دو پا همراه با از دست دادن تعادل و افتادن [۱۶].

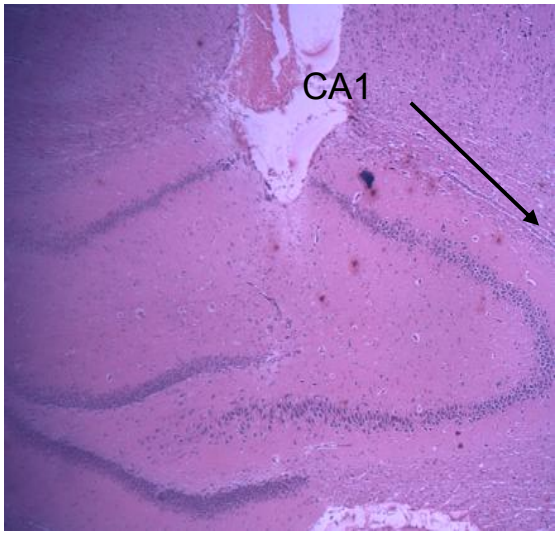
برای انجام این تحقیق والپروات سدیم (شرکت سیگما)، با مقادیر ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در سرم فیزیولوژی حل شد و نیم ساعت قبل از اعمال تحریکات کیندلینگ، به صورت تزریق درون صفاقی و یک‌بار در روز به‌کار برده شد [۱۷]. LFS هم به صورت چهار بسته در فواصل هر ۵ دقیقه یک‌بار به حیوان اعمال می‌شد. هر بسته شامل ۲۰۰ موج مربعی دو فازی که هر پالس ۰/۱ میلی‌ثانیه با فرکانس ۱ هرتز بود [۱۴]. در تمامی گروه‌ها، شش روز پس از آغاز تحریکات برای سنجش فعالیت حرکتی از آزمون میدان باز استفاده شد.

ارزیابی فعالیت حرکتی حیوان در روز ششم با استفاده از جعبه میدان باز با کف سفید و دیواره‌های پلکسی گلاس به ابعاد ۵۰×۵۰×۵۰ سانتی‌متر و لوکوموشن (Locomotion) انجام شد (ایران، برج صنعت، LO ۵۸۰۰). ماهیت این تست، اندازه‌گیری فعالیت حرکتی حیوان بر اساس تغییر از موقعیت قبلی خود به موقعیتی جدید در داخل دستگاه

است، که این حرکات توسط چشم‌های الکتریکی تعبیه شده در کناره‌های کف دستگاه اندازه‌گیری می‌شد. بعد از تنظیم دستگاه و قرار دادن حیوان در مرکز آن، تعداد عبور از مقابل لکه‌های چشمی، به مدت پنج دقیقه با استفاده از دستگاه لوکوموشن ثبت می‌شد. پارامتر دیگر مرتبط با سنجش فعالیت حرکتی، تعداد دفعاتی است که موش روی دو پای خود به صورت عمودی قرار می‌گیرد (Rearing) می‌باشد که به صورت دستی ثبت شد [۱۸].

پس از آزمون رفتاری جهت ارزیابی صحت ورود الکترودها، مغز موش جدا و در فرمالدهید ۱۰ درصد نگهداری شد. بعد از ۴۸ ساعت مغزها را برش داده و با مختصات CA1 در اطلس پاکسینوس مقایسه شدند. در صورت مطابقت نداشتن محل الکترود با اطلس، داده‌های حاصل از موش مورد نظر حذف گردیدند (شکل۲) [۱۴].

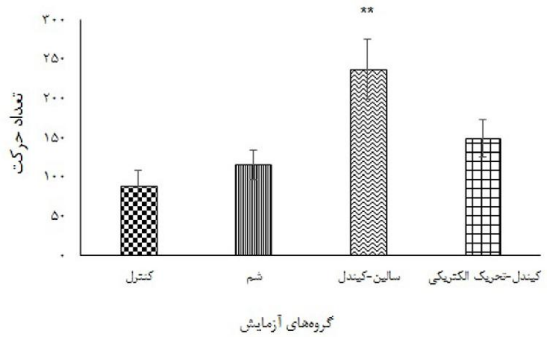
برای آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد. با توجه به اینکه داده‌ها به صورت کمی بود، توسط آزمون Shapiro-Wilk فرض نرمال بودن داده‌ها تأیید گردید (p>۰/۰۵) و برای مقایسه اختلاف بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس آزمون Tukey استفاده شد. نتایج به صورت خطای معیار± میانگین گزارش شد. در تمامی موارد p<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد.



شکل ۲- تأیید بافتی مسیر ورود الکترود به ناحیه CA1 هیپوکمپ در موش صحرایی نر بالغ

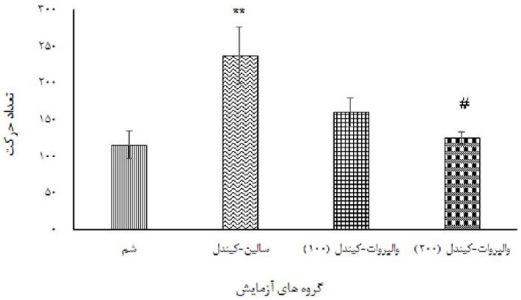
نتایج

آنالیز آماری یافته‌ها، تفاوت معنی‌داری در تعداد حرکات و فرکانس روی دو پا ایستادن در آزمون میدان باز بین گروه‌های شم و کنترل نشان نداد. لذا سایر گروه‌ها با گروه شم مقایسه شدند (نمودار ۱) (جدول ۱). تعداد حرکات در گروه دریافت‌کننده سالین قبل از تحریکات کیندلینگ، در مقایسه با گروه شم افزایش معنی‌داری داشت (p=۰/۰۰۷)، که بیان‌گر این است که کیندلینگ سبب بیش‌حرکتی می‌شود. از طرفی تعداد حرکات در گروه دریافت‌کننده تحریکات کیندل همراه با تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین در مقایسه با گروه شم تفاوت معنی‌داری نداشت که نشان‌دهنده کاهش بیش فعالی القاء شده در کیندلینگ است. هم‌چنین تعداد حرکات در این گروه در مقایسه با گروه سالین-کیندل کاهش یافت که این کاهش معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵).



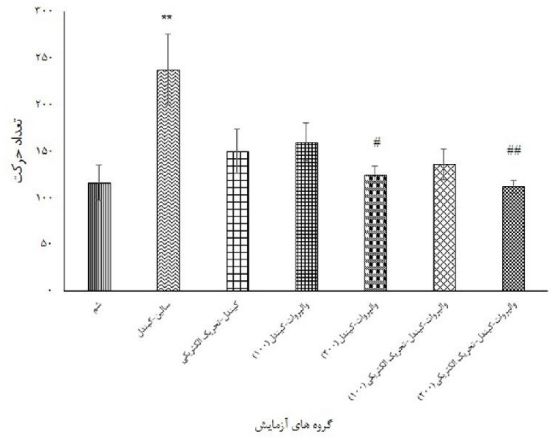
نمودار ۱- اثر تحریکات کیندلینگ و تحریک الکتریکی با فرکانس کم هیپوکمپ بر فعالیت حرکتی در آزمون میدان باز در موش صحرایی نر بالغ: مقایسه خطای معیار± میانگین تعداد حرکات در گروه‌های مورد مطالعه. آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی Tukey، ** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار گروه‌ها با گروه شم (p<۰/۰۱).

آنالیز آماری یافته‌ها بین تعداد حرکات در گروه‌های کیندلینگ دریافت‌کننده والپروات سدیم با مقادیر ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه شم اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (p>۰/۰۵) که بیان‌گر کاهش بیش فعالی القاء شده در روند کیندلینگ توسط والپروات سدیم است. هم‌چنین تعداد حرکات در گروه کیندلینگ دریافت کننده والپروات سدیم با مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم برخلاف مقدار ۱۰۰ با گروه سالین-کیندل اختلاف معنی‌داری داشت (p=۰/۰۱۸) (نمودار۲).



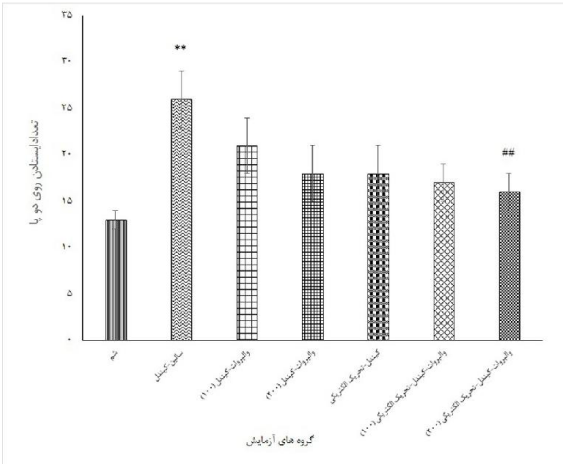
نمودار ۲- اثر تزریق والپروات سدیم قبل ازتحریکات کیندلینگ هیپوکمپ بر فعالیت حرکتی در آزمون میدان باز: مقایسه خطای معیار± میانگین تعداد حرکات گروه سالین-کیندل نسبت به گروه شم (p<۰/۰۱**) و گروه والپروات-کیندل نسبت به گروه سالین-کیندل (p<۰/۰۵ #)، آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی Tukey.

آنالیز آماری یافته‌ها بین تعداد حرکات در گروه‌های کیندلینگ دریافت‌کننده توأم والپروات سدیم (۱۰۰ یا ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و تحریکات الکتریکی با فرکانس کم در مقایسه با گروه شم تغییر معنی‌داری نشان نداد اما تعداد حرکات در گروه کیندلینگ دریافت کننده توأم والپروات سدیم با مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم برخلاف مقدار ۱۰۰ با گروه سالین-کیندل اختلاف معنی‌داری داشت (p=۰/۰۰۹). هم‌چنین تعداد حرکت در این گروه‌ها در مقایسه با گروه دریافت‌کننده دارو قبل از تحریکات کیندلینگ معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵) (نمودار۳).



نمودار ۳- اثر کاربرد توأم والپروات سدیم و اعمال تحریکات الکتریکی با فرکانس کم به ترتیب قبل و بعد از کیندلینگ هیپوکمپ بر فعالیت حرکتی در آزمون میدان باز: مقایسه خطای معیار± میانگین تعداد حرکات گروه‌های مورد مطالعه نسبت به گروه شم (p<۰/۰۱**) و نسبت به گروه سالین-کیندل (p<۰/۰۵ # و p<۰/۰۱ ##). آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی Tukey.

آنالیز آماری یافته‌ها نشان داد که بین فرکانس روی دو پا ایستادن گروه کیندل در مقایسه با گروه شم افزایش معنی‌داری وجود دارد (p=۰/۰۰۶) اما این پارامتر درگروه دریافت‌کننده تحریکات کیندلینگ و تحریکات الکتریکی با فرکانس کم، گروه دریافت‌کننده دارو قبل از تحریکات کیندلینگ و گروه‌های دریافت کننده توأم دو روش درمانی در مقایسه با گروه شم تفاوت معنی‌داری نداشت که بیان‌گر کاهش بیش حرکتی القاء شده توسط کیندلینگ با روش‌های درمانی ضدتشنجی بکار رفته است.



نمودار ۴- اثر تحریکات کیندلینگ، تحریکات الکتریکی با فرکانس کم، والپروات سدیم و کاربرد توأم دو روش بر تعداد روی دو پا ایستادن موش صحرایی در آزمون میدان باز: مقایسه خطای معیار± میانگین تعداد روی دو پا ایستادن. ** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار گروه‌های مورد مطالعه نسبت به گروه شم (p<۰/۰۱) و ## نسبت به گروه سالین-کیندل (p<۰/۰۱). آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی Tukey،

جدول۱- اثر کاربرد جداگانه و توأم والپروات سدیم و تحریکات الکتریکی با فرکانس‌کم به ترتیب قبل و بعد از کیندلینگ هیپوکمپ در موش صحرایی در آزمون میدان باز: مقایسه خطای معیار± میانگین متغیرهای تعداد حرکات و روی دو پا ایستادن در گروه‌های مورد مطالعه. $^{**}p<۰/۰۱$ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در گروه سالین-کیندل نسبت به گروه شم و $^{\#\#}p<۰/۰۱$ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در گروه والپروات-کیندل-تحریک الکتریکی (۲۰۰) نسبت به گروه سالین-کیندل. آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Tukey.

گروه‌های آزمایش / متغیرها	تعداد روی دو پا ایستادن در ۵ دقیقه خطای معیار ± میانگین	تعداد حرکات در ۵ دقیقه خطای معیار ± میانگین
کنترل	۱۴/۱ ± ۰/۵۱	۸۸/۸ ± ۱۸/۷۲
شم	۱۲/۸۷ ± ۰/۹۳	۱۱۵/۱۹ ± ۵۷/۱۰
سالین-کیندل	** ۲۶/۱۴ ± ۳/۰۱	** ۲۳۸/۳۸ ± ۱۰/۴۵
کیندل-تحریک الکتریکی	۱۸/۱۲ ± ۲/۵۳	۱۵۰/۲۴ ± ۵۰/۰۳
والپروات-کیندل (۱۰۰)	۲۱/۴۲ ± ۳/۱۴	۱۶۰/۲۸ ± ۱۹/۸۵
والپروات-کیندل (۲۰۰)	۱۸/۱۴ ± ۲/۵۳	۱۲۴/۷۱ ± ۹/۴۶
والپروات-کیندل-تحریک الکتریکی(۱۰۰)	۱۷/۲۸ ± ۱/۷۹	۱۳۵/۶۶ ± ۱۶/۳۷
والپروات-کیندل-تحریک الکتریکی(۲۰۰)	## ۱۶/۸۲ ± ۱/۶۸	۱۱۱/۶۶ ± ۷/۰۲

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تحریک کیندلینگ هیپوکمپ سبب افزایش معنی‌دار فعالیت حرکتی (تعداد حرکات و فرکانس روی دو پا ایستادن) در آزمون میدان باز می‌شود. مطابق با این نتایج، Caldecott-Hazard و همکاران نشان دادند که کیندلینگ دو طرفه آمیگدال باعث افزایش فعالیت حرکتی چشم‌گیری نسبت به گروه کنترل در ۱۴ تا ۲۸ روز بعد از آخرین تحریک کیندل می‌شود [۱۹]. هم‌چنین Hidaka و همکاران گزارش دادند که اعمال شوک الکتریکی تشنج‌زا به مدت ۷ روز سبب بیش حرکتی می‌شود که این تغییرات تا ۲۸ روز پس از آخرین تحریک پایدار می‌مانند [۲۰]. در انواع دیگر صرع مانند صرع شیمیایی ایجاد شده توسط کاینیک اسید [۲۱] و صرع ژنتیکی

موش‌های صحرایی نیز میزان فعالیت حرکتی در آزمون میدان باز افزایش می‌یابد [۲]. هم‌چنین منطبق با نتایج این مطالعه، موش‌های صحرایی که تحریکات کیندل را در ناحیه هیپوکمپ پشتی به صورت دو بار در روز تا زمان وقوع پیاپی مرحله پنج تشنج، دریافت کرده بودند، فرکانس روی دو پا ایستادن بیش‌تری، درروز هفتم بعد از آخرین تحریک، در آزمون میدان باز نسبت به گروه کنترل داشتند [۱۴، ۴].

برخلاف گزارش حاضر Kalynchuk و همکاران گزارش دادند که کیندلینگ آمیگدال و هیپوکمپ با ۹۹ تحریک (سه تحریک ۱ ثانیه ای در روز با شدت ۴۰۰ میکروآمپر و فرکانس ۶۰ هرتز به مدت ۳۳ روز) باعث کاهش فعالیت حرکتی در آزمون جعبه باز می شود. این اختلاف گزارشات در کاهش یا افزایش فعالیت حرکتی ممکن است ناشی از تفاوت در شدت و تعداد تحریک و مدل کیندلینگ به‌کاربرده شده باشد [۵]. بیش فعالی می تواند ناشی از تغییرات ریختی و عملی مغز [۲۲] مانند جوانه زدن فیبرهای خزه‌ای و یا کاهش تعداد نورون ها در روند صرع‌زایی باشد [۲۴-۲۳].

هم‌چنین مطالعه حاضر نشان داد که تعداد حرکات و فرکانس روی دو پا ایستادن در گروه دریافت کننده تحریکات کیندل همراه با تحریکات با فرکانس پایین در مقایسه با گروه شم تفاوت معنی‌داری نداشت که نشان دهنده کاهش بیش فعالی القاء شده در روند کیندلینگ است. مطالعات زیادی اثر تحریک الکتریکی عمقی مغز با فرکانس کم و زیاد را در درمان بیماری‌های حرکتی گزارش داده اند و نتایج متفاوتی را گزارش داده اند. علت تأثیر و عدم تاثیر تحریکات الکتریکی بر فعالیت حرکتی ناشی از اختلاف در الگو و مدت زمان اعمال تحریک الکتریکی یا مدل بیماری استفاده شده باشد. تحریکات الکتریکی با فرکانس‌های متفاوت، باعث تعدیل فعالیت نورون‌های جایگاه تحریک و شبکه‌های عصبی مرتبط با می‌شود [۲۸-۲۵].

نتایج بخش سوم مطالعه نشان داد که گروه کیندل دریافت کننده والپروات از نظر تعداد حرکات و فرکانس روی دو پا ایستادن در جعبه میدان باز در مقایسه با گروه شم تفاوت معنی‌داری نداشت که نشان‌دهنده این است که والپروات بیش حرکتی القاء شده توسط تحریکات کیندلینگ را کاهش داده است.

مطابق با این نتیجه، Xing و همکاران گزارش داده اند که تزریق ۷ روزه والپروات با دوز ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در موش صحرایی سبب کاهش بیش حرکتی القاء شده توسط مت آمفتامین از طریق افزایش فعالیت آنزیم گلیکوژن سنتاز کیناز می شود [۲۸]. هم‌چنین Eckermann و همکاران نیز گزارش دادند که تزریق درون صفاقی والپروات در مقادیر ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از بیش تحریکی القاء شده توسط متیل فنیدات که محرک سیستم دوپامینی می باشد جلوگیری می کند [۲۹].

محرک‌های سیستم دوپامینی باعث افزایش فعالیت حرکتی می شوند و برعکس، بلوکه شدن رهایش دوپامین سبب کاهش فعالیت حرکتی می‌شود [۳۱]. آگونیست‌های گابا از طریق هیپرپولاریزه کردن سلول‌های دوپامینرژیک، مانع بیش فعالی القاء شده ناشی از افزایش دوپامین می‌شوند. والپروات، داروی افزایش دهنده سطح گابا، با اثر بر نورون‌های دوپامینرژیک، بر بیش فعالی القاء شده توسط دوپامین اثر مهاری دارد [۳۱-۳۰].

علاوه بر این نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعداد حرکات در گروه‌های دریافت کننده توأم والپروات سدیم و تحریکات الکتریکی با فرکانس کم در مقایسه با گروه‌های شم و دارو-کیندل تفاوت معنی‌داری نداشت. این موضوع بر این دلالت دارد که کاربرد هم‌زمان این دو روش درمانی کنترل تشنج، علاوه بر اینکه تغییر چشم‌گیری در فعالیت حرکتی نسبت به گروه شم ایجاد نمی کند، بیش فعالی القاء شده توسط تحریکات کیندلینگ را کاهش می‌دهد. مطالعات محدودی درباره اثر ترکیبی داروهای ضد صرعی و LFS در کنترل تشنج وجود دارد. به نظر می‌رسد، داروهایی که بر سیستم گابا اثر می‌گذارند، باعث تقویت عملکرد ضد تشنجی تحریکات الکتریکی مغز می‌گردند [۱۳-۱۲]. گزارش حاضر نشان داد که کاربرد توأم این دو روش درمانی هم‌چنین باعث کاهش بیش فعالی القاء شده توسط تحریکات کیندلینگ می‌شود. با توجه به ضرورت کنترل تشنج و اختلالات رفتاری در صرع‌های مقاوم به درمان، علیرغم هزینه بر و زمان بر بودن ایجاد مدل مزمن صرع با روش کیندلینگ الکتریکی و احتمال کنده شدن الکترودها قبل از انجام آزمایشات رفتاری، پیشنهاد می‌شود که اثر دیگر داروهای ضدصرعی با الگوهای متنوع تحریکات الکتریکی با فرکانس کم مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که تزریق والپروات سدیم و اعمال تحریک الکتریکی به ناحیه هیپوکمپ، بتواند بیش فعالی ناشی از تحریکات کیندلینگ را در موش صحرایی نر بالغ کاهش دهد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و همکاران آزمایشگاهی به خاطر همکاری در انجام این پژوهش علمی‌کمال‌تشکر و قدردانی به عمل می‌آید

References

[1] Mc Namara JO: Cellular and molecular basis of epilepsy, *J Neurosci* 1994; 14, 3413-25.

[2] Okaichi Y, Amano S, Ihara N, Hayase Y, Tazumi T, Okaichi H. Open□field Behaviors and Water□maze Learning in Substrain of Ihara Epileptic Rats. *Epilepsia* 2006;47(1):55-63.

[3] Koneski J, Casella E. Attention deficit and hyperactivity disorder in people with epilepsy: Diagnosis and implications to the treatment. *Arq Neuropsiquiatr* 2010; 68(1): 107-114.

[4] Hannesson DK, Howland J, Pollock M, Mohapel P, Wallace AE, Corcoran ME. Dorsal hippocampal kindling produces a selective and enduring disruption of hippocampally mediated behavior. *J Neurosci* 2001;21(12):4443-50.

[5] Kalynchuk LE, Pinel JP, Treit D. Long-term kindling and interictal emotionality in rats: effect of stimulation site. Brain Res 1998;779(1-2):149-57.

[6] Wyckhuys T, De Smedt T, Claeys P, Raedt R, Waterschoot L, Vonck K. et al. High frequency deep brain stimulation in the hippocampus modifies seizure characteristics in kindled rats. *Epilepsia* 2007; 48(8): 1543-50.

[7] Zádori D, Geisz A, Vámos E, Vécsei L, Klivényi P. Valproate ameliorates the survival and the motor performance in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Pharmacol Biochem Behav* 2009; 94(1): 148-53.

[8] Tai YT, Lee WY, Lee FP, Lin TJ, Shih CL, Wang JY. et al. Low dose of valproate improves motor function after traumatic brain injury. *Biomed Res Int* 2014; 2014 :980657.

[9] Kuruvilla A, Uretsky NJ. Effect of sodium valproate on motor function regulated by the activation of GABA receptors. *Psychopharmacology* 1981; 72(2): 167-72.

[10] Saberi M, Saberi F. The psychological effects of minimal electrical stimulations of the amygdala in male rats. *Procedia Soc Behav Sci* 2010; 5: 304-8.

[11] Yan N, Chen N, Zhu H, Zhang J, Sim M, Ma Y. et al. High-frequency stimulation of nucleus accumbens changes in dopaminergic reward circuit. *PloS one* 2013; 8(11): 79318.

[12] Asgari A, Semnanian S,Atapour N, Shojaei A, Mirnajafi-zadeh J. Combined sub-threshold dosages of phenobarbital and low frequency stimulation effectively reduce seizures in amygdala-kindled rats. *Neurol Sci* 2014; 35(8): 1255-60.

[13] Cuellar-Herrera M, Pena F, Alcantara-Gonzalez D, Neri-Bazan L, Rocha L. Antiepileptic drugs combined with high-frequency electrical stimulation in the ventral hippocampus modify pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsia* 2010; 51(3): 432-37.

[14] Zalkhani R, Moazedi A, Ghotbeddin Z, Pourmahdi Borujeni M. Evaluation the efficacy of sodium valproate and low frequency stimulation during CA1 hippocampal kindling on anxiety like behavior in adult male rat. *J Arak Uni Med Sci* 2018; 21(4): 6-17.

[15] Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates in Stereotaxic Coordinates. 6th ed, San Diego, CA:Academic Press. 2007.

[16] Racine R, Rose PA, Burnham WM. Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. *Can J Neurol Sci* 1977; 4(4): 273-8.

[17] Töllner K, Wolf S, Löscher W, Gernert M. The anticonvulsant response to valproate in kindled rats is correlated with its effect on neuronal firing in the substantia nigra pars reticulata: a new mechanism of pharmacoresistance. *J. Neurosci* 2011; 31(45): 16423-34.

[18] Zalkhani R, Moazedi AA, Ghotbeddin Z , Pourmahdi Borujeni M . Therapeutic effects of sodium valproate combined with low frequency electrical stimulations on seizure severity and behaviors during CA1

hippocampal kindling in adult male rat, *BCN* 2018 (In press).

[19] Caldecott-Hazard S. Interictal changes in behavior and cerebral metabolism in the rat: opioid involvement. *Exp. Neurol* 1988; 99(1): 73-83.

[20] Hidaka N, Suemaru K, Takechi K, Li B, Araki H. Inhibitory effects of valproate on impairment of Y-maze alternation behavior induced by repeated electroconvulsive seizures and c-Fos protein levels in rat brains. *Acta Med Okayama* 2011; 65(4): 269-77.

[21] Stafstrom CE, Chronopoulos A, Thurber S, Thompson JL, Holmes GL. Age□Dependent Cognitive and Behavioral Deficits After Kainic Acid Seizures. *Epilepsia* 1993; 34(3): 420-32.

[22] Hidaka N, Suemaru K, Li B, Araki H. Effects of repeated electroconvulsive seizures on spontaneous alternation behavior and locomotor activity in rats. *Biol.Pharm. Bull* 2008; 31(10): 1928-32.

[23] Sogawa Y, Monokoshi M, Silveira DC, Cha BH, Cilio MR, McCabe BK. et al. Timing of cognitive deficits following neonatal seizures: relationship to histological changes in the hippocampus. *Dev Brain Res* 2001; 131(1-2): 73-83.

[24] Mortazavi F, Ericson M, Story D, Hulce VD, Dunbar GL. Spatial learning deficits and emotional impairments in pentylenetetrazole-kindled rats. Epilepsy Behav 2005; 7(4): 629-38.

[25] Ghafouri S, Fathollahi Y, Javan M, Shojaei A, Asgari A, Mirnajafi-Zadeh J. Effect of low frequency stimulation on impaired spontaneous alternation behavior of kindled rats in Y-maze test. *Epilepsy Res* 2016; 126: 37-44.

[26] Di Biase L, Munhoz RP. Deep brain stimulation for the treatment of hyperkinetic movement disorders. Expert *Rev Neurother* 2016; 16(9): 1067-78.

[27] Edwards TC, Zrinzo L, Limousin P, Foltynie T. Deep brain stimulation in the treatment of chorea. Mov Disord 2012; 27(3): 357-63.

[28] Xing B, Liang XP, Liu P, Zhao Y, Chu Z, Dang YH. Valproate inhibits methamphetamine induced hyperactivity via glycogen synthase kinase 3β signaling in the nucleus accumbens core. *PLoS One* 2015;10(6): e0128068.

[29] Eckermann K, Beasley A, Yang P, Gaytan O, Swann A, Dafny N. Methylphenidate sensitization is modulated by valproate. *Life Sci* 2001; 69(1): 47-57.

[30] Beninger RJ. The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Res* 1983; 6(2): 173-96.

[31] Kuruvilla A, Uretsky NJ. Effect of sodium valproate on motor function regulated by the activation of GABA receptors. *Psychopharmacology* 1981; 72(2): 167-72.

The Effect of Sodium Valproate and Low Frequency Electrical Stimulation on Motor Activity During Rapid Kindling of Hippocampal CA1 Region in Adult Male Rat: An Experimental Study

R. Zalkhani[1], A. A. Moazedi[2], Z. Ghotbeddin[3], M. Pourmahdi Borujeni[4]

Received: 15/10/2018 Sent for Revision: 17/10/2018 Received Revised Manuscript: 15/12/2018 Accepted: 19/12/2018

Background and Objectives: Epilepsy is a chronic neurological disorder that requires long treatment with less side effects. Therefore, this study aimed to determine the effect of sodium valproate and electrical stimulation of the brain with low frequency (LFS) on the motor activity of male rat during hippocampus rapid kindling.

Material and Methods: In this experimental study, 56 male adult rats were randomly divided to 8 groups: control, sham operation, saline-kindled and drug-kindled groups which received saline or drug 15 minutes before kindling stimulations and saline-kindled-LFS or drug-kindled-LFS group which received saline or drug 15 minutes before kindling stimulations and LFS after termination of kindling stimulations. Then animals motor activity was assessed on the 6th day by open field test and data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post-test.

Results: The open field results showed a significant increase in the number of motions ($p = 0.007$) in the kindled group compared to the sham group. But these parameters showed no difference in saline-kindled-LFS group, drug-kindled and drug-kindled-LFS groups compared with the sham group ($p>0.05$).

Conclusion: It seems administration of sodium valproate and application of low-frequency electrical to hippocampus region can attenuate the kindling-induced hyperactivity in adult male rat.

Key words: Sodium valproate, Low frequency electrical stimulation, Open field, Kindling, Rat

Funding: This research was funded by Shahid Chamran University of Ahvaz.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethical Committee of Shahid Chamran University of Ahvaz approved the study (EE/97.3.24.49755/scu.ac.ir).

How to cite this article: Zalkhani R, Moazedi AA, Ghotbeddin Z, Pourmahdi Borujeni M. The Effect of Sodium Valproate and Low Frequency Electrical Stimulation on Motor Activity During Rapid Kindling of Hippocampal CA1 Region in Adult Male Rat: An Experimental Study**.** *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2019; 18 (1): 43-54. [Farsi]

1- PhD Student of Physiology, Dept. of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran ORCID: 0000-0003-2708-5254
(Corresponding Author) Tel: (061) 33330015, Fax: (061) 33360807, E-mail: ghotbeddiny2010@gmail.com
2 - Prof. of Physiology, Dept. of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran ORCID: 0000-0003-1346-2426
3 - Assistant Prof. of Physiology, Dept. of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, ORCID: 0000-0003-2110-6333
4 - Associate Prof. of Epidemiology, Dept. of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, ORCID: 0000-0002-9478-260X