

Evaluation of Changes Expression of D1, mGluR1 and CD38 Genes after Electrical Kindling and Treatment with Low-Frequency Stimulation in Rats

Ranjbar S.¹ MSc, Khajeh Kh.^{*1} PhD, Mirnajafi-Zadeh S.J.² PhD, Dabirmanesh B.¹ PhD, Khodaverdian Sh.¹ PhD

¹ Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Physiology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Electrical Kindling is one of the most popular epileptic model techniques that cause seizures such as temporal lobe epilepsy. So far, various therapies have been used to treatment of epilepsy. Among these treatments, low-frequency stimulation (LFS) has been widely considered for improving effect on drug-resistant epilepsy, but its mechanism is not well understood. Since calcium entering the cytoplasm and increasing its concentration is one of the most important reasons for seizure, metabotropic glutamate receptor (mGluR1), dopamine receptor (D1), and ADPR cyclase (CD38), which increased calcium in the cytoplasm from different pathways, were selected. With this aim that by examining the change in the expression of these receptors, we help to clarify the LFS improvement effect. In the present study, the hippocampus of rats was used and the changes in genes expression were investigated using real-time PCR technique. The expression of all selected genes increased significantly after kindling and then after the LFS the expression of all three genes was returned to sham value. Hence, one of the ways in which LFS interferes may be related to the pathway for calcium entering the cytoplasm.

Keywords

Electrical Kindling [Not in MeSH];

Low-Frequency Stimulation [Not in MeSH];

Seizure [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68012640>];

Epilepsy [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004827>]

* Corresponding Author

Tel: +98 (21) 82884714

Fax: +98 (21) 82884717

Post Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran.

Postal Code: 1411713116

khajeh@modares.ac.ir

Received: April 19, 2019

Accepted: July 24, 2019

ePublished: March 14, 2020

ارزیابی تغییر بیان ژن‌های *mGluR1*, *D1* و *CD38* پس از کیندلینگ الکتریکی و درمان با تحریک الکتریکی با فرکانس پایین در موش‌های صحرایی

سمیرا رنجبر MSc

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

خسرو خواجه PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

سیدجواد میرنجفی‌زاده PhD

گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

بهاره دبیرمنش PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

شیمادوردیان PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

کیندلینگ الکتریکی یکی از محبوب‌ترین تکنیک‌های مدل صرعی است که باعث ایجاد تشنج‌هایی مانند صرع لوب گیجگاهی می‌شود. تاکنون برای درمان صرع، از تکنیک‌های درمانی مختلفی استفاده شده است. از بین این تکنیک‌ها، تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (LFS)، به‌طور گسترده‌ای برای بهبود صرع مقاوم به دارو مورد توجه قرار گرفته است، اما مکانیزم اثر آن به خوبی روشن نشده است. از آنجایی که وارد شدن کلسیم به سیتوپلاسم و افزایش غلظت آن یکی از مهم‌ترین دلایل بروز تشنج است، گیرنده‌های متابوتروپیک گلوتامات (*mGluR1*)، دوپامین (*D1*) و *ADPR* سیکلاز (*CD38*) که از مسیرهای مختلف باعث افزایش کلسیم در سیتوپلاسم می‌شوند انتخاب شدند. با این هدف که با بررسی تغییر بیان این گیرنده‌ها کمک به‌سزایی به مشخص شدن مسیر بهبودبخشی LFS شود. در مطالعه حاضر از هیپوکامپ موش‌های صحرایی استفاده شد و تغییر بیان ژن‌ها با تکنیک *real-time PCR* مورد بررسی قرار گرفت. پس از کیندلینگ بیان هر سه ژن انتخابی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و بعد از اعمال تحریکات LFS میزان بیان هر سه ژن به مقدار کنترل بازگشت. از این رو یکی از مسیرهایی که LFS برای بهبودبخشی تشنج‌های کیندلینگ مداخله می‌کند، ممکن است مربوط به مسیر ورود کلسیم به سیتوپلاسم باشد.

کلیدواژه‌ها: کیندلینگ الکتریکی، تحرک الکتریکی با فرکانس پایین، تشنج، صرع

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۲

*نویسنده مسئول: khajeh@modares.ac.ir

مقدمه

کیندلینگ الکتریکی یکی از محبوب‌ترین تکنیک‌های ایجاد مدل صرعی است که باعث ایجاد تشنج‌هایی شبیه به صرع لوب گیجگاهی می‌شود^[1]. تاکنون تکنیک‌های درمانی زیادی برای درمان صرع مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از این تکنیک‌های درمانی که اخیراً برای بهبود صرع مقاوم به دارو استفاده می‌شود، تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (LFS) است^[2]. علی‌رغم اینکه تحریک الکتریکی مغز به‌تازگی توسط سازمان غذا و دارو (FDA) به‌عنوان

یک روش جدید برای درمان صرع مقاوم به دارو تایید شده، اما هنوز مکانیزم اثر آن به خوبی روشن نشده است^[3, 4]. بررسی تغییرات میزان پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و گیرنده‌های سیستم عصبی پس از LFS، موجب درک بیشتر مکانیزم اثرات LFS می‌شود. بسیاری از مطالعاتی که روی مدل‌های صرعی و تشنجی انجام شده، نشان می‌دهد که ورود کلسیم به داخل سلول‌های عصبی از اولین نشانه‌های بروز تشنج است^[5-10]. به عبارت دیگر افزایش کلسیم سیتوپلاسمی باعث دپولاریزاسیون غشا شده که در ادامه منجر به التهاب، افزایش سرعت متابولیسم، استرس اکسیداتیو، تشنج و در نهایت آپوپتوز می‌شود^[11-15]. مسیرهای مختلفی برای ورود کلسیم به سیتوپلاسم وجود دارد. یکی از این مسیرها رهاسازی کلسیم به سیتوپلاسم از طریق گیرنده‌های موجود روی شبکه آندوپلاسمی است^[10, 14]. از این رو در مطالعه حاضر، سه گیرنده مهم که در ورود کلسیم به سیتوپلاسم دخیل هستند و همچنین کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، انتخاب شدند. این گیرنده‌ها شامل گیرنده متابوتروپیک گلوتامات (*mGluR1*)، گیرنده دوپامین (*D1*) و *ADPR* سیکلاز (*CD38*) هستند.

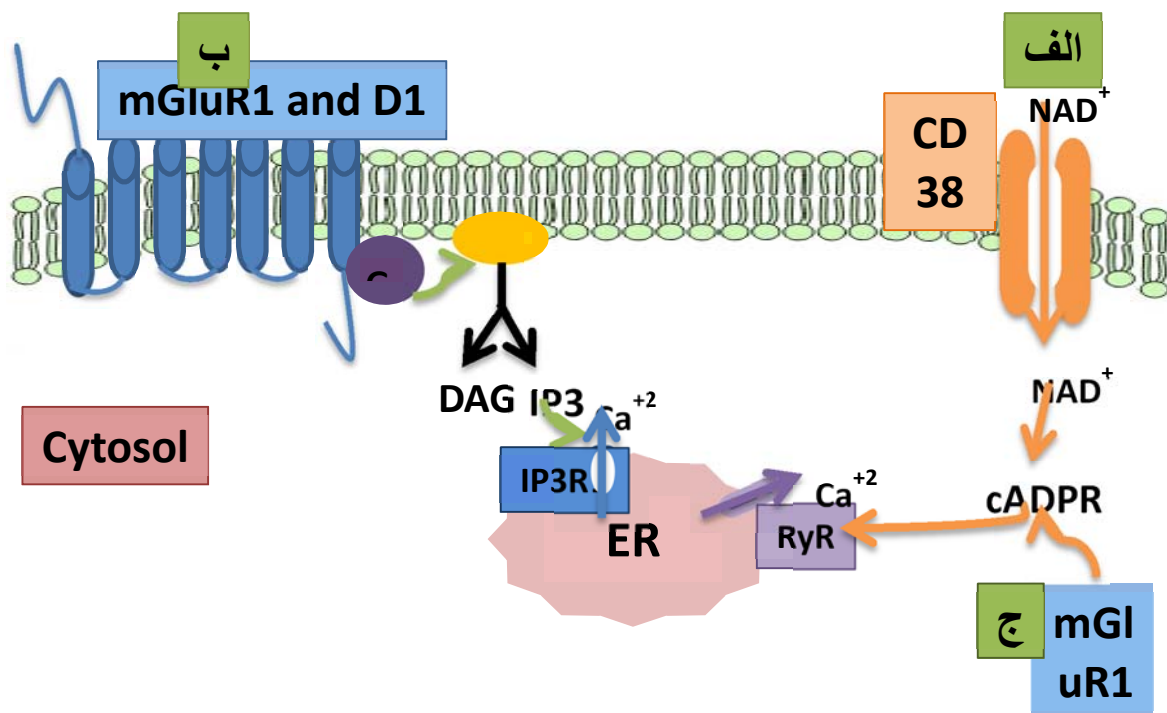
CD38 (خوشه تمایز ۳۸) که به‌عنوان سیکلیک *ADP* ریبوزهیدرولاز نیز شناخته می‌شود، یک گلیکوپروتئین است که روی سطح بسیاری از سلول‌های ایمنی یافت می‌شود^[16]. همچنین مطالعات نشان داده که این گلیکوپروتئین دارای سطح بیان فراوانی روی سلول‌های بافت عصبی است. *CD38* در چسبندگی سلول، انتقال سیگنال و سیگنالینگ کلسیم نقش دارد^[17]. *CD38* یک اکتوآنزیم چندعملکردی است که سنتز و هیدرولیز سیکلیک *ADP* ریبوز (*cADPR*) را از *NAD⁺* به *ADP* ریبوز و همچنین سنتز *NAADP* از *NADP⁺* کاتالیز می‌کند^[18]. این محصولات به‌ویژه *cADPR* نقش بسیار مهمی در هوموستازی کلسیم داخل سلولی از طریق گیرنده ریانودین (کانال کلسیم شبکه آندوپلاسمی در نورون‌ها) بازی می‌کنند (شکل ۱- الف) ^[19, 20].

گلوتامات، انتقال‌دهنده عصبی تحریکی است که در بافت مغز به‌فراوانی یافت می‌شود. این انتقال‌دهنده عصبی دو نوع گیرنده شامل گیرنده‌های یونوتروپیک و متابوتروپیک دارد. گیرنده‌های متابوتروپیک در سیستم عصبی مرکزی و محیطی انواع مختلفی از عملکردهای مهم را انجام می‌دهند که می‌توان به نقش آنها در یادگیری، حافظه، اضطراب و احساس درد اشاره کرد^[21]. این گیرنده‌ها در نورون‌های پیش و پس سیناپسی در سیناپس‌های هیپوکامپ، مخچه، قشر مغزی و همچنین سایر نقاط مغز و بافت‌های محیطی یافت می‌شوند^[22, 23]. گیرنده‌های متابوتروپیک گلوتامات به سه دسته تقسیم می‌شوند. دسته اول شامل گیرنده‌های *mGluR1* و *mGluR5* است که از طریق فسفولیپاز C و پروتئین *Gq* به متابولیسم *IP3* کوپل می‌شوند و به کمک گیرنده *IP3* که روی شبکه آندوپلاسمی قرار گرفته است، باعث رهاسازی کلسیم به داخل سیتوزول می‌شوند (شکل ۱- ب) ^[24-26]. همچنین *mGluR1* نقش مهمی در رهاسازی کلسیم از شبکه

like شامل گیرنده‌های *D1* و *D5* است که پس از اتصال دوپامین متعاقباً از طریق فسفولیپاز C و فعال‌سازی *IP3* باعث افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی می‌شوند (شکل ۱-ج) [31]. بنابراین با توجه به نقش *D1*، *mGluR1* و *CD38* در افزایش غلظت کلسیم سیتوپلاسمی و متعاقباً ایجاد تشنج، میزان بیان ژن‌های مذکور پس از کیندلینگ و پس از اعمال LFS توسط *real-time PCR* مورد بررسی قرار گرفت.

آندوپلاسمی از طریق مسیر *cADPR* و گیرنده ریانودین دارد (شکل ۱-ج) [27, 28].

گیرنده‌های دوپامین دسته‌ای از گیرنده‌های متصل به G-پروتئین هستند که در سیستم عصبی مرکزی مهره‌داران به فراوانی یافت می‌شوند [29, 30]. گیرنده‌های دوپامین با توجه به فعال‌شدن پیامبر ثانویه، فارماکولوژی و توالی همولوگ به دو زیرمجموعه شامل گیرنده‌های *D1-like* و *D2-like* تقسیم می‌شوند. زیرخانواده *D1-*



شکل ۱) مقایسه *CD38*، *mGluR1* و *D1* در اثر انتشار کلسیم از شبکه آندوپلاسمی؛ الف) سیگنالینگ آبخاری *CD38* برای رهاسازی کلسیم از طریق گیرنده ریانودین، ب) سیگنالینگ آبخاری *mGluR1* و *D1* برای رهاسازی کلسیم از طریق گیرنده *Gq* و *IP3*، ج) مداخله *mGluR1* در تولید *cADPR* و اثر آن بر رهاسازی کلسیم از طریق گیرنده ریانودین

مواد و روش‌ها جراحی حیوانات

در مطالعه تجربی حاضر، از رت‌های نر نژاد ویستار (۶-۵ هفته در زمان جراحی) به صورت جداگانه در قفس‌هایی با دمای اتاق 25°C - و یک دوره ۱۲ ساعته روشنایی/۱۲ ساعته تاریکی (نور از ۶:۰۰ صبح تا ۶:۰۰ بعد از ظهر) استفاده شد. حیوانات آب و غذا را به صورت مشابه دریافت کردند. تمام مراحل آزمایش و مراقبت از حیوانات مطابق دستورالعمل‌های بین‌المللی مورد استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام و توسط کمیته اخلاقی تحقیقات حیوانی دانشگاه تربیت مدرس تایید شد که مطابق با "راهنمای NIH برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی" است. همچنین سعی شد تا آیتم تلاش برای کاهش تعداد حیوانات مورد استفاده و رنج‌بردن آنها رعایت شود. در این مطالعه، رت‌ها به سه گروه شامل sham (یا کنترل)، full-kindle و full-kindle+LFS تقسیم شدند.

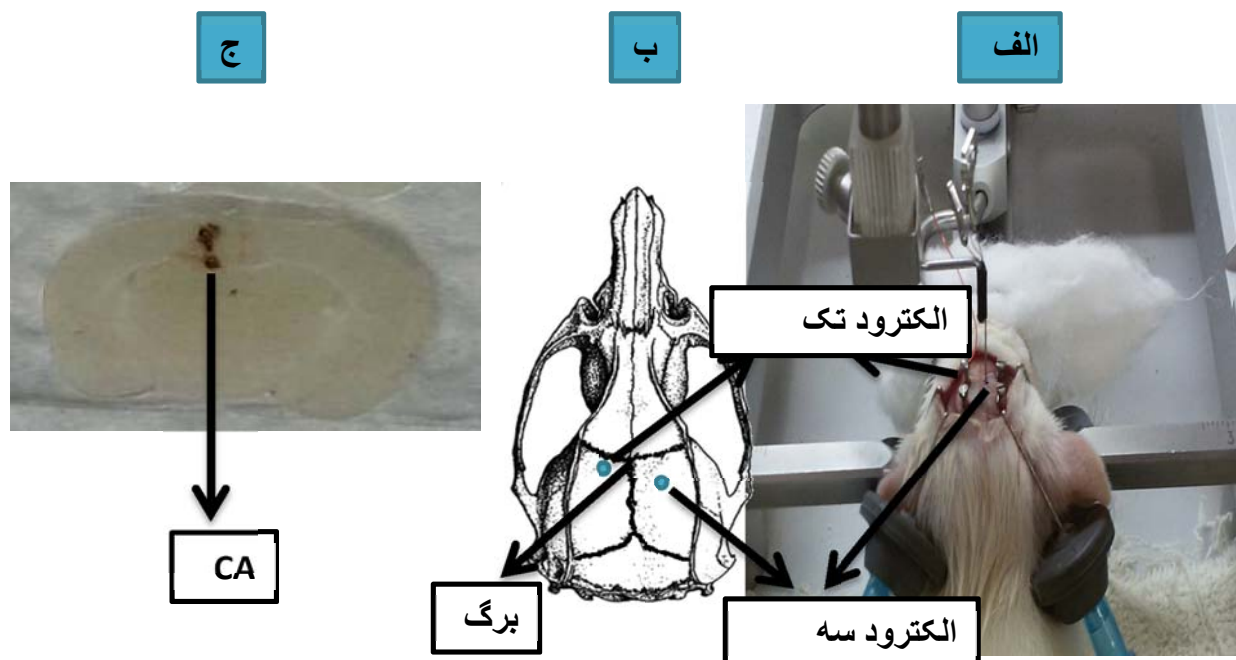
به منظور اعمال تحریک‌های الکتریکی، الکترودها از طریق جراحی stereotaxic به داخل CA1 هیپوکامپ هر سه گروه وارد شدند [32]. حیوانات با استفاده از مخلوطی از کتامین و زایلازین (سیگما؛ انگلستان) به میزان ۱۰/۱۰۰ کیلوگرم/میلی گرم و به صورت داخل صفاقی بیهوش و سپس حیوانات در stereotaxic ثابت و جراحی شدند (شکل ۲-الف). سپس یک الکترود تحریکی دوقطبی و یک الکترود ثبت‌کننده به هم پیچیده شدند (الکترود سه بعدی) و الکترود حاصل در ناحیه هیپوکامپ CA1 در نیم کره راست، در $2/4$ میلی‌متر خلفی و $1/8$ میلی‌متر جانبی برگما و $2/8$ میلی‌متر زیر جمجمه هر حیوان قرار گرفت [33]. همچنین یک الکترود تک‌قطبی متصل به پیچ فولادی ضدزنگ به عنوان الکترود مرجع در بالای جمجمه، در سمت چپ الکترود سه‌قطبی قرار گرفت (شکل ۲-الف).

کیندلینگ الکتریکی و LFS

پس از گذشت یک هفته دوره ریکاوری، گروه‌های دوم و سوم تحریک‌های الکتریکی را برای کیندل شدن دریافت کردند. در مطالعه

طرف بالا و پایین، کلونوس اندام جلویی طرف مقابل نسبت به محل تحریک، کلونوس اندام‌های جلویی دو طرف و ایستادن روی هر دو پا و ایستادن روی هر دو پا و افتادن حیوان طبقه‌بندی شدند [34].

حاضر از روش کیندلینگ سریع استفاده شد. در این روش حیوانات با یک مربع تک‌موج با طول پالس یک‌میلی‌ثانیه، فرکانس ۵۰ هرتز به مدت ۳ ثانیه تحریک شدند. رفتارهای تشنج براساس معیارهای راسین به پنج دسته شامل حرکات دهان و صورت، حرکت سر به



شکل ۲) موش صحرایی ثابت‌شده در stereotaxic و قراردادن الکترودها (الف)، تصویر شماتیک از محل قرارگیری الکتروده سه‌قطبی در CA1، الکتروده مرجع و برگما (ب)، تایید بافت‌شناسی از موقعیت الکتروده در محل CA1 هیپوکامپ (ج)

طراحی و در سایت NCBI به منظور چک کردن اختصاصیت پرایمرها بلاست و خریداری شدند (ماکروژن سئول، کره؛ جدول ۱). به‌منظور استخراج RNA از کیت ترایزول و برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آزما؛ ایران) استفاده شد. یک‌میکروگرم Total RNA، یک‌میکرولیتر پرایمر (Oligo (dT)، یک‌میکرولیتر رندوم‌هگزامر و یک‌میکرولیتر ترانس‌کریپتاز معکوس برای سنتز cDNA با تکنیک RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. در انتها برای انجام تکنیک real-time PCR، از دستگاه Step One-Real (RealQ time PCR system و کیت مسترمیکس سایبرگرین plus master mix green, ampliqon) استفاده شد. هر مخلوط واکنش حاوی یک‌میکرولیتر cDNA، یک‌میکرولیتر از هر پرایمر و ۱۲ میکرولیتر مسترمیکس بود و حجم نهایی مخلوط با آب استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. real-time PCR در یک چرخه با دمای ۹۵°C به مدت ۱۵ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه با دمای ۹۵°C به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۰-۶۰°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. از GAPDH به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد و برای بررسی تغییرات بیان ژن، ct مستخرج از نمودارهای real-time PCR در روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ مورد استفاده قرار گرفت [35]. سپس داده‌ها با نرم‌افزار GraphPad Prism 8 (La Jolla؛ ایالات متحده) تحلیل و به‌صورت میانگین آماری ارائه شدند.

تحریک‌ها در هر ۱۰ دقیقه یک بار و ۱۲ بار در روز تا زمان نشان‌دادن مرحله پنج تشنج تکرار شد. حیوان‌هایی که سه روز متوالی مرحله پنج تشنج را نشان دادند، به‌عنوان حیوان full-kindle در نظر گرفته شدند. در گروه‌هایی که می‌بایست LFS اعمال شود، ۱۵۰ ثانیه بعد از تحریکات کیندلینگ، ۴ بسته ۲۰۰ پالس مربعی (۱/۰ میلی‌ثانیه) به فاصله هر ۵ دقیقه با فرکانس یک‌هرتز و شدت آستانه تولید امواج تخلیه متعاقب اعمال و اثر آن بر کمیت‌های تشنجی بررسی شد. شدت آستانه امواج تخلیه متعاقب در این مطالعه بین ۳۰ تا ۲۵۰ میکروآمپر بود. ثبت امواج مغزی روی رایانه با استفاده از نرم‌افزار eTrace experiment 1.39 (موسسه پرتو دانش؛ ایران) و تحلیل برون‌خط (Offline analysis) آنها با استفاده از نرم‌افزار eTrace analysis 2 (موسسه پرتو دانش؛ ایران) در محیط ویندوز انجام شد.

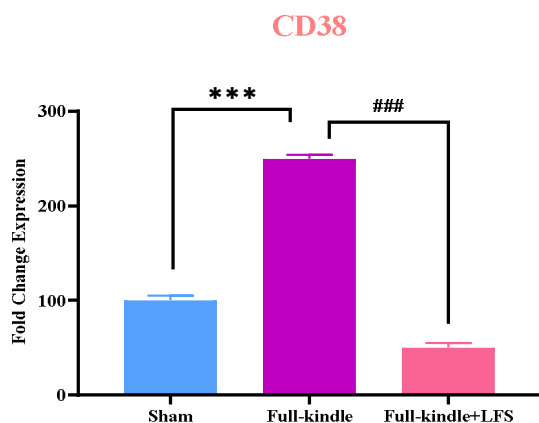
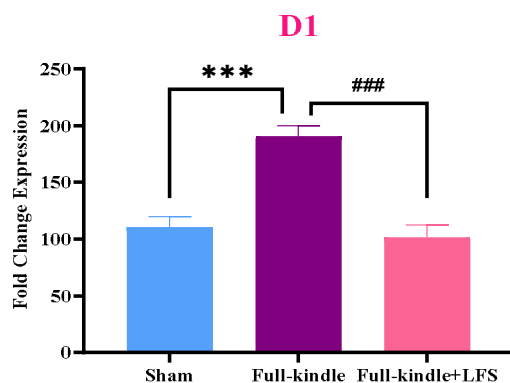
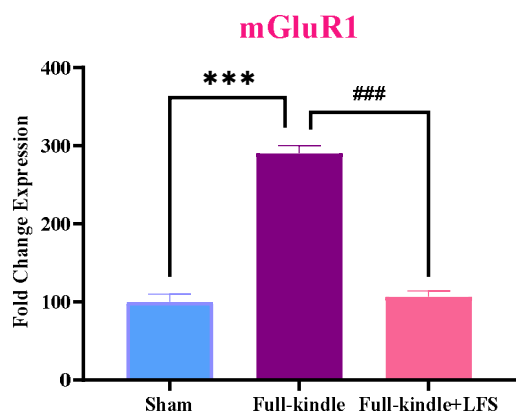
Real-time PCR

۲۴ ساعت پس از اتمام تحریک‌ها، حیوانات با استفاده از اتر بیهوش شدند و سر آنها نیز جدا شد. مغز به‌سرعت برداشته و بافت هیپوکامپ نیز به‌سرعت از سایر قسمت‌ها جدا و در دمای ۸۰°C- برای انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد. پرایمرهای اختصاصی برای گیرنده‌های گلوتامات‌متابوتروپیک ۱ (mGluR1)، دوپامین ۱ (D1) و ADPR سیکلاز (CD38) از طریق نرم‌افزار Prelpmrier

ارزیابی تغییر بیان ژنهای *mGluR1*، *D1*، و *CD38* پس از کیندلینگ الکتریکی و درمان با... ۴۱
جدول ۲) مقادیر ct حاصل از تکنیک Real-time PCR مربوط به ژنهای *D1*، *CD38*، *mGluR1* و *GAPDH* در سه گروه sham، full-kindle و full-kindle+LFS

اسم ژن	Sham	Full-kindle	Full-kindle+LFS
GAPDH	14/35±0/04	15/01±0/03	14/92±0/41
D1	25/02±0/01	24/75±0/24	25/57±0/26
CD38	23/12±0/10	22/44±0/21	24/71±0/33
mGluR1	24/64±0/21	23/75±0/34	25/11±0/08

داده‌های حاصل نشان‌دهنده افزایش قابل توجهی در بیان *mGluR1* پس از full-kindle شدن و کاهش قابل ملاحظه‌ای پس از اعمال LFS بود ($p < 0.05$ ، $n = 5$ ؛ نمودار ۱- الف).



نمودار ۱) اثر LFS بر بیان ژنهای مورد مطالعه پس از full-kindle شدن؛ الف) *mGluR1*، ب) *D1*، ج) *CD38*

جدول ۱) توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده برای Real-time PCR

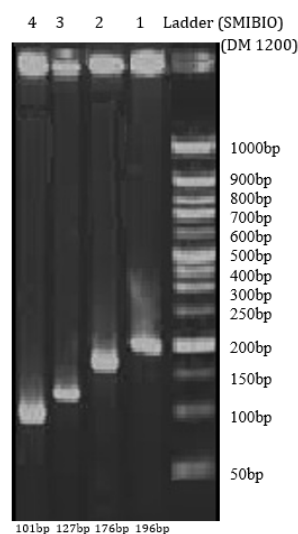
اسم ژن	توالی پرایمر	محصولات PCR (bp)
GAPDH	F: TCCCCATTCTTCCACCTTTGATGCT	101
	R: ACCCTGTTGCTGTAGCCATATTCAT	
mGluR1	F: AGGGTCAGATTAAGGTCATACGG	171
	R: CAAGATAACGGACAGGAATGGG	
D1	F: GGAGGACACCGAGGATGACAAC	196
	R: TCTGGCAATTCTTGGCATGGACTG	
CD38	F: TGCCTGATCTATACTCAAATCCTC	127
	R: GTGCGTAGTCTTCATTGGTG	

یافته‌ها

پس از انجام جراحی stereotaxic و قراردادن الکترودها، برای اطمینان از قرارگرفتن الکترود در CA1 هیپوکامپ، تایید بافت‌شناسی انجام شد (شکل ۲).

پس از اعمال تحریک‌های الکتریکی اولیه برای تعیین آستانه، تفاوت معنی‌داری بین تخلیه متعاقب (AD) آستانه بین گروه‌های full-kindle (۱۰/۳۱±۱۰/۴۴ میکروآمپر) و full-kindle+LFS (۸۰/۲۲±۱۱/۲۱ میکروآمپر) و مدت‌زمان تخلیه متعاقب (ADD) بین full-kindle (۱۸۷/۵۲±۱۴/۸۷ ثانیه) و full-kindle+LFS (۱۷۰/۶۴±۱۷/۱۹ ثانیه) مشاهده نشد. علاوه بر این اختلاف معنی‌داری در تعداد روز تحریک برای رسیدن به مرحله full-kindle+LFS بین گروه full-kindle (۸/۸±۱/۱ روز) و گروه full-kindle+LFS (۸/۸±۰/۷ روز) نبود.

برای بررسی میزان موفقیت PCR، محصولات آن روی ژل آگارز ۲٪ قرار گرفتند و مشاهده شد که برای هر کدام از ژن‌های طراحی‌شده تنها یک باند اختصاصی وجود دارد که حاکی از اختصاصی‌بودن نتایج PCR در نمونه‌های مورد بررسی است (شکل ۳). مقادیر ct حاصل از تکنیک real-time PCR ارایه شد (جدول ۲).



شکل ۳) تصویر ژل آگارز محصولات PCR مربوط به ژنهای *D1* (چاهک ۱)، *mGluR1* (چاهک ۲)، *CD38* (چاهک ۳) و *GAPDH* (ژن کنترل داخلی؛ چاهک ۴) و Ladder

انتقال‌دهنده‌های عصبی عمل می‌کند. در مطالعات فراوانی نیز به نقش اصلی کلسیم در ایجاد تشنج‌های صرعی اشاره شده است [7-9]. کاهش بیان *D1*، *mGluR1* و *CD38* پس از اعمال LFS ممکن است به دلیل نقش LFS در متعادل‌سازی غلظت کلسیم داخل سلولی، سیگنالینگ سلولی و شکل‌پذیری سیناپسی باشد. به عبارت دیگر تداخل LFS در تضعیف طولانی‌مدت (نوعی از شکل‌پذیری سیناپسی) از طریق کاهش کلسیم داخل سلولی ممکن است نقش به‌سزایی در فرآیند بهبودبخشی آن داشته باشد [37, 38].

نتیجه‌گیری

پس از کیندلینگ بیان هر سه ژن انتخابی به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند و بعد از اعمال تحریکات LFS میزان بیان هر سه ژن به مقدار کنترل برمی‌گردد. از این رو یکی از مسیرهایی که LFS برای بهبودبخشی تشنج‌های کیندلینگ مداخله می‌کند، ممکن است مربوط به مسیر ورود کلسیم به سیتوپلاسم باشد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به‌دلیل فراهم‌کردن امکانات آزمایشگاهی و حمایت مالی کمال تشکر را دارند.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- 1- Scott BW. Hippocampal neurogenesis in the kindling model of temporal lobe epilepsy [Dissertation]. Toronto: University of Toronto; 2013.
- 2- Van Nieuwenhuysse B. Hippocampal deep brain stimulation for drug resistant epilepsy in a rodent model [Dissertation]. Ghent: Ghent University; 2015.
- 3- DeGiorgio CM, Kralj SE. Neurostimulation for drug-resistant epilepsy. *Continuum*. 2013;19(3 Epilepsy):743-55.
- 4- Coffey RJ. Deep brain stimulation devices: A brief technical history and review. *Artif Organs*. 2009;33(3):208-20.
- 5- Prince DA. Neurophysiology of epilepsy. *Ann Rev Neurosci*. 1978;1(1):395-415.
- 6- Lossin Ch, Wang DW, Rhodes TH, Vanoye CG, George Jr AL. Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron*. 2002;34(6):877-84.
- 7- De Falco FA, Bartiromo U, Majello L, Di Geronimo G, Mundo P. Calcium antagonist nimodipine in intractable epilepsy. *Epilepsia*. 1992;33(2):343-5.
- 8- Schumacher TB, Beck H, Steinhauser Ch, Schramm J, Elger CE. Effects of phenytoin, carbamazepine, and gabapentin on calcium channels in hippocampal granule cells from patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 1998;39(4):355-63.
- 9- Speckmann EJ, Straub H, Köhling R. Contribution of calcium ions to the generation of epileptic activity and antiepileptic calcium antagonism. *Neuropsychobiology*. 1993;27(3):122-6.

همچنین مقدار بیان گیرنده دوپامین (*D1*) به‌طور قابل ملاحظه‌ای پس از *full-kindle* شدن افزایش پیدا کرد که با استفاده از اعمال LFS کاهش می‌یابد ($p < 0.01$, $n = 0$; نمودار ۱-ب).

داده‌های مربوط به میزان بیان *CD38* نشان داد که *full-kindle* شدن به‌طور قابل توجهی آن را افزایش می‌دهد و LFS به‌طور قابل توجهی بیان آن را کاهش می‌دهد ($p < 0.01$, $n = 0$; نمودار ۱-ج).

بحث

در مطالعه حاضر رت‌های مورد آزمایش از طریق تکنیک کیندلینگ الکتریکی تشنجی شدند و سپس برای بهبود، تحریکات LFS دریافت کردند. همه رت‌های مورد مطالعه شرایط یکسانی داشتند و تفاوت معنی‌داری بین آستانه تحریکات الکتریکی و مدت‌زمان *full-kindle* شدن مشاهده نشد که نشان‌دهنده این موضوع بود که تحریک‌پذیری و حساسیت تشنج در رت‌ها در آغاز آزمون مشابه یکدیگر بوده است.

در قسمت دوم مطالعه بررسی بیان گیرنده‌ها انجام شد. همان‌طور که در مطالعات دیگر هم مشاهده شده است، سه ژن مذکور پس از کیندلینگ افزایش بیان داشته‌اند، ولی تغییرات بیان آنها پس از اعمال LFS بررسی نشده است. مطالعه حاضر، مطالعه جامعی است که تاثیر LFS روی سه گیرنده مهم ورود کلسیم به داخل سلول را مورد بررسی قرار داد. LFS تکنیک درمانی جدیدی است و به‌تازگی توسط FDA به‌عنوان یک روش جدید برای درمان صرع مقاوم به دارو تایید شده است، اما مکانیزم اثر آن به‌خوبی روشن نشده و در حال حاضر هنوز هم تلاش‌های فراوانی برای روشن‌شدن مکانیزم اثر LFS در حال انجام است. از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر مقایسه بین LFS و کیندلینگ الکتریکی در تاثیر روی گیرنده‌های ورود کلسیم به داخل سلول انجام نشده بود، انجام این مطالعه ضرورت پیدا کرد. در مطالعات قبلی هر کدام از این گیرنده‌ها به‌صورت جداگانه در شرایط بروز تشنج بررسی شده و یا اینکه در طراحی داروهای ضد تشنج مهار این گیرنده‌ها را مورد هدف قرار داده بودند. اما در این مطالعه سه گیرنده مهم ورود کلسیم به داخل سلول انتخاب شد و میزان بیان گیرنده‌های مذکور پس از کیندلینگ الکتریکی و سپس اعمال LFS بررسی شد. میزان بیان ژن‌های *D1*، *mGluR1* و *CD38* پس از *full-kindle* شدن افزایش معنی‌داری پیدا کرد و پس از اعمال LFS کاهش قابل توجهی در بیان ژن‌ها مشاهده شد. کشف مکانیزم‌های سلولی که سیگنالینگ بین نورون‌ها را در نتیجه فعالیت‌های عصبی تقویت یا تضعیف می‌کند، همچنان یک هدف تحقیق اولیه در علوم اعصاب بوده است. گیرنده‌های *D1* و *mGluR1* که در بالادست *CD38* هستند و *CD38* باعث رهاسازی کلسیم از شبکه آندوپلاسمی به داخل سیتوپلاسم شده و غلظت آن را افزایش می‌دهند و در ادامه باعث ایجاد تشنج می‌شوند [19, 31, 36]. مشاهدات زیادی نشان می‌دهد که Ca^{2+} به‌عنوان یک فاکتور مهم در سیگنالینگ داخل سلولی شکل‌پذیری سیناپسی و همچنین به‌عنوان پیامبر ثانویه در رهاسازی

- 2001;38(3):277-85.
- 23- Chu Z, Hablitz JJ. Quisqualate induces an inward current via mGluR activation in neocortical pyramidal neurons. *Brain Res.* 2000;879(1-2):88-92.
- 24- Jeffrey Conn P. Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors. *Ann N.Y. Acad Sci.* 2003;1003(1):12-21.
- 25- Moldrich RX, Chapman AG, De Sarro G, Meldrum BS. Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy. *Eur J Pharmacol.* 2003;476(1-2):3-16.
- 26- Wong RK, Bianchi R, Chuang SC, Merlin LR. Group I mGluR-induced epileptogenesis: Distinct and overlapping roles of mGluR1 and mGluR5 and implications for antiepileptic drug design. *Epilepsy Curr.* 2005;5(2):63-8.
- 27- Neyman S, Manahan-Vaughan D. Metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) and 5 (mGluR5) regulate late phases of LTP and LTD in the hippocampal CA1 region in vitro. *Eur J Neurosci.* 2008;27(6):1345-52.
- 28- Foster WJ, Taylor HB, Padamsey Z, Jeans AF, Galione A, Emptage NJ. Hippocampal mGluR1-dependent long-term potentiation requires NAADP-mediated acidic store Ca^{2+} signaling. *Sci Signal.* 2018;11(558):eaat9093.
- 29- Rondou P, Haegeman G, Van Craenenbroeck K. The dopamine D4 receptor: Biochemical and signalling properties. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(12):1971-86.
- 30- Girault JA, Greengard P. The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol.* 2004;61(5):641-4.
- 31- Hasbi A, Fan T, Alijanian M, Nguyen T, Perreault ML, O'Dowd BF, et al. Calcium signaling cascade links dopamine D1-D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(50):21377-82.
- 32- Paxinos G, Watson Ch, Pennisi M, Topple A. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods.* 1985;13(2):139-43.
- 33- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: Hard cover edition. 6th Edition. Amsterdam: Elsevier; 2006.
- 34- 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.
- 35- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- 36- Rezaei M, Sadeghian A, Roohi N, Shojaei A, Mirnajafi-Zadeh J. Epilepsy and dopaminergic system. *Physiol Pharmacol.* 2017;21(1):1-14.
- 37- Chittajallu R, Alford S, Collingridge GL. Ca^{2+} and synaptic plasticity. *Cell Calcium.* 1998;24(5-6):377-85.
- 38- Bear MF, Malenka RC. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol.* 1994;4(3):389-99.
- 10- Kułak W, Sobaniec W, Wojtal K, Czuczwar SJ. Calcium modulation in epilepsy. *Pol J Pharmacol.* 2004;56(1):29-41.
- 11- Kudin AP, Kudina TA, Seyfried J, Vielhaber S, Beck H, Elger CE, et al. Seizure-dependent modulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2002;15(7):1105-14.
- 12- Rajasekaran K. Seizure-induced oxidative stress in rat brain regions: Blockade by nNOS inhibition. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005;80(2):263-72.
- 13- Nazıroğlu M, Övey İS. Involvement of apoptosis and calcium accumulation through TRPV1 channels in neurobiology of epilepsy. *Neuroscience.* 2015;293:55-66.
- 14- Arzimanoglou A, Hirsch E, Nehlig A, Castelnau P, Gressens P, De Vasconcelos AP. Epilepsy and neuroprotection: An illustrated review. *Epileptic Disord.* 2002;4(3):173-82.
- 15- Kamphuis W, Huisman E, Wadman WJ, Bergkamp FJ, Lopes Da Silva F. Transient increase of cytoplasmic calcium concentration in the rat hippocampus after kindling-induced seizures. An ultrastructural study with the oxalate-pyro-antimonate technique. *Neuroscience.* 1989;29(3):667-74.
- 16- Orciani M, Trubiani O, Guarnieri S, Ferrero E, Di Primio R. CD38 is constitutively expressed in the nucleus of human hematopoietic cells. *J Cell Biochem.* 2008;105(3):905-12.
- 17- Fernandez JE, Deaglio S, Donati D, Beusan IS, Corno F, Aranega A, et al. Analysis of the distribution of human CD38 and of its ligand CD31 in normal tissues. *J Biol Regul Homeost Agents.* 1998;12(3):81-91.
- 18- Chini EN, Chini CC, Kato I, Takasawa Sh, Okamoto H. CD38 is the major enzyme responsible for synthesis of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in mammalian tissues. *Biochem J.* 2002;362(1):125-30.
- 19- Higashida H, Salmina AB, Olovyanikova RY, Hashii M, Yokoyama Sh, Koizumi K, et al. Cyclic ADP-ribose as a universal calcium signal molecule in the nervous system. *Neurochem Int.* 2007;51(2-4):192-9.
- 20- Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev.* 2008;88(3):841-86.
- 21- Ohashi H, Maruyama T, Higashi-Matsumoto H, Nomoto T, Takeuchi Y. A Novel Binding Assay For Metabotropic Glutamate Receptors Using [3H] L-Quisqualic Acid And Recombinant Receptors. *Zeitschrift für Naturforschung C.* 2002;57(3-4):348-55.
- 22- Hinoi E, Ogita K, Takeuchi Y, Ohashi H, Maruyama T, Yoneda Y. Characterization with [3H] quisqualate of group I metabotropic glutamate receptor subtype in rat central and peripheral excitable tissues. *Neurochem Int.*