**مقاله پژوهشی**
**مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان**
**دوره ۱۸، اسفند ۱۳۹۸، ۱۲۱۰-۱۱۹۷**

# افزایش اثربخشی کاربامازپین به‌کمک تحریک الکتریکی با فرکانس پایین در طی روند کیندلینگ ناحیه CA1 هیپوکامپ بر شاخص‌های تشنجی در موش‌های صحرایی نر بالغ: یک مطالعه تجربی

**رضا مقدسی[۱]، زهره قطب‌الدین[۲]، احمد علی معاضدی[۳]، محمدرضا آخوند[۴]**

**دریافت مقاله: ۹۸/۳/۲۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۸/۴/۱۶ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۸/۷/۲۸ پذیرش مقاله: ۹۸/۸/۱۲**

**چکیده**

**زمینه و هدف:** امروزه، کاربرد تحریک الکتریکی با فرکانس پایین به عنوان درمان جایگزین در بیماران صرعی مقاوم به دارو مورد توجه قرار گرفته است. هدف این مطالعه تعیین اثرات تجویز توأم تحریک الکتریکی با فرکانس پایین و کاربامازپین در طی صرع‌زایی هیپوکامپ پشتی با روش کیندلینگ الکتریکی بر شاخص‌های تشنجی در موش صحرایی بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، تعداد ۵۶ سر موش صحرایی نر به‌طور تصادفی به ۸ گروه مساوی تقسیم شدند که شامل:MCKLFS CBZ40KLFS، CBZ20KLFS، CBZ40K، CBZ20K، MCK، KLFS، Kindled (KND) بودند. حیوانات گروه کیندل، تحریکات کیندلینگ را روزانه دریافت می‌کردند. گروه KLFS، پس از پایان تحریکات کیندلینگ، تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین را دریافت می‌کرد. در گروه MCK، قبل از تحریکات کیندلینگ، مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد متیل‌سلولز و به گروه‌های دارو+کیندل، مقادیر۲۰ یا ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاربامازپین تزریق می‌شد. در گروه‌های دارو/حلال+کیندل+LFS، در کنار دریافت دارو یا حلال، تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین در پایان تحریکات کیندلینگ اعمال می‌شد. شاخص‌های رفتار تشنجی حیوانات شامل شدت و مدت تشنج و مدت زمان امواج تخلیه متعاقب ثبت می‌شدند. داده‌ها توسط آزمون آماری ANOVA و تست تعقیبی Tukey تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که درمان ترکیبی تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین و مقادیر مؤثر و غیرمؤثر کاربامازپین، باعث کاهش معنی‌دار شاخص‌های تشنجی در گروه‌های دریافت کننده دارو و تحریکات الکتریکی نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی می‌شود (P=۰/۰۳۵).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد، درمان ترکیبی کاربامازپین و تحریک الکتریکی با فرکانس پایین، یک روش مناسب برای کاهش شاخص‌های تشنجی در طی روند کیندلینگ در موش‌های صحرایی باشد.

**واژه‌های کلیدی:** کیندلینگ، تحریک الکتریکی با فرکانس پایین، درمان ترکیبی، شاخص‌های تشنج

۱- ۱- دکترای فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲- (نویسنده مسئول) دانشیار فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
تلفن: ۳۳۳۳۰۰۱۵-۰۶۱، دورنگار: ۳۳۳۶۰۸۰۷-۰۶۱، پست الکترونیکی: z.ghotbaddin@scu.ac.ir
۳- استاد فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۴- استادیار گروه آمار، دانشکده آمار، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

## مقدمه

صرع، نوعی بیماری مزمن و چندعاملی همراه با تشنج‌های ناگهانی تکراری است. در حدود ۲-۱ درصد از مردم جهان از این بیماری رنج می‌برند. با وجود کشف داروهای جدید ضدصرع، یک سوم بیماران مصروع نسبت به درمان‌های دارویی رایج مقاوم هستند. در بیماران مقاوم به دارو، درمان‌های غیردارویی مانند الکتروتراپی نقش حیاتی دارند [۱].

امروزه، کیندلینگ الکتریکی بهترین مدل آزمایشگاهی برای مطالعه صرع لوب گیجگاهی می‌باشد [۲]. در این روش با استفاده از محرک الکتریکی مناسب و به صورت موضعی، یکی از مناطق حساس مغز را به طور مکرر تحریک می‌کنند. اعمال مکرر تحریکات الکتریکی زیرآستانه‌ای منجر به افزایش فعالیت تشنجی و در نهایت تشنج عمومی می‌شود [۳]. کیندلینگ الکتریکی، معمولاً به دو روش سریع (Fast) و مزمن (Chronic) انجام می‌گیرد. در روش مزمن، روزانه یک بار کانون تشنج تحریک می‌شود. در حالی که، در روش سریع تعداد تحریکات الکتریکی در روز، بیش از یک بار است [۴].

داروی کاربامازپین (Carbamazepine; CBZ)، برای درمان صرع لوب گیجگاهی و پیشگیری از تشنج‌های موضعی ساده و پیچیده استفاده می‌شود [۵]. کاربامازپین، از طریق افزایش زمان غیرفعالی کانال‌های ولتاژی سدیمی در نورون پیش‌سیناپسی و مهار آزادسازی میانجی‌عصبی باعث کاهش فرکانس پتانسیل‌های عمل تکراری و توقف تشنج می‌شود [۶]. این دارو در موش‌های صحرایی کیندلی، به طور معنی‌داری آستانه تشنج را افزایش، مدت زمان امواج تخلیه متعاقب و شدت تشنج را کاهش می‌دهد [۷]. متأسفانه، استفاده از داروهای ضدصرع عوارض متعددی مانند اختلال در تمرکز و عدم هماهنگی حرکات را به دنبال دارد. مثلا کاربامازپین باعث کندی حرکات و کاهش چالاکی می‌شود [۸].

روش تحریک عمقی مغز به عنوان روش جایگزین و مؤثر در بیماران صرعی مقاوم به دارو و غیرقابل درمان از طریق جراحی استفاده می‌شود [۹]. در این روش با تغییر مستقیم تخلیه‌های الکتریکی مغز، فرکانس تشنج بیماران مقاوم به درمان کاهش می‌یابد [۱۰]. اثر مهاری نسبی تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (Low frequency stimulation; LFS) بر فرآیندهای کسب کیندلینگ و گسترش تشنج با استفاده از روش کیندلینگ در مدل‌های حیوانی صرع موضعی پیچیده (Complex partial epilepsy) تا حدودی به اثبات رسیده است [۱۱].

با وجود پژوهش‌های بی‌شمار درباره اثرات LFS بر فرآیند کسب کیندلینگ هنوز سؤالات بی‌شماری درباره اثربخشی آن از قبیل انتخاب هسته‌های مغزی و شاخص‌های LFS وجود دارد. متاسفانه، تاکنون در زمینه استفاده هم‌زمان دارودرمانی صرع و الکتروتراپی گزارش‌های چندانی منتشر نشده است [۱۲]. مطالعات Wu و همکاران درباره اثربخشی استفاده ترکیبی مقادیر غیرمؤثر داروهای مختلف ضدتشنج با پرامپنل نشان می‌دهد که مقادیر غیرمؤثر داروهای ضدصرع در موش‌های صحرایی کیندلی آمیگدال باعث کاهش معنی‌دار شاخص‌های تشنجی می‌شوند [۱۳]. نتایج پژوهش-

های Asgari و همکاران نشان می‌دهد که فنوباربیتال و LFS اثر هم‌افزائی بر جریان گابائرژیک دارند و شاخص‌های تشنجی را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهند [۱۴].

امروزه بیماران مبتلا به صرع با مشکلات ناشی از مصرف مزمن داروهای ضدصرع مواجه می‌شوند. تعدادی از این بیماران با مقاومت دارویی و تشنج‌های رام‌نشدنی روبرو می شوند. بنابراین، یافتن روش‌های درمانی جایگزین اهمیت ویژه‌ای دارد. با توجه به نقش کلیدی هیپوکامپ در فرآیند صرع‌زایی [۱۵]، وجود گزارش‌های متناقض درباره اثر بخشی LFS [۱۶] و عوارض متعدد داروهای ضدصرع [۱۷] ضرورت پژوهش‌های کاربردی درباره اثرات ترکیبی LFS و داروهای ضدصرع بر عملکردهای رفتاری بیماران و تعیین پروتکل درمانی احساس می‌شود. تاکنون گزارش‌های جامعی درباره استفاده ترکیبی داروهای ضدصرع و LFS منتشر نشده است. لذا در این کار تحقیقاتی از روش توأم درمان LFS همراه با داروی کاربامازپین در طی روند کیندلینگ هیپوکامپ در موش صحرایی استفاده شده‌است.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی تمام مراحل آزمایش بر اساس دستور العمل کمیته اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در آزمایشگاه الکتروفیزیولوژی پایه دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز با کد EE97/3/24-61254/SCU.AC.IR در سال‌های ۹۷-۱۳۹۵ طراحی و اجرا شدند. برای اجرای آزمایش‌ها از ۵۶ سر موش‌صحرایی نر بالغ دو ماهه نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵±۲۲۵گرم استفاده شد. حیوانات، در شرایط مناسب و بهداشتی خانه حیوانات دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز، با دوره روشنایی/تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، در دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد در قفس‌های پلکسی‌گلاس نگه‌داری می‌شدند. حیوانات در تمام مراحل آزمایش، به طور آزاد به آب و غذای مناسب و کافی دسترسی داشتند. تغذیه حیوانات از کنسانتره‌ی پلت شرکت خوراک دام پارس (تهران) انجام می شد.

به طور کلی ۸ گروه موش صحرایی در این پژوهش استفاده شدند. هر گروه با علامت اختصاری ویژه‌ای معرفی شده است. گروه‌های مورد مطالعه عبارتنداز: ۱. کیندل (KND): روزانه ۱۲ تحریک کیندلینگ (فرکانس ۵۰ هرتز، مدت ۳ ثانیه با فاصله ۱۵ دقیقه) دریافت می‌کردند. ۲. کیندل+LFS (KLFS): پس از پایان تحریکات کیندلینگ، تحریکات LFS دریافت می‌کردند. ۳. متیل‌سلولز+کیندلینگ (MCK): قبل از تحریکات کیندلینگ، ۰/۲ میلی‌لیتر محلول متیل‌سلولز به صورت درون صفاقی دریافت می‌کردند. ۴ و ۵. دارو+کیندلینگ (CBZ20K و CBZ40K): قبل از تحریکات کیندلینگ، مقادیر۲۰ یا ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاربامازپین به صورت درون صفاقی دریافت می‌کردند. ۶. حلال+کیندل+LFS (MCKLFS): قبل از تحریکات کیندلینگ، ۰/۲ میلی‌لیتر محلول متیل‌سلولز به صورت درون صفاقی دریافت می‌کردند. ۷ و ۸. کاربامازپین+ کیندلینگ+LFS (CBZ40KLFS و CBZ20KLFS): قبل از تحریکات کیندلینگ مقادیر ۲۰ یا ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاربامازپین به صورت درون صفاقی دریافت می‌کردند. دستورالمعل کیندلینگ سریع در کلیه گروه‌ها یک‌سان و

همانند گروه کیندل می‌باشد. با توجه به نامحلول بودن کاربامازپین در آب، از متیل‌سلولز به عنوان کمک حلال استفاده می‌شد [۵، ۷]. هر گروه شامل ۷ سر موش صحرایی نر بالغ (۲ ماهه) بود.

برای ساخت الکترودهای سه قطبی و یک قطبی از مفتول فلزی استیل ضد زنگ با روکش تفلونی به قطر ۰/۰۰۸ اینچ ساخت شرکت A-M SYSTEM کشور آمریکا استفاده شد.

استقرار الکترودهای سه قطبی و یک قطبی در هیپوکامپ پشتی موش صحرایی، بعد از بیهوشی حیوانات با تزریق درون صفاقی کتامین (۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و تثبیت سر حیوان در استرئوتاکس (ساخت شرکت Stoelting کشور آمریکا) انجام می‌شد [۱۸]. سپس با برش پوست سر، مختصات برگما و لامبدا خوانده می‌شد و بر اساس اطلس پاکسینوس-واتسون منطقه هیپوکامپ پشتی یا CA1 (۲/۵ mm به سمت عقب و ۱/۸ mm به سمت راست برگما و ۲/۸ mm زیر سخت شامه) در سطح جمجمه علامت‌گذاری شد [۱۹]. سپس، جمجمه سوراخ می‌شد و الکترود سه قطبی به آرامی وارد هیپوکامپ پشتی می‌شد. الکترود تک قطبی نیز، به استخوان پیشانی جمجمه متصل می‌شد. پس از آن الکترودها از طریق پین-های مخابراتی به سوکت مخابراتی دوگانه متصل می‌شدند. در پایان سوکت مخابراتی با استفاده از سیمان دندان‌پزشکی بر روی جمجمه تثبیت می‌شد. حیوانات دوره بهبودی و دست‌آموز شدن را به مدت یک هفته در خانه حیوانات می-گذراندند [۲۰].

برای به دست آوردن حداقل شدت تحریک ایجاد کیندلینگ، ابتدا با جریانی به شدت ۳۰ میکروآمپر ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌صحرایی تحریک می‌شد. اگر امواج تخلیه متعاقب مناسب ثبت می‌شد، این شدت به عنوان شدت جریان آستانه تولید امواج تخلیه متعاقب شناخته می-شد. در غیر این صورت، هر بار شدت جریان به اندازه ۱۰ میکروآمپر با فاصله ۱۵ دقیقه افزایش داده می‌شد تا وقتی که امواج تخلیه متعاقب مناسب ثبت شود [۱۵].

برای ایجاد کیندلنگ الکتریکی به روش سریع، ۲۴ ساعت بعد از تعیین آستانه، حیوانات با موج مربع تک فازی (فرکانس ۵۰ هرتز، با شدت تولید امواج تخلیه متعاقب، مدت پالس ۰/۱ میلی‌ثانیه، به مدت ۳ ثانیه) تحریک می‌شدند. این تحریکات به صورت روزانه (۱۲ بار، با فاصله ۱۰ دقیقه) در طی ۶ روز اعمال می‌شد [۲۱]. پس از اعمال تحریکات کیندلینگ، امواج الکتریکی مغزی توسط الکترود ثبات به دستگاه الکتروماجول (ساخت شرکت پرتودانش، تهران) و سپس رایانه منتقل می‌شدند. کمیت‌های ثبت شده الکتروفیزیولوژیکی رفتار تشنجی حیوانات عبارتند از:

۱- مدت زمان امواج تخلیه متعاقب ( Afterdischarge duration; ADD): میانگین مدت زمان (ثانیه) تخلیه امواج متعاقب از روز اول تحریکات الکتریکی تا پایان روز ششم اعمال تحریکات کیندلی.

۲- شدت تشنج (seizure score; SS): بر اساس معیارهای ریسین (Racine scale) به پنج مرحله تقسیم می-شود: حرکات غیرارادی صورت؛ حرکت نوسانی سر به بالا و پایین (Head nodding)؛ کلونوس متناوب یکی از اندام‌های

حرکتی جلویی (Forelimb clonus)؛ ایستادن روی هر دو پای عقبی توأم با کلونوس هر دو اندام جلویی (Rearing)؛ ایستادن روی هر دو پای عقبی، عدم تعادل ( Rearing and falling) [۲۰].

۳- مدت زمان کل تشنج (Seizure duration; SD): مدت زمان بین اعمال تحریکات کیندلی به حیوان تا خاتمه علائم تشنج [۱۵].

تحریک الکتریکی با فرکانس پایین به صورت چهار بسته در فواصل زمانی پنج دقیقه‌ای به مدت شش روز بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ به موش صحرایی اعمال می‌شد. هر بسته شامل ۲۰۰ موجِ مربعیِ دوفازی است؛ که هر پالس آن ۰/۱ میلی‌ثانیه و فرکانس آن نیز ۱ هرتز می‌باشد [۲۲]. دستوالعمل این تحریکات در ناحیه CA1 هیپوکامپ و بین ساعات ۹ صبح الی ۱۷ بعدازظهر اعمال می‌شد (شکل ۱).




***شکل ۱- مقطع عرضی هیپوکامپ موش صحرایی (پیکان محل ورود الکترود را در ناحیه CA1 نشان می‌دهد.)***

برای تزریق داروی ضدصرع، مقادیر ۴ و ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش صحرایی کاربامازپین (ساخت شرکت Sigma-Aldrich کشور آلمان) را به صورت روزانه در ۰/۲ میلی‌لیتر کمک حلال متیل‌سلولز حل نموده و به صورت درون صفاقی تزریق می‌شد [۵،۷].

نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار بیان شد. جهت بررسی نرمال بودن داده ها از آزمون Kolmogorov–Smirnov استفاده شد. در کلیه آزمون‌ها در صورت نرمال بودن داده‌ها و همگن بودن واریانس‌ها از آزمون ANOVA یک‌طرفه و پس آزمون Tukey و در صورت همگن نبودن از آزمون ناپارامتری Kruskal-Wallis استفاده شد. هم‌چنین در تمامی موارد p<۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

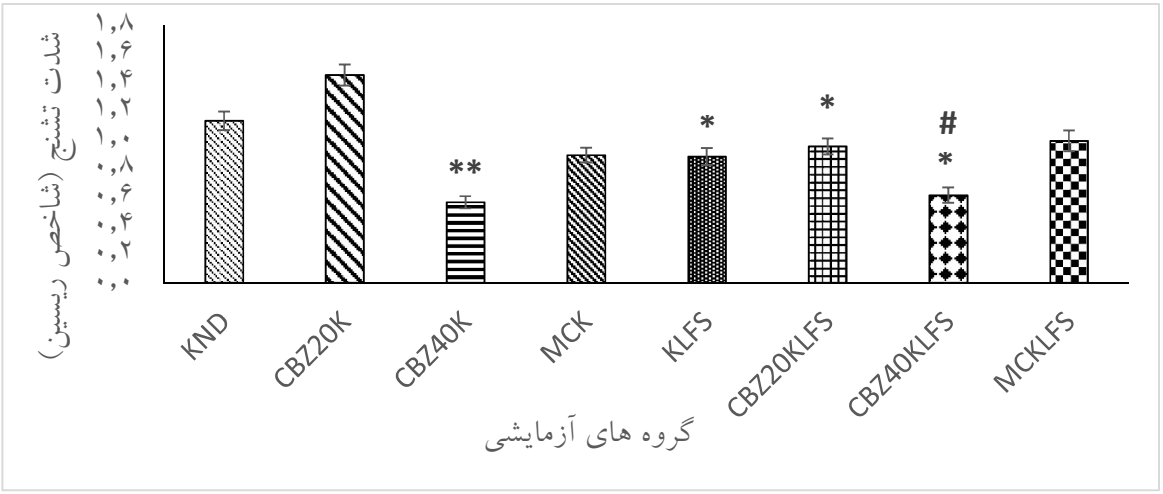
## نتایج

براساس نتایج، تجویز توأم کاربامازپین و LFS در طی صرع‌زایی هیپوکامپ پشتی بر شاخص‌های الکتروفیزیولوژیکی تشنج اثرگذار است (P=۰/۰۳۵).

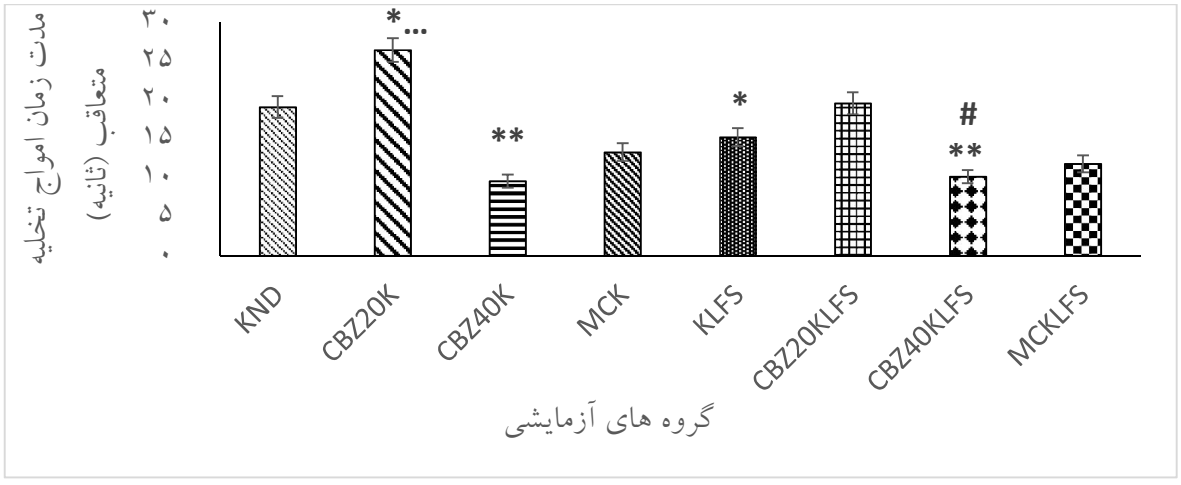
نتایج نشان داد که میانگین شدت تشنج در گروه KLFS (P=۰/۰۳۵)، CBZ40K (P=۰/۰۰۶)، CBZ40KLFS (P=۰/۰۱۵) و CBZ20KLFS (P=۰/۰۴۶) به طور معنی‌داری نسبت به گروه KND کم‌تر است. ولی شدت تشنج در گروه CBZ20K به طور معنی‌داری نسبت به گروه KND (P=۰/۰۲۴) بالاتر است. در حالی‌که میانگین شدت تشنج در گروه CBZ40KLFS به طور معنی‌داری نسبت به KLFS کاهش یافته است (P=۰/۰۲۲)؛ در گروه CBZ20KLFS نسبت به گروه KLFS تفاوت معنی‌داری نشان نداد (نمودار ۱).

میانگین مدت زمان امواج تخلیه متعاقب در گروه‌های آزمایشیKLFS (P=۰/۰۴۲)، CBZ40K (P=۰/۰۰۳)، BZ40KLFS (P=۰/۰۲۲) نسبت به گروه KND کاهش

معنی‌داری را نشان داد درحالی‌که در گروه CBZ20K نسبت به گروه کیندل افزایش معنی‌دار نشان داد (P=۰/۰۰۶). این میانگین در گروه CBZ40K کم‌ترین مقدار را داشت. میانگین مدت زمان امواج تخلیه متعاقب در گروه CBZ40KLFS نیز به طور معنی‌داری نسبت به KLFS کاهش یافت (P=۰/۰۱۴) (نمودار ۲).



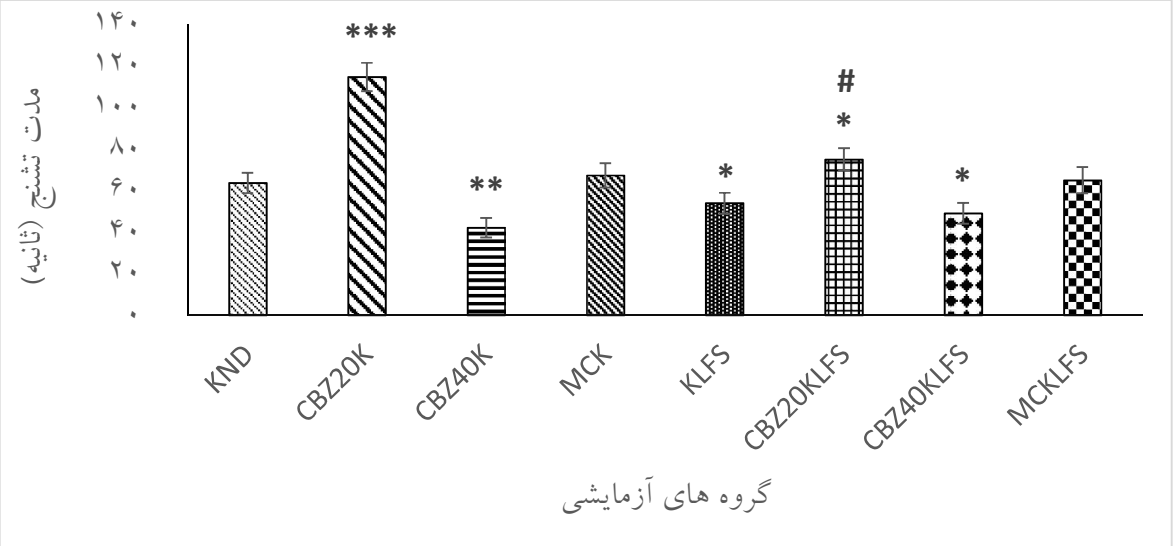

***نمودار ۱- مطالعه اثر تجویز توأم کاربامازپین و LFS بر میانگین شاخص شدت تشنج در گروه‌های مورد مطالعه: کیندل (KND)، دارو+کیندل (CBZ20K و CBZ40K)، متیل‌سلولز+کیندل (MCK)، کیندل+LFS (KLFS)، دارو+کیندل+LFS (CBZ20KLFS و CBZ40KLFS) و متیل-سلولز+کیندل+LFS (MCKLFS). نتایج به صورت میانگین± خطای معیار نشان داده شده اند (n=۷). * و ** بیانگر تفاوت معنی‌دار به ترتیب در سطح p<۰/۰۵ و p<۰/۰۱ نسبت به گروه کیندل و # اختلاف معنی دار را در سطح p<۰/۰۵ نسبت به گروه KLFS نشان می دهند.***




***نمودار ۲- مطالعه اثر تجویز توأم کاربامازپین و LFS بر میانگین مدت زمان امواج تخلیه متعاقب (ثانیه) در گروه‌های مورد مطالعه کیندل (KND)، دارو+کیندل (CBZ20K و CBZ40K)، متیل‌سلولز+کیندل (MCK)، کیندل+LFS (KLFS)، دارو+کیندل+LFS (CBZ20KLFS و CBZ40KLFS) و متیل‌سلولز+کیندل+LFS (MCKLFS). نتایج به صورت میانگین± خطای معیار نشان داده شده اند (n=۷). * و ** نشان دهنده تفاوت معنی‌دار به ترتیب در سطح p<۰/۰۵ و p<۰/۰۱ نسبت به گروه کیندل است و # اختلاف معنی دار را در سطح p<۰/۰۵ نسبت به گروه KLFS نشان می دهد.***

با توجه به نتایج، میانگین مدت تشنج در گروه KLFS (P=۰/۰۳۰)، CBZ40K (P=۰/۰۰۴) و CBZ40KLFS (P=۰/۰۱۶)، نسبت به گروه KND کاهش معنی‌داری داشت ولی در گروه های CBZ20KLFS (P=۰/۰۳۲) و CBZ20K (P=۰/۰۰۱) مدت تشنج نسبت به گروه KND افزایش معنی‌داری نشان داد. هم‌چنین، میانگین شدت تشنج در گروه CBZ20KLFS نسبت به گروه KLFS افزایش معنی-داری یافت (P=۰/۰۲۱) (شکل ۳).

به‌طور کلی به نظر می‌رسد، استفاده توأم از CBZ40 و LFS می‌تواند شاخص‌های الکتروفیزیولویکی رفتار تشنجی را در موش‌های صحرایی در طی فرآیند کسب کیندلینگ مهار نماید.




***نمودار ۳- مطالعه اثر تجویز توأم کاربامازپین و LFS بر میانگین مدت تشنج در گروه‌های مورد مطالعه کیندل (KND)، دارو+کیندل (CBZ20K و CBZ40K)، متیل‌سلولز+کیندل (MCK)، کیندل+LFS (KLFS)، دارو+کیندل+LFS (CBZ20KLFS و CBZ40KLFS) و متیل‌سلولز+کیندل+LFS (MCKLFS). نتایج به صورت میانگین± خطای معیار نشان داده شده اند (n=۷). * ، ** و *** نشان دهنده تفاوت معنی‌دار به ترتیب در سطح p<۰/۰۵، p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱ نسبت به گروه کیندل است و # اختلاف معنی دار را در سطح p<۰/۰۵ نسبت به گروه KLFS نشان می دهد.***

## بحث

نتایج تحقیق ما نشان می‌دهد که، استفاده توأم از مقدار غیرمؤثر کاربامازپین (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) همراه با اعمال LFS بلافاصله بعد از اعمال کیندلینگ الکتریکی ناحیه CA1 هیپوکامپ، نسبت به گروه کیندل اثر کاهشی معنی‌داری بر میانگین شدت تشنج دارد (شکل۱). اما، در استفاده توأم مقدار مؤثر کاربامازپین (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با LFS اثر کاهشی معنی‌داری بر کلیه شاخص-های تشنجی مشاهده می‌شود (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

با وجود اثرات مثبت کاربامازپین و LFS در کاهش عوارض ناشی از صرع، هریک از این دو روش درمانی مشکلات جدی از قبیل اختلال در تمرکز و کندی حرکات را برای بیماران مصروع به همراه دارند [۸]. مشابه همین نتایج، در آزمایش‌های رفتاری که به دنبال کیندلینگ

هیپوکامپ موش صحرائی انجام شد، کاهش تعادل در آزمون میله‌چرخان مشاهده شد [۲۳].

در مقام مقایسه، داروی کاربامازپین و تحریک الکتریکی با فرکانس پایین اثرات مشابهی بر شاخص‌های تشنجی دارند [۷]. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهند که استفاده از LFS یا کاربامازپین باعث کاهش معنی‌دار میانگین شدت تشنج، مدت تشنج و مدت امواج تخلیه متعاقب در گروه‌های KLFS و CBZ40K نسبت به گروه KND می‌شوند. ولی، استفاده از LFS با وجود کاهش شاخص‌های تشنجی در مقایسه با CBZ اثر ضعیف‌تری بر تشنج دارد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). لذا، یافتن پروتکل درمانی مؤثر برای LFS یا استفاده توأم آن با دارو درمانی، به منظور جایگزینی آن با داروهای ضدصرع مانند CBZ نیاز به مطالعه وسیع شاخص‌های مختلف LFS و اثرات ضد صرعی آن دارد.

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که در کلیه شاخص-های تشنجی اندازه‌گیری شده، اثرات مقدار مؤثر کاربامازپین در مهار شاخص‌های تشنجی بهتر از LFS تنها می‌باشد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). به نظر می‌رسد اثرات مهاری شدیدتر CBZ بر شاخص‌های مختلف تشنجی ناشی از دامنه وسیع اثرات آن بر کانال‌های مختلف غشای نورون‌های مغزی است. بنابراین، در بیمارانی که شدت تشنج بیش‌تری دارند، داروی کاربامازپین گزینه مناسب‌تر درمانی نسبت به LFS می‌باشد. ولی در بیمارانی که شدت تشنج کم‌تری دارند، LFS گزینه درمانی مطلوب می‌باشد؛ چون به نظر می‌رسد LFS عوارض جانبی کم‌تری نسبت به CBZ داشته باشد [۲۳]. مطالعات گسترده‌ای توسط Wu و همکاران درباره اثربخشی استفاده ترکیبی مقادیر غیر مؤثر داروهای ضد تشنج مختلف مانند Carbamazepine، Valproic acid، Lamotrigine و Levetiracetam همراه با داروی ضدتشنجی جدید Perampanel بسیار جالب توجه می‌باشد. بر اساس نتایج این پژوهش، استفاده ترکیبی پرامپنل با مقادیر غیرمؤثر داروهای ضدصرع در موش‌های صحرایی کیندلی در آمیگدال باعث کاهش معنی‌دار شاخص‌های تشنجی مختلف اندازه‌گیری شده مانند شدت تشنج و مدت تشنج می‌شود. تجویز مقادیر غیرمؤثر پرامپنل همراه با مقادیر غیرمؤثر داروهای ضدصرع، در مقایسه با تجویز داروهای ضدصرع به تنهایی، نیز شاخص‌های تشنجی را کاهش می‌دهد [۱۳]. هم‌چنین، هم‌سو با فرضیه‌های ارائه شده نتایج حاصل از آزمایش‌های ما نشان می‌دهند که، استفاده ترکیبی از کاربامازپین (مقادیر مؤثر و غیرمؤثر) و LFS اثرات مهاری جدی (کاهشی و معنی‌دار) بر شدت تشنج دارند (شکل ۱).

اثرات استفاده ترکیبی از مقدار مؤثرکاربامازپین و LFS بر مدت امواج تخلیه متعاقب و مدت تشنج نیز هماهنگ و مشابه اثرات آن بر شدت تشنج می‌باشد؛ یعنی تفاوت معنی-داری کاهشی شاخص‌های تشنجی را در استفاده توأم مقدار مؤثر کاربامازپین و LFS در مقایسه با گروه کیندل نشان می‌دهد (شکل ۲ و ۳).

نتایج پژوهش‌های دیگری نشان می‌دهند که، استفاده ترکیبی از مقدار مؤثر والپروات سدیم و LFS باعث کاهش

شدت تشنج می‌شوند. هم‌چنین، استفاده ترکیبی از مقدار مؤثر والپروات سدیم و LFS اثر ضد تشنجی قوی‌تری نسبت به استفاده از والپروات سدیم یا LFS به تنهایی دارند [۲۵]. گزارش شده است که مقادیر غیرمؤثر فنوباربیتال و شدت غیرمؤثر LFS در موش‌های صحرایی که به روش کیندلینگ سریع الکتریکی در هسته قاعده‌ای-جانبی آمیگدال صرعی شدند، اثر هم‌افزایی بر جریان گابائرژیک دارند و شاخص‌های تشنجی را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهند [۱۴،۲۵]. هم‌چنین، استفاده از تحریک الکتریکی با فرکانس پایین، به دلیل فعال سازی گیرنده‌های مهاری گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA)، اثر مهاری بر تشنج و صرع دارد [۲۶]. داروی کاربامازپین نیز، با ساز و کار متفاوتی بر عملکرد کانال‌های سدیمی، اثر مهاری قوی بر تشنج و صرع دارد [۸].

تحریک الکتریکی مستقیم مغز باعث کاهش شدت امواج مغزی و کاهش تشنج در موش‌های صحرایی با تشنج مزمن ناشی از پنتیلن تترازول شده است. هم‌چنین، استفاده ترکیبی از تحریک الکتریکی مستقیم مغز همراه با لورازپام بر شدت تشنج، نسبت به هر یک از آنها به تنهایی بسیار مؤثر بوده است. بنابراین، به نظر می‌رسد، تحریک الکتریکی مستقیم مغز اثر مهاری گابائرژیک را از طریق گیرنده $GABA_A$ افزایش می‌دهد [۲۷، ۲۹].

نتایج پژوهش‌های دیگری نشان می دهد که، استفاده ترکیبی از مقادیر غیرمؤثر فنوباربیتال و LFS شدت تشنج-های صرعی ناشی از کیندلینگ آمیگدال را در موش‌های صحرایی کاهش داده است. هم‌چنین، استفاده از شدت غیرمؤثر LFS بدون اثر ضدتشنجی همراه با مقدار غیرمؤثر فنوباربیتال اثر ضد تشنجی معنی‌داری در حیوانات کیندلی شده است. به علاوه، ترکیب الگوی مؤثر LFS با مقدار غیر مؤثر فنوباربیتال اثرات ضد تشنجی مؤثری داشته است [۲۵].

با وجود این‌که تحریک عمقی مغز روشی تهاجمی برای درمان صرع می‌باشد، ولی تحریک الکتریکی مغز اثرات مهاری قوی‌تری بر تشنج دارد. نکته مهم این است که، هنوز به دقیق معلوم نیست تحریک کدام ساختار مغز اثر مهاری مطلوب‌تری به دنبال دارد. البته، به نظر می‌رسد شبکه‌های عصبی هسته‌های تالاموسی و زیر تالاموسی مانند هیپوکامپ نقش ضرباساز یا ماشه را در این زمینه بازی می‌کنند [۲۶]. هم‌چنین، روش‌های غیر تهاجمی گسترده‌ای (تحریک از سطح جمجمه، بدون جراحی و الکترودگذاری در مغز) برای تحریک الکتریکی مغز ابداع شده است [۲۹]. لذا، به نظر می‌رسد با توجه به تأثیر شاخص‌های مختلف در درمان ترکیبی مانند نوع تشنج، نوع دارو و ویژگی‌های LFS (مانند جایگاه تحریک، الگوی تحریک) هنوز فاصله زیادی تا رسیدن به روش درمانی مطلوب و مؤثرتر وجود دارد.

از مزایای کیندلینگ الکتریکی اختصاصی بودن محل تحریک، مشاهده روند ایجاد و توسعه صرع و امکان مشاهده الگوی تولید و انتشار تشنج می‌باشد. یعنی امکان کنترل دقیق فرآیند صرع و تنظیم صرع‌زایی را فراهم می‌کند [۳۱-

۳۰]. به طورکلی، مرگ و میر پایین و قابلیت تکرار پذیری بالا مزیت مهم این روش می‌باشد [۴،۳۲].

متأسفانه، کیندلینگ الکتریکی، روشی پر هزینه، پرزحمت و بسیار زمان‌بر است و شامل دوره‌های طولانی رسیدگی و مراقبت از حیوانات و تحریک الکتریکی مغز می‌باشد. به علاوه احتمال از دست دادن یا آسیب الکترودهای کاشته شده، در طولانی مدت نیز وجود دارد [۳۲، ۴].

نتایج ما اثربخشی مثبت استفاده ترکیبی داروی کاربامازپین و LFS را نشان می‌دهد. امید می‌رود این روش بتواند در آینده جایگزین روش دارومانی در بیماران مبتلا به صرع مقاوم با دارو باشد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود تأثیر کاربامازپین و HFS بر روند صرع‌زایی در طی کیندلینگ ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌صحرایی بررسی شود. هم‌چنین با استفاده از میانجی‌های عصبی نشان‌دار، تصویربرداری هم‌زمان از مغز و تهیه مقاطع بافتی مغز مراکز عصبی درگیر در تشنج و صرع شناسایی شود.

## نتیجه‌گیری

به طورکلی، بر اساس نتایج ما استفاده توأم از مقدار مؤثر کاربامازپین و LFS می‌تواند شاخص‌های الکتروفیزیولوژیکی رفتار تشنجی موش‌های صحرایی را در طی فرآیند کسب کیندلینگ مهار نماید. لذا، انتظار می‌رود درمان ترکیبی داروی ضد صرع و LFS به عنوان روش درمانی جایگزین در معالجه صرع مقاوم به دارو استفاده شود. هم‌چنین، با توجه با کاهش مقدار داروی تجویزی احتمال می‌رود که عوارض جانبی مصرف داروهای ضدصرع را به مراتب کاهش دهد.

## تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی به وسیله بودجه پژوهشی (گرنت:۹۶/۳/۲/۱۶۶۷۰) دانشگاه شهید چمران اهواز در آزمایشگاه الکتروفیزیولوژی دانشکده علوم به سرانجام رسیده است. لذا شایسته است از حمایت‌های بی‌دریغ و همه جانبه معاونت پژوهشی دانشگاه در تامین مالی پروژه تقدیر و تشکر شود.

# References

[1] Yasam V, Jakki SL, Senthil V, Jawahar N, Rao PV, Chalichem N. An Overview of Non-drug Therapies for the Treatment of Epilepsy. *Indian Journal of Pharmacy* 2018; 80(2): 223-34.

[2] Albertson T, Joy R, Stark L. A pharmacological study in the kindling model of epilepsy. *Neuropharmacology* 1984; 23(10): 1117-23.

[3] Kupferberg H: Animal models used in the screening of antiepileptic drugs. *Epilepsia* 2001; 42(2):7-12.

[4] Wasterlain C, Farber DB, Fairchild D. Cholinergic kindling: What has it taught us about epilepsy? Journal of neural transmission 1985; 63(2): 119-32.

[5] Srivastava AK, White HS. Carbamazepine, but not valproate, displays pharmacoresistance in lamotrigine-resistant amygdala kindled rats. *Epilepsy Research* 2013; 104(1-2): 26-34.

[6] Bron GVR, et al. Handbook OF Experimental Pharmacology: Springer Press; 2009; 19-33 .

[7] Srivastava AK, Alex AB, Wilcox KS, White HS. Rapid loss of efficacy to the antiseizure drugs lamotrigine and carbamazepine: a novel experimental model of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsy Research* 2013; 54(7): 1186-94.

[8] Bertram GK. Basic and Clinical pharmacology: McGraw-Hill Companies; 2012; 409-419 .

[9] Jobst B. Brain stimulation for surgical epilepsy. *Epilepsy Research* 2010; 89(1): 154-61.

[10] Widdess-Walsh P, Kellinghaus C, Bösebeck F, Schuele S, Loddenkemper T. Efficacy of electrical brain stimulation in epilepsy. *Nerven* 2010; 7(5): 481-96.

[11] Bertram E. The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48(5): 65-74.

[12] Moghaddasi R, Moazedi AA, Ghotbeddin Z, Akhond MR, Effect of electrical low-frequency stimulation during epileptogenesis of dorsal hippocampal on balance and locomotor activity in adult male rats. *Journal of Kashan University of Medical Sciences* 2019; 22(6): 538-46.

[13] Wu T, Nagaya Y, Hanada T. Pharmacodynamic and pharmacokinetic interactions of perampanel and other antiepileptic drugs in a rat amygdala kindling model. *Seizure* 2014; 23(9): 732-9.

[14] Asgari A, Semnanian S, Atapour N, Shojaei A, Moradi-Chameh H, Ghafouri S, et al. Low-frequency electrical stimulation enhances the effectiveness of phenobarbital on GABAergic currents in hippocampal slices of kindled rats. *Neuroscience* 2016; 330: 26-38.

[15] Toibaro L, Pereyra M, Pastorino J, Smigliani A, Ocariz F, Ortmann G, et al. Effect of unilateral low-frequency stimulation of hippocampus on rapid kindling—induced seizure development in rats. *Neuroscience* and *Medicine* 2012; 3(02): 174-87.

[16] Mohammad-Zadeh M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Javan M, Ghorbani P, Sadegh M, et al. Effect of low frequency stimulation of perforant path on kindling rate

and synaptic transmission in the dentate gyrus during kindling acquisition in rats. *Physiology and Pharmacology* 2007; 75(2-3): 154-61.

[17] Cuellar-Herrera M, Peña 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 in rats. *Epilepsia* 2010; 51(3): 432-7.

[18] McNamara JO. Pursuit of the mechanisms of kindling. *Trends in neurosciences* 1988; 11(1): 33-6.

[19] Paxinos G, Watson C. The Rat Brain. London: Academic Press 2005; 14-15.

[20] Durmuller N, Porsolt R. Current protocols in Pharmacology John wiley & Sons Inc.2003; 5331-17.

[21] Racine R, Rose PA, Burnham W. Afterdischarge thresholds and kindling rates in dorsal and ventral hippocampus and dentate gyrus. *Canadian Journal of Neurological Sciences* 1977; 4(4): 273-8.

[22] Ghotbedin Z, Janahmadi M, Mirnajafi-Zadeh J, Behzadi G, Semnanian S. Electrical low frequency stimulation of the kindling site preserves the electrophysiological properties of the rat hippocampal CA1 pyramidal neurons from the destructive effects of amygdala kindling: the basis for a possible promising epilepsy therapy. *Brain stimulation* 2013; 6(4): 515-23.

[23] Moghaddasi R, Moazedi AA, Ghotbeddin Z, Akhond MR. The effect of electrical low-frequency stimulation on balance and locomotor activity in adult male rats during epileptogenesis of dorsal hippocampal. *J Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences* 2018; 22(6): 538-46.

[24] zalkhani R, Moazedi AA, Ghotbeddin Z, Pourmahdi Borujeni M. Behavioral Consequences of hippocampal epileptogenesis in adult male rat. *Urmia Medical Journal* 2019; 29(11): 807-16.

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

[26] Asghari A, Moradi H, Shojaei A, Mirnajafi Zadeh J. Interaction Between The Anticonvusant Effects Of Low-Frequency Stimulaion and Phenobarbithal in Amygdala Kindled Seizures in rats. *Neuroscience* 2016; 330: 26-38.

[27] Dhamne SC, Ekstein D, Zhuo Z, Gersner R, Zurakowski D, Loddenkemper T, et al. Acute seizure suppression by transcranial direct current stimulation in rats. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2015; 2(8): 843–56.

[28] Regner GG, Pereira P, Leffa DT, de Oliveira C, Vercelino R, Fregni F, et al. Preclinical to Clinical Translation of Studies of Transcranial Direct-Current Stimulation in the Treatment of Epilepsy: A Systematic Review. *Neuroscince* 2018;12(3):189-98.

[29] Fisher RS, Velasco AL. Electrical brain stimulation for epilepsy. *Nature Neurology* 2014; 10(5): 261-78.

[30] Havasimehr M, Saffarzadeh F, Divanbeigi A, Karimzadeh F. A review on the animal models of seizure. *Medical Journal TUMS* 2018; 76(2): 79-89.

[31] Morales JC, Álvarez-Ferradas C, Roncagliolo M, Fuenzalida M, Wellmann M, Nualart FJ, et al. A new rapid kindling variant for induction of cortical epileptogenesis in freely moving rats. *Front. Cell. Neurosci*ence 2014; 8(2): 200-11.

[32] Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. Neuropsychiatric disease and treatment. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2014; 10: 1693-705.

# Increasing the Effectiveness of Carbamazepine by Low Frequency Electrical Stimulation During CA1 Hippocampal Kindling on Seizure Scales in Adult Male Rats: An Experimental Study

**R. Moghaddasi [۱], Z. Ghotbeddin[۲], A. A. Moazedi[۳], M. R. Akhond[۴]**

**Received: 10/06/2019 Sent for Revision: 07/07/2019 Received Revised Manuscript: 20/10/2019 Accepted: 03/11/2019**

**Background and Objectives** Nowadays, the application of Low Frequency Stimulations (LFS) has been considered as an alternative treatment in drug-resistant epileptic patients. So, the aim of this study was to determine the co-administration effects of LFS and carbamazepine (CBZ) during epileptogenesis in dorsal hippocampus using electrical Kindling method on seizure scales in adult male rats.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 56 adult male wistar rats were randomly divided into 8 equal groups including: Kindled (KND), KLFS, MCK, CBZ20K, CBZ40K, CBZ20KLFS, CBZ40KLFS, and MCKLFS. Animals in the Kindled group received daily stimulation of kindling. In the KLFS group, LFS were applied daily after the termination of kindling stimulation. In the MCK group, before induction of kindling stimulation, the amount of 0.2 ml of %0.5 methyl cellulose was injected, and CBZ20K and CBZ40K groups received CBZ20 and 40mg / kg. In the CBZ20KLFS, CBZ40KLFS, and MCKLFS groups in addition to receiving drug or solvent, LFS was applied at the end of kindling stimulation. Animal behavioral seizure scales (seizure severity, afterdischarge duration and seizure duration) were recorded. Finally, data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

**Results*:*** The results showed that the combination therapy of LFS and the effective and ineffective amounts of CBZ significantly reduced the seizure scales in CBZ20KLFS and CBZ40KLFS groups compared with the other experimental groups (p=0.035).

**Conclusion*:*** It seems that combination therapy of CBZ and LFS is an appropriate method to reduce seizure scales during kindling in rats.

**Key words*:*** Kindling, Low frequency electrical stimulation, Combination therapy, Seizure scales

**Funding**: This study has been funded by Shahid Chamran University of Ahvaz.

**Conflict of interest**: None declared.

**Ethical approval**: The Ethics Committee of Shahid Chamran University of Ahvaz has approved the study (EE97/3/24-61254/SCU.AC.IR)**.**

**How to cite this article:** Moghaddasi R, Ghotbeddin Z, Moazedi AA, Akhond MR. Increasing the Effectiveness of Carbamazepine by Low Frequency Electrical Stimulation During CA1 Hippocampal Kindling on Seizure Scales in Adult Male Rats: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2020; 18 (12): 1197-1210. [Farsi]

***1- PhD in Physiology, Dept. of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, ORCID: 0000-00020192-2600***
***2- Associate Prof. of Physiology, Dept. of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, ORCID: 0000-0003-2110-6333.***
***(Corresponding Author) Tel: (061) 3330015, Fax: (061) 33360807, E-mail: z.ghotbeddin@scu.ac.ir***
***3- Prof. of Physiology, Dept. of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, ORCID: 0000-0003-1346-2426***
***4- Assistant Prof., Dept. of Statistics, Faculty of Statistics, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. ORCID: 0000-0002-0705-9430***