

اهمیت گیرنده‌های نوع ۲ گالانین طی اثرات مهارى تحريك با فرکانس پایین بر روند کیندلینگ مسير پرفورنت در موش صحرايی

مهدی صادق ^{M.Sc}، سید جواد میر نجفی زاده ^{Ph.D}، محمد جوان ^{Ph.D}،
يعقوب فتح اللهی ^{Ph.D}، علی جهانشاهی ^{M.Sc}

چکیده

هدف: در این تحقیق اهمیت گیرنده‌های نوع ۲ گالانین طی اثرات مهارى LFS بر بروز تشنجهای ناشی از کیندلینگ الکتریکی مسير پرفورنت مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها: حیوانات با تحريك مسير پرفورنت و با استفاده از پروتکل کیندلینگ سریع (۶ تحريك روزانه) تحريك می‌شدند. LFS (۶۰۰ پالس ۰/۱ میلی ثانیه با فرکانس ۱ و شدت ۵۰-۱۵۰ میکروآمپر) بلافاصله پس از قطع تحریکات کیندلینگ اعمال می‌گردید. M871 (۱ میکرومولار در موضع) آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های نوع ۲ گالانین، هر روز قبل از شروع پروتکل تحريك به داخل ژيروس دنداندار تزریق می‌شد و مراحل رفتاری تشنچ و مدت زمان تخلیه متعاقب ثبت می‌گردید. همچنین تغییرات بیان ژن گیرنده ۲ گالانین در ناحیه ژيروس دنداندار با استفاده از تکنیک Semi-quantitative RT-PCR در گروههای مختلف از حیوانات مورد بررسی قرار می‌گرفت.

یافته‌ها: تزریق M871 به داخل ژيروس دنداندار اثرات مهارى LFS بر روند کیندلینگ را به طور معنی داری کاهش داد. نتایج semi-quantitative RT-PCR نشان داد که میزان mRNA گیرنده نوع ۲ گالانین در ژيروس دنداندار بعد از اکتساب کیندلینگ به صورت معنی داری کاهش می‌یابد در حالیکه اعمال LFS جلوی این کاهش را می‌گیرد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که فعال شدن گیرنده‌های گالانین بوسیله گالانین درونزاد نقش مهمی به عنوان واسطه بخشی از اثرات مهارى LFS بر تشنجات ناشی از کیندلینگ مسير پرفورنت دارد. این نقش طی تشنجات کانونی عمدتاً از طریق GalR1 و طی تشنجات عمومی از طریق GalR2 اعمال می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تحريك الکتریکی با فرکانس پایین، Semi-Quantitative RT-PCR، تشنچ، گالانین، ژيروس دنداندار

مقدمه

می کند (۱۸ و ۱۷ و ۱۰). گالانین اثراتش را از طریق حداقل سه نوع گیرنده G- پروتئینی ایفا می کند که عبارتند از: GalR1, GalR2 و GalR3 (۱۹). GalR1 و GalR3 از طریق مهار آدنیلیل سیکلاز و باز کردن کانالهای پتاسیمی سبب بروز اثرات مهارتی می شود در حالیکه GalR2 از طریق افزایش کلسیم داخل سلولی و فعال کردن PLC عمل می کند (۲۰). گزارشهای زیادی مبنی بر نقش مهارتی گالانین در صرع وجود دارد (۲۴-۲۱)

در مطالعه قبلی ما نقش گیرنده های گالانین، با استفاده از M35 به عنوان آنتاگونیست غیر اختصاصی این گیرنده ها، به عنوان واسطه اثرات مهارتی LFS بر روند صرع زایی مشخص شده بود (۲۵). در این مطالعه میزان اهمیت گیرنده نوع ۲، با استفاده از آنتاگونیست اختصاصی گیرنده های نوع ۲ گالانین (M871)، را بر این اثرات مهارتی در مدل کیندلینگ مسیر پرفورنت مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش ها

جراحی و کیندل کردن حیوانات

در این تحقیق از موش صحرایی نر نژاد Wistar با وزن ۳۰۰-۲۷۰ گرم (خریداری شده از انیستیتو پاستور کرج) استفاده شد. بیهوشی توسط تزریق داخل صفاقی سدیم پنتوباریتال (۶۰ mg/kg) انجام می شد. پس از بیهوش کردن، حیوان درون دستگاه استریوتاکسی قرار می گرفت و با استفاده از اطلس Paxinos و Watson (۲۶) موقعیت مسیر پرفورنت (برحسب میلی متر: ۶/۹ عقبتر و ۴/۱ به سمت راست نسبت به برگما و ۳/۳ به سمت پایین نسبت به سطح استخوان جمجمه) و ژيروس دنداندار (برحسب میلی متر: ۳/۸ عقبتر و ۲/۰ به سمت راست نسبت به برگما و ۳/۲ به سمت پایین نسبت به سطح استخوان جمجمه) در سطح جمجمه علامت گذاری می شد. سپس با استفاده از مته دندانپزشکی، جمجمه در آن نقطه سوراخ شده، یک الکتروود دو قطبی در مسیر پرفورنت و یک الکتروود تک قطبی به همراه یک کانول (G23) در ژيروس دنداندار قرار داده می شد. دو الکتروود تک قطبی نیز به عنوان Earth و Differential توسط پیچ بر روی جمجمه قرار می گرفت. پس از بستن پیچ های لنگرگاه، حیوان برای ثبت به قفسه فارادی انتقال

با وجود همه پیشرفتهای صورت گرفته در زمینه درمان و کنترل بیماری صرع هنوز حدود ۳۰٪ تا ۴۰٪ بیماران صرعی به داروهای ضد صرع موجود مقاوم هستند. تحقیقات زیادی برای یافتن روش درمانی موثری برای این گروه از بیماران در حال انجام است (۱). طی سالهای اخیر اعمال تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین (Low-frequency Stimulation: ۱-۳ Hz)، نظیر آنچه باعث ایجاد تضعیف طولانی مدت (LTD) و تقویت زدایی (Depotentiation) در محیط *in vitro* می شود) در نواحی خاص از مغز به عنوان روش درمانی جدید برای این گروه از بیماران مورد استفاده آزمایشگاهی و کلینیکی قرار گرفته است (۴-۲).

هر چند مکانیسم هایی که LFS از طریق آنها اثرات ضد تشنجی خود را اعمال می کند هنوز روشن نشده است، اما شواهدی وجود دارد که بیان می کند LFS از طریق افزایش رهایش ترانسمیترهای مهارتی و نورومودولاتورها (مثل GABA، آدنوزین، دوپامین و...) اثرات مهارتی خود را اعمال می کند (۷-۵)

گالانین نوروپپتیدی متشکل از ۲۹ اسید آمینه (در انسان ۳۰ اسید آمینه) است که دارای توزیع گسترده ای در سیستم عصبی مرکزی و محیطی می باشد (۸ و ۹). این نوروپپتید به صورت کوترانسمیتر همراه با نوروترانسمیترهای اصلی (مثل گلوتامات و GABA) در پایانه های سیناپسی رها می شود و نقش مهمی در تنظیم بسیاری از اعمال فیزیولوژیک و پاتولوژیک از جمله صرع ایفا می کند (۱۰). مطالعات نشان داده است که گالانین یک نوروپپتید بسیار القاء پذیر است و به دنبال آسیبهای عصبی و بیماریهای نورودژنراتیو مزمن بیان آن سریعاً افزایش می یابد (۱۲ و ۱۱).

هیپوکامپ، به عنوان یک ساختار مهم در ایجاد و گسترش صرع لوب گیجگاهی، دارای ورودیهای گالانینرژیک فراوانی است که از سپتوم میانی و لوکوس سرولتوس منشأ می گیرند (۱۶-۱۳). فراوانی این نوروپپتید مهارتی و گیرنده هایش در هیپوکامپ بیانگر این است که گالانین در تعدیل فعالیت و تحریک پذیری این ناحیه نقش مهمی ایفا می کند. حاصل این اثرات مهارتی به صورت تضعیف حافظه، یادگیری و LTP و همچنین کاهش حملات صرعی بروز

تحریکات کیندلینگ LFS به مدت ۵۹۵ ثانیه در تمام فواصل بین تحریکات کیندلینگ به حیوان اعمال می‌شد و اثر آن بر کمیت‌های تشنجی بررسی می‌گردید. مشخصات LFS به صورت امواج مربعی تک فازی با فرکانس ۱ هرتز، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و به مدت ۲۰۰ ثانیه با شدت آستانه بود. در گروه‌هایی که LFS دریافت نمی‌کردند در تمام فواصل بین تحریکات سوکت روی سر حیوان قرار داشت.

کمیت‌های تشنجی اندازه‌گیری شده عبارت بودند از: ۱- مدت زمان تخلیه‌های متعاقب (Cumulative ADD): مجموع زمانهای تخلیه‌های متعاقب از شروع تحریکات تا کیندل شدن حیوان؛ ۲- مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه (Daily ADD) و ۳- تعداد روزهای لازم برای رسیدن به هر یک از مراحل پنجگانه تشنجی اندازه‌گیری میزان بیان GalR1 و GalR2 در ناحیه ژيروس دندانه دار هیپوکامپ.

۱- استخراج ژيروس دندانه دار: ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از آخرین تحریک، حیوانات برای استخراج ژيروس دندانه دار مورد استفاده قرار می‌گرفتند. بدین ترتیب که پس از بیهوشی خفیف با گاز دی‌اکسید کربن سر حیوان قطع می‌شد و پس از باز کردن پوست سر حیوان از ناحیه پشت، استخوان جمجمه شکسته و مغز حیوان استخراج می‌گردید سپس توسط برش ساژیتال نیمکره راست جدا می‌شود و بعد از تشخیص ناحیه هیپوکامپ، ناحیه ژيروس دندانه دار از آن جدا می‌شد و به یک میکروتیوپ استریل انتقال می‌یافت. نمونه‌ها پس از استخراج سریعاً به نیتروژن مایع (-170°C) انتقال داده می‌شدند و تا زمان استخراج RNA در این دما نگهداری می‌شدند.

۲- استخراج RNA: کل RNA موجود در بافت ژيروس دندانه‌دار با کمک محلول استخراج RNX+ (شرکت سیناژن) و بر اساس پروتکل کلروفورم-الکل استخراج می‌گردید. تمامی روند استخراج RNA بجز مواردی که نیاز به انکوبه کردن در دمای آزمایشگاه بود روی یخ انجام می‌گرفت. عمل سانتریفوژ همواره در دمای $+4^{\circ}\text{C}$ انجام می‌شد. پس از حل کردن رسوب پایانی حاصل از استخراج RNA، ۲ میکرولیتر آن برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده، روی ژل آگارز ۱٪ مورد استفاده قرار می‌گرفت همچنین ۱ میکرولیتر

می‌یافت. با استفاده از استیمولاتور، تحریک الکتریکی با شدت ۴۰۰ تا ۸۰۰ میکروآمپر از طریق الکترود تحریک به مسیر پرفورنت اعمال می‌گردید. در صورت قرار داشتن الکترودهای ثبت و تحریک در محل مناسب، پتانسیل تحریکی پس سیناپسی تجمعی (pEPSP) توسط نرم افزار ثبت می‌گردید. در غیر این صورت الکترودهای تحریک و ثبت آنقدر تغییر داد می‌شد تا pEPSP با حداکثر دامنه ثبت شود. سپس با سیمان دندانپزشکی الکترودها و پیچ روی جمجمه حیوان ثابت می‌شدند. پس از پایان کارگذاری الکترودها و کانولها، پین‌های متصل به الکترودها وارد مادگی سوکت مخابراتی می‌شد و سوکت بوسیله سیمان دندانپزشکی روی سطح جمجمه متصل می‌گردید. در پایان جراحی یک سر سوزن G30 به طول مناسب بریده می‌شد و در داخل کانول قرار می‌گرفت تا از انسداد آن جلوگیری کند.

حداقل ده روز پس از جراحی، از شدت آستانه برای تحریک حیوانات استفاده می‌شد. برای به دست آوردن شدت آستانه، ابتدا حیوان توسط جریانی به شدت ۳۰ میکروآمپر تحریک می‌گردید. در صورتیکه امواج تخلیه متعاقب (حداقل به مدت ۱۰ ثانیه) ثبت می‌شدند، این شدت جریان به عنوان شدت جریان آستانه شناخته می‌شد (۲۷) در غیر این صورت، با فواصل ۵ دقیقه‌ای شدت جریان هر بار ۱۰ میکروآمپر بیشتر می‌شد تا آستانه تحریک بدست آید. سپس حیوانات با شدت جریان آستانه تحریک می‌شدند تا مراحل مختلف تشنج را نشان دهند. این مراحل عبارت بودند از (۲۸): مرحله ۱، حرکات دهان و صورت؛ مرحله ۲، حرکت سر به بالا و پایین؛ مرحله ۳، کلونوس اندام جلویی طرف مقابل نسبت به محل تحریک؛ مرحله ۴، کلونوس اندام‌های جلویی دو طرف و ایستادن روی هر دو پا و مرحله ۵، ایستادن روی هر دو پا و افتادن حیوان.

برای تحریک حیوان از روش کیندلینگ سریع (Rapid kindling) استفاده می‌شد (۲۹). در این روش حیوانات با امواج الکتریکی با فرکانس بالا و امواج مربعی تک فازی با فرکانس ۵۰ هرتز، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و به مدت ۵ ثانیه و با شدت آستانه، تحریک می‌شدند. هر حیوان در هر روز ۶ بار (با فواصل ۱۰ دقیقه) توسط این امواج تحریک می‌شد. در گروهی از حیوانات که تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین (LFS) دریافت می‌کردند بلافاصله بعد از اتمام

ژل در دستگاه Gel documentation قرار می‌گرفت و تحت نور UV با زمان acquisition برابر ۰/۲ ثانیه از آن تصویر برداری می‌شد و تصویر بدست آمده ذخیره و دانسیته باندهای مورد نظر روی آن توسط نرم افزار Lab works اندازه گیری می‌گردید. برای هر نمونه تراکم باند مربوط به GalR2 نسبت به تراکم باند مربوط به β -Actin محاسبه می‌شد.

تزریق دارو

در این تحقیق از M871 (هدیه شده از طرف Dr. Ulla Sollenberg آزمایشگاه Professor U. Iangel، گروه نوروشیمی دانشگاه استکهلم) به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده‌های گالانین نوع ۲ (GalR2) استفاده شد. M871 با دوز ۱ میکرو مولار بکار برده شد (۳۰). از محلول نرمال سالین بعنوان حلال هر دو دارو استفاده گردید و pH محلول با استفاده از pH متر و HCl یک نرمال، بین ۷/۳ تا ۷/۴ تنظیم می‌شد. همچنین از محلول نرمال سالین که pH آن تنظیم شده بود، به عنوان محلول شاهد استفاده می‌شد.

برای تزریق دارو به داخل ژيروس دنداندار، از لوله پلی اتیلنی PE-20 (شرکت Stoelting، امریکا) که یک سر آن به سرسوزن ۳۰ G و سر دیگر آن به سرنگ‌های ۱۰ میکرو لیتر متصل بود، استفاده گردید. قبل از تزریق دارو، لوله و سرسوزن با نرمال سالین استریل شستشو داده می‌شدند. سپس سرنگ‌های ۱۰ میکرو لیتر متصل محل مخصوص روی پمپ تزریق (Pump Microsyring) شرکت Stoelting، امریکا) قرار می‌گرفت و دارو با سرعت ۰/۵ μ l / ۵ min به حیوان تزریق می‌شد، سپس حیوان برای اجرای پروتکل تحریک به قفس فارادی انتقال می‌یافت.

گروه‌های آزمایشی

در آزمایش اول برای بررسی تاثیر LFS بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت سه گروه آزمایشی مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه اول حیوانات فقط تحریکات با فرکانس ۱ Hz دریافت می‌کردند. در گروه دوم حیوانات فقط تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند و در گروه سوم حیوانات در فواصل بین تحریکات کیندلینگ، تحریکات با فرکانس ۱ Hz دریافت می‌کردند.

در آزمایش دوم برای بررسی اثرات LFS بر میزان بیان ژن گیرنده‌های

آن برای بررسی کمی استخراج، به کمک اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار می‌گرفت، بقیه RNA استخراج شده بعد از افزودن ۱ میکرو لیتر RNAsinhibitor در دمای 70°C - نگهداری می‌گردید. ۳- سنتز cDNA: در این مرحله از روی تمام mRNAهای موجود در نمونه استخراج شده، cDNA سنتز می‌شد. سنتز DNA، با کمک آنزیم نسخه برداری معکوس و پرایمر Oligo-dt انجام می‌شد. برای مهار آنزیم مداخله گر RNase، به واکنش RNasin (مهاری RNase) اضافه می‌شد.

۴- واکنش PCR: به منظور تکثیر قطعه ای از cDNA مربوط به ژنهای GalR1، GalR2 و b-اکتین از واکنش زنجیره ای پلیمرز Taq (PCR) استفاده می‌شد. فرآیند PCR با کمک آنزیم پلیمرز Taq و پرایمرهای اختصاصی پیشرو و معکوس برای هر ژن انجام می‌گرفت. برای هر قطعه مورد نظر، یک واکنش PCR جداگانه در حجم ۵۰ μ l استفاده می‌گردید. برای هر نمونه، واکنشهای PCR با کمک Master mix تهیه می‌شد و در هر واکنش پرایمرهای مربوط به یکی از ژنهای b-اکتین، GalR1 یا GalR2 استفاده می‌گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای هر ژن در جدول ۱-۳ آورده شده است.

۵- بهینه سازی شرایط واکنش PCR: برای بهینه سازی شرایط واکنش PCR، از تعداد سیکل مناسب استفاده می‌شد تا سیگنال مربوط به تراکم باند محصول PCR اولاً قابل رؤیت بوده و ثانیاً وارد فاز اشباع منحنی تکثیر محصول PCR نگردد. میزان غلظتهای مناسب cDNA، dNTP، Mg^{++} و پرایمرهای R و F جهت انجام بهینه واکنش PCR هر کدام توسط آزمایشهای جداگانه تنظیم می‌شد.

۶- الکتروفورز نمونه‌ها: ۱۰ میکرو لیتر از محصول هر واکنش پس از مخلوط شدن با ۲ میکرو لیتر بافر مخصوص (Loading buffer) به چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد اضافه می‌شدند. در دو طرف نمونه‌ها، دو نمونه از DNA Ladder با فواصل تفکیک ۱۰۰ bp اضافه می‌شدند. الکتروفورز به مدت ۵۰ دقیقه با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت و در دمای آزمایشگاه انجام می‌شد. ژل مورد استفاده در هنگام ساخت به اتیدیوم بروماید آغشته می‌گردید. پس از پایان الکتروفورز،

بررسی قرار می‌گرفت. در همه آزمایشها، فقط موشهایی که جایگاه الکتروود و کانول درست بود، مورد ارزیابی نهایی قرار می‌گرفتند.

روش تجزیه و تحلیل آماری

تفاوت آماری در میزان امواج تخلیه متعاقب طی روند صرع زایی بین گروههای آزمایشی توسط آزمون تجزیه و تحلیل واریانس از نوع Repeated Measures و آزمون LSD محاسبه گردید. برای مقایسه وقوع مراحل ۵ گانه تشنجی بین گروههای آزمایشی نیز از آزمون غیرپارامتریک Kruskal-Wallis استفاده شد. برای بررسی تغییرات سطح mRNA مربوط به GalR2 بین گروههای آزمایشی میانگین نسبت تراکم باندهای GalR2 به β -Actin برای هر گروه محاسبه شد و توسط آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یکطرفه و آزمون LSD مقایسه صورت می‌گرفت. داده‌ها به صورت (میانگین \pm خطای معیار میانگین) ارائه شده اند و $P < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

نتایج

آزمونهای بافت شناسی نشان داد که محل الکتروود و کانول در ژيروس دنداندار می‌باشد. همچنین با استفاده از رنگ آمیزی نیسل مشاهده شد که اعمال تحریکات کیندلینگ و LFS سبب تخریب ساختاری در محل تحریک و یا تزریق نمی‌شود. میانگین ADD پس از اولین تحریک در گروه اول (که فقط تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند) $15/33 \pm 0/84$ ثانیه و در گروه دوم (که حیوانات در فواصل بین تحریکات کیندلینگ، تحریکات با فرکانس پایین نیز دریافت می‌کردند) $16/33 \pm 0/49$ ثانیه بود که از نظر آماری تفاوت معنی داری نداشتند ($P < 0/1$). بعلاوه، میانگین شدت تحریکات آستانه برای شروع تخلیه‌های متعاقب در گروههای مختلف نیز تفاوت معناداری را با هم نشان نداد ($P < 0/1$) و این بدان معناست که در حیوانات دو گروه تفاوت معنی داری در استعداد ابتلا به تشنج وجود نداشت.

تأثیر LFS بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت

آزمون تجزیه و تحلیل واریانس و آزمون LSD نشان داد که تحریک

نوع ۱ و ۲ گالانین گروههای ۱ تا ۳ آزمایش اول بصورت مجدد تکرار می‌شد. حیوانات ۲۰ تا ۲۴ ساعت پس از دریافت آخرین تحریک با گاز CO_2 بیهوش، مغز آنها با دقت خارج و ژيروس دنداندار برای بررسی بیان ژن گیرنده‌های نوع ۱ و ۲ گالانین استخراج شد. بعلاوه یک گروه حیوان که جراحی شده اند و الکتروود و کانول گذاری شده اند (بدون دریافت تحریک الکتریکی) بعنوان گروه شاهد به این آزمایش اضافه شد. از آنجا که تعداد روزهای تحریکی لازم برای کیندل شدن (رسیدن به مرحله ۵ تشنج) در گروه Kindled (آزمایش اول) برابر با 9 ± 1 بود بنابراین نمونه‌های بافتی مورد نیاز برای این آزمایش پس از روز نهم تحریک تهیه می‌شدند.

در آزمایش سوم برای بررسی نقش گیرنده نوع ۲ گالانین طی اثرات مهار LFS بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت، چهار گروه آزمایشی مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه اول به حیوانات هر روز ابتدا نرمال سالین تزریق می‌شد و سپس در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می‌گرفتند. در گروه دوم به حیوانات هر روز ابتدا نرمال سالین تزریق می‌شد و سپس این حیوانات تحریکات کیندلینگ به همراه LFS دریافت می‌کردند. در حیوانات گروه سوم هر روز ابتدا M871 (با دوز ۱ mM) به داخل ژيروس دنداندار تزریق می‌شد و سپس آنها در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می‌گرفتند. به حیوانات گروه چهارم هر روز ابتدا M871 (با دوز ۱ mM) تزریق می‌شد و سپس تحریکات کیندلینگ به همراه LFS دریافت می‌کردند. تعداد حیوانات در هر گروه حداقل ۶ بود.

تأیید بافت شناسی

پس از پایان هر آزمایش جهت اطمینان از قرار داشتن الکتروود و کانول در جایگاه صحیح، به محل الکتروود ثبت و کانول رنگ Blue Methylen ($0/5 \mu l/min$) تزریق و محل الکتروود تحریک نیز با جریان الکتریکی مستقیم با شدت ۱ mA و مدت ۵ ثانیه تخریب می‌گردید. سپس مغز حیوانات خارج و در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده می‌شد. آنگاه از محل الکتروود و کانول برش گیری به عمل می‌آمد تا محل الکتروود و کانول مشخص شود. علاوه بر این با انجام رنگ آمیزی نیسل، میزان تخریب نورونی در محل ثبت مورد

تا پانزدهم بود ($P < 0/01$).

تزیق M871 در گروه "Kindled+LFS+M871" اثرات کاهش داری بر تعداد روزهای لازم برای رسیدن به مراحل ۳ تا ۵ رفتاری تشنج را نسبت به گروه "سالین+LFS+Kindled" به طور معنی داری کاهش داد ($P < 0/01$) (شکل ۱-ب).

نتایج بررسی اثرات LFS بر میزان بیان ژن گیرنده های نوع ۱ و ۲ گالانین

کیفیت RNA استخراج شده با قرار دادن نمونه ۲ میکرولیتری از محصول استخراج بر روی ژل آگاروز ۱٪ تایید می شد. تشکیل دو باند RNA ریپوزومی ۱۸S و ۲۸S در روی ژل نشان دهنده عدم ایجاد شکستگی و آسیب در ساختار RNA می باشد. بعلاوه در آزمایش غلظت سنجی RNA، نسبت به دست آمده برای طول موجهای ۲۶۰ A/۲۸۰ A در محدوده ۱/۸ تا ۲ بود که نشان دهنده درجه خلوص قابل قبول RNA بود.

بهینه سازی تعداد واکنش PCR: بررسی نمونه های حاصل از واکنش PCR در سیکلهای ۲۸، ۳۰، ۳۲، ۳۴ و ۳۶ روی ژل آگاروز ۱٪ نشان داد که سیکل ۳۴ مناسب ترین سیکل جهت بررسی تغییرات میزان mRNA گیرنده های نوع ۲ گالانین است بطوریکه باندها به خوبی قابل رویت بودند. بعلاوه واکنش به مرحله اشباع وارد نمی شد. همچنین استفاده از مقادیر ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میکرولیتر cDNA ورودی در واکنش PCR نشان داد که مقدار ۳ میکرولیتر cDNA ورودی برای بررسی تغییرات سطح mRNA مناسب می باشد.

تغییرات بیان ژن گیرنده نوع ۲ گالانین: اندازه گیری میزان mRNA گیرنده نوع ۲ گالانین در ژيروس دنداندار سمت راست، با استفاده از تکنیک Semi-quantitative RT-PCR کاهش معناداری را در میزان mRNA گیرنده نوع ۲ گالانین در ژيروس دنداندار حیوانات گروه Kindled (که تنها تحریکات کیندلینگ دریافت می کردند) نسبت به گروه کنترل (حیواناتی که فقط جراحی شده و الکتروود و کانول در مسیر پرفورنت و ژيروس دنداندار قرار می گرفت اما هیچگونه تحریکی دریافت نمی کردند) نشان داد ($P < 0/05$). بعلاوه نتایج نشان داد که اعمال تحریکات LFS بدنبال تحریکات کیندلینگ (گروه "Kindled+LFS") از کاهش میزان mRNA

الکتریکی مسیر پرفورنت توسط LFS در فواصل بین تحریکات کیندلینگ کاهش معنی داری در مجموع تخلیه های متعاقب روزانه نسبت به گروه اول نشان می دهد ($P < 0/01$) (شکل ۱-الف؛ برای محاسبه مدت زمان تخلیه های متعاقب روزانه ADD های بدست آمده پس از ۶ تحریک روزانه با هم جمع می شد). بعلاوه، مجموع کل تخلیه های متعاقب از روز اول تا روز نهم در گروه دریافت کننده LFS نسبت به گروه اول کاهش معنی داری را نشان داد و از $1698/60 \pm 46/60$ ثانیه به $1367/40 \pm 52/00$ ثانیه رسید ($P < 0/01$).

استفاده از آزمون Mann-Withney کاهش معنی داری را در بروز مراحل رفتاری ۴ و ۵ تشنجی در گروه LFS نسبت به گروه اول نشان داد. بعلاوه تعداد روزهای تحریکی لازم برای رسیدن به این مراحل را افزایش داد ($P < 0/01$) (شکل ۱-ب)؛ در حالیکه در تعداد روزهای تحریکی لازم برای رسیدن به مراحل ۱ تا ۳ تغییر معناداری ایجاد نکرد.

نتایج تزیق M871 به داخل ژيروس دنداندار

تزیق M871 با دوز ۱ میکرومولار تغییرات معنی داری در کمیتهای تشنجی گروه "Kindled+M871" (که هر روز به دنبال تزیق دارو در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می گرفتند) نسبت به گروه "سالین+Kindled" (که ابتدا سالین دریافت می کردند و سپس در معرض تحریکات کیندلینگ قرار می گرفتند) ایجاد نکرد. اما تزیق آن در گروهی که تحریکات کیندلینگ و LFS دریافت می کردند "Kindled+LFS+M871" از کاهش کمیتهای تشنجی توسط LFS جلوگیری کرد. در گروه "Kindled+LFS+M871" تزیق دوز ۱ میکرومولار M871 افزایش معنی داری در مجموع تخلیه های متعاقب روزانه نسبت به گروه "سالین+LFS+Kindled" ایجاد کرد ($P < 0/01$) (شکل ۱-الف). همچنین مجموع تخلیه های متعاقب (cADD) از روز اول تا روز پانزدهم در این دو گروه تغییرات معناداری را نشان داد ($P < 0/01$). با این وجود cADD در این دو گروه از روز اول تا روز نهم تفاوت معناداری را نشان نداد. به عبارتی از روز دهم به بعد M871 توانست جلوی اثرات مهارتی LFS بر پیشرفت کیندلینگ را بگیرد و تفاوت معنادار مربوط به روزهای دهم

نمی توانست تخریب نورونی ایجاد کند.

مشخص شده است که LFS می تواند سبب تغییر غلظت بعضی از نورومودولاتورها و نوروترانسمیترها در مغز شود. به عنوان مثال، اعمال LFS در برش های زنده هیپوکامپ باعث آزاد شدن آدنوزین می گردد (۵) همچنین گزارش شده است که اعمال طولانی مدت LFS تغییراتی را در میزان رسپتور باندینگ گیرنده های بنزودیازپینی و اپیوئیدی μ ایجاد می کند (۶). احتمال دارد که LFS از طریق ایجاد تغییراتی مشابه آنچه که ذکر شد، در نهایت سبب تقویت سیستم های مهار می شود. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که مهار گیرنده های گالانین (که یک نوروپپتید مهار می در مغز است (۳۵) باعث کاهش اثرات مهار می شود. بنابراین، می توان این احتمال را مطرح نمود که فعالیت گیرنده های گالانین مسئول حداقل بخشی از اثرات ضد تشنجی LFS می باشد.

مطالعات گذشته توزیع گسترده گیرنده های گالانین را در هیپوکامپ و ژيروس دنداندار و اثرات ضد تشنجی این گیرنده ها را نشان داده است (۱۲ و ۱۵) همچنین بررسی های مختلف در محیط *in vitro* و *in vivo* نشان می دهد که گالانین به عنوان یک ضد تشنج درونزاد قوی از انتهای فیبرهای نورآدرژیک ورودی به هیپوکامپ آزاد می شود و از طریق تضعیف تقویت سیناپسی و یا کاهش رهایش نوروترانسمیترهای تحریکی نظیر گلوتامات باعث اثرات ضد تشنجی می شود (۳۷-۳۵ و ۱۷ و ۱۰). بررسی های مختلف نشان می دهد که گالانین یک مهار کننده موثر LTP در هر دو محیط *in vitro* و *in vivo* است (۳۶ و ۳۵ و ۱۰). مطالعه روی برش های هیپوکامپ موشهایی که ژن گالانین آنها حذف شده بود نشان داد که رهایش گلوتامات از پایانه های سیناپسی آنها ۶ تا ۹ برابر افزایش می یابد. بعلاوه، پایانه های سیناپسی در برش های هیپوکامپ موشهایی که دچار افزایش بیان ژن گالانین شده بودند قادر به رهایش گلوتامات نبودند (۴۰-۳۸ و ۲۴) که تایید می کند گالانین از طریق مهار رهایش گلوتامات مانع از تقویت سیناپسی می شود. بنابراین گالانین می تواند به عنوان یک ماده ضد تشنجی درونزاد در بعضی شرایط وارد عمل شود. نتایج حاصل از مطالعه قبلی ما نشان داد که اگر طی روند کیندلینگ قبل از اعمال LFS هر روز به حیوانات M35 (به عنوان آنتاگونیست غیر اختصاصی گیرنده های گالانین) (۴۰) تزریق شود و

گیرنده نوع ۲ گالانین جلوگیری می کند و سطح mRNA در این گروه تغییرات معناداری با گروه کنترل نشان نداد. بعلاوه اعمال تحریکات LFS به تنهایی و بدون اعمال تحریکات کیندلینگ (گروه LFS) تغییر معناداری را در میزان mRNA گیرنده نوع ۲ گالانین ایجاد نکرد (شکل ۲).

نتایج این تحقیق نشان داد که گیرنده نوع ۱ گالانین، در ژيروس دنداندار، در سطح قابل ردیابی با تکنیک مورد استفاده بیان نمی شود.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این تحقیق اهمیت گیرنده نوع ۲ گالانین را طی اثرات مهار می LFS بر بروز تشنجهای ناشی از کیندلینگ الکتریکی مسیر پرفورنت نشان داد. بررسی توسط Semi-quantitative RT-PCR نشان داد که کیندلینگ سبب کاهش بیان گیرنده های نوع ۲ گالانین می شود در حالیکه LFS این کاهش بیان را مهار می کند.

مطالعات گذشته نشان داده بود که به کار بردن LFS (با فرکانس ۱ Hz و به مدت ۱۵ دقیقه) بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ، سبب تاخیر و حتی مهار روند صرع زایی می شود. بعلاوه این اثرات با افزایش آستانه تشنجی همراه بود (۳۴-۳۱ و ۴ و ۳). بنابراین احتمالاً LFS به نحوی تحریک پذیری نورونها را کاهش می دهد. با این وجود مکانیسم اثرات LFS هنوز نامشخص است. یافته های ما اثرات مهار می LFS بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت را نشان داده است و برای اولین بار این احتمال را مطرح می کند که گالانین را می توان بعنوان یکی از واسطه های اثرات مهار می LFS در نظر گرفت زیرا مهار غیر اختصاصی گیرنده های گالانین در ژيروس دنداندار اثرات مهار می LFS بر روند کیندلینگ را به صورت معنی داری کاهش می دهد.

در این تحقیق LFS با مدت پالس ۱ میلی ثانیه و شدتی برابر شدت آستانه تحریکات کیندلینگ اثرات مهار می بر روند کیندلینگ داشت. این تاثیر مهار می نمی تواند ناشی از تخریب نورونی بوسیله LFS باشد زیرا مطالعات بافت شناسی تخریب نورونی مشخصی را نشان نداد. حجم داروی تزریق شده در ناحیه ژيروس دنداندار نیز ۰/۵ میکرولیتر بود که با سرعت ۰/۱ میکرولیتر در دقیقه تزریق می شد و

۲ را می‌گیرد. این داده‌ها ممکن است نشان دهنده اهمیت وجود این گیرنده‌ها در ایجاد اثرات ضد تشنجی LFS باشد. در واقع حداقل بخشی از اثرات ضد تشنجی LFS از طریق فعال کردن گیرنده‌های گالانین و شاید افزایش رهایش گالانین درونزاد صورت می‌گیرد. از سوی دیگر داده‌های ما نشان داد که مهار گیرنده‌های گالانین اثرات معنی داری در گروه‌هایی که تنها تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند نداشت. این نتایج با نتایج قبلی در تشنجات ایجاد شده با پیلوکارپین مطابقت نداشت که ممکن است به علت تفاوت در مدل‌های ایجاد کیندلینگ باشد و همچنین تفاوت در نژاد حیوانات مورد استفاده باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که گیرنده نوع ۱ گالانین، در ژيروس دنداندار، در سطح قابل ردیابی با تکنیک مورد استفاده بیان نمی‌شود. گزارش‌هایی قبلی نیز بیان می‌کنند که گیرنده نوع ۲ در ژيروس دنداندار توزیع بیشتری دارند در حالیکه گیرنده‌های نوع ۱ عمدتاً در سلول‌های هرمی ناحیه CA1 و CA3 متراکم شده اند و میزان بیان آن در ژيروس دنداندار بسیار کم است (۴۱). در هر حال با استفاده از تکنیک Real Time-PCR گیرنده نوع ۱ گالانین در ژيروس دنداندار ردیابی و گزارش شده است که بیان آن طی کیندلینگ دچار تغییرات معناداری نمی‌شود (۲۱، ۲۲ و ۳۹). تفاوت تکنیک مورد استفاده برای ردیابی میزان بیان گیرنده و همچنین تفاوت در نژاد موشهای صحرایی مورد استفاده ممکن است علت تفاوت مشاهدات باشد.

بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت که گیرنده‌های گالانین بویژه گیرنده‌های نوع ۲ گالانین می‌توانند به عنوان واسطه بخشی از اثرات مهاری LFS بر تشنجات ناشی از کیندلینگ مسیر پرفورنت عمل کنند. اما بجز گالانین عوامل دیگری هم می‌توانند در اعمال اثرات مهاری LFS نقش داشته باشند که برای شناسایی این عوامل و مکانیسم‌های اثر ضد تشنجی LFS به مطالعات بیشتری نیاز است.

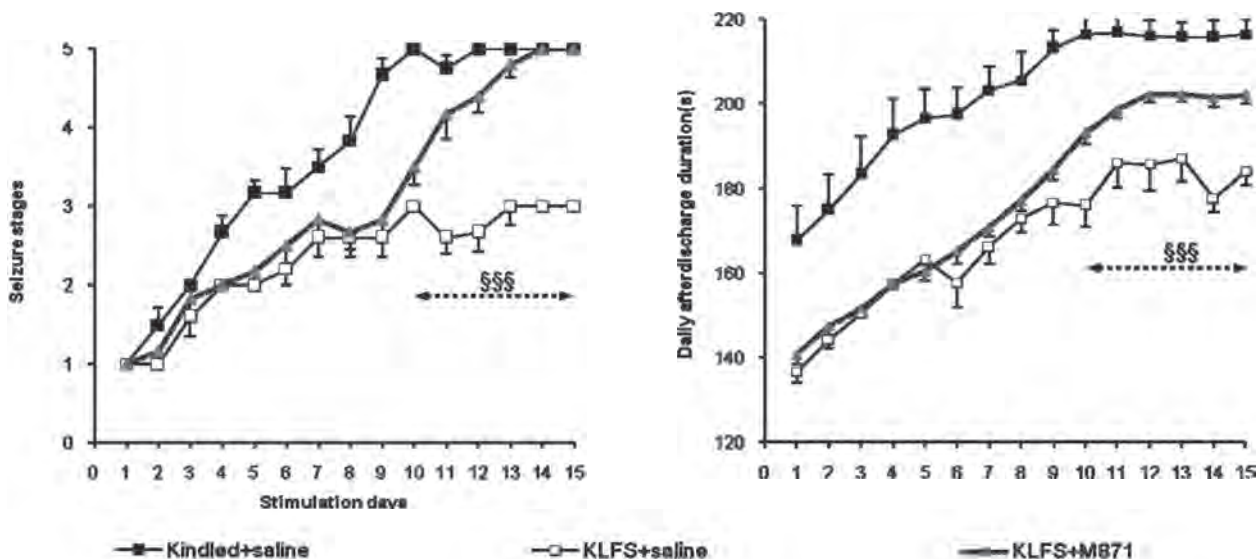
در نتیجه جلوی فعالیت گیرنده‌های گالانین گرفته شود، اثرات ضد تشنجی LFS کاهش می‌یابد.

گالانین در سیستم عصبی مرکزی حداقل از طریق سه گیرنده متصل به پروتئین‌های GalR1، GalR2، G- GalR3 و GalR3 عمل می‌کند. مشخص شده است که از بین این سه گیرنده تنها نوع ۱ و ۲ در هیپوکامپ بیان می‌شوند. همچنین نشان داده شده است که توزیع گیرنده نوع ۱ در سلول‌های هرمی هیپوکامپ فراوان است در حالیکه گیرنده نوع ۲ در ژيروس دنداندار فراوانی بیشتری دارد.

در این تحقیق برای تعیین نقش گیرنده نوع ۲ در اثرات مهاری LFS از M871، پپتیدی تازه ساخته شده ای که حدود ۳۰ بار تمایل بیشتری برای اتصال به گیرنده نوع ۲ دارد (۳۰) بعنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده نوع ۲، استفاده شد. همانطور که در شکل ۴-۶ نشان داده شده M871 طی ده روز ابتدای روند کیندلینگ تاثیر معنی داری بر مهار اثرات LFS ندارد در حالیکه از روز ۱۰ به بعد به صورت معنی داری سبب مهار اثرات LFS می‌شود. با توجه به اینکه در این تحقیق گروه‌های دریافت کننده LFS به همراه تحریکات کیندلینگ تقریباً در روز دهم به مرحله ۳ می‌رسیدند. شاید بتوان گفت که طی دوره کانونی شدن تشنج (مراحل ۱ تا ۳) گیرنده نوع ۲ تاثیر چندانی در بروز اثرات مهاری LFS ندارند اما در دوره عمومی شدن تشنج (مراحل ۴ و ۵) نقش عمده گالانین در مهار اثرات ضد تشنجی LFS به واسطه فعالیت گیرنده‌های نوع ۲ می‌باشد زیرا در این دوره (روز دهم تا پانزدهم در آزمایش ما) اثرات M35 و M871 یکسان بود و تفاوتی بین آنها مشاهده نشد. در همین راستا نشان داده شده است که نقش ضد تشنجی گیرنده‌های گالانین نوع ۲ در مراحل عمومی شدن تشنج بیشتر از مراحل کانونی آن است.

داده‌های حاصل از Semi-quantitative RT-PCR نیز نقش گیرنده‌های نوع ۲ را در اثرات ضد تشنجی LFS تأیید می‌کند. این مطالعه نشان داد که به دنبال کیندلینگ مسیر پرفورنت میزان mRNA گیرنده نوع ۲ در ژيروس دنداندار به صورت معناداری کاهش پیدا می‌کند. این مشاهده با گزارش‌های قبلی در مورد کاهش بیان ژن گیرنده نوع ۲ به دنبال تشنجات ایجاد شده توسط پیلوکارپین مطابقت دارد. بعلاوه نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اعمال LFS به دنبال تحریکات کیندلینگ جلوی کاهش بیان گیرنده نوع

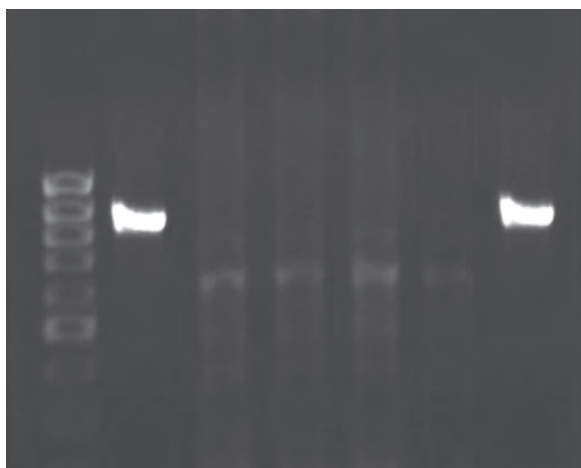
شکل ۱. تاثیر تزریق M871 به ژيروس دنداندار بر مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه و مراحل رفتاری تشنج



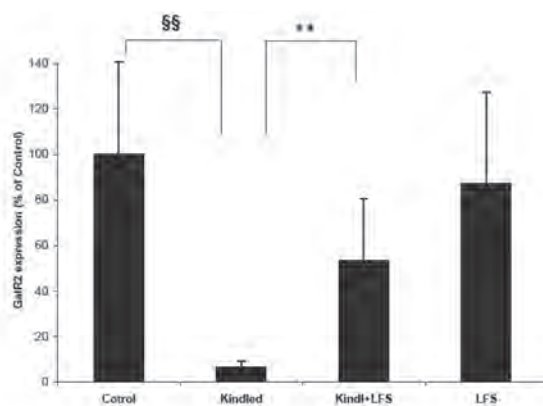
الف) تزریق M871 در گروه "Kindled+LFS+M871" اثرات کاهش‌دهنده LFS بر تعداد روزهای لازم برای رسیدن به مراحل مختلف رفتاری تشنج را نسبت به گروه "سالین+LFS+Kindled" به طور معنی‌داری کاهش داد. همان گونه که در شکل دیده می‌شود این کاهش تنها از روز دهم به بعد معنادار است. در هر دو نمودار اعداد نشان دهنده میانگین \pm خطای معیار میانگین می‌باشند ($n = 6$). *** نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با گروه "سالین+LFS+Kindled" از روز اول تا روز پانزدهم می‌باشد.

الف) تزریق M871 در گروهی که همراه تحریکات کیندلینگ LFS دریافت می‌کردند "Kindled+LFS+M871" اثرات کاهش‌دهنده LFS بر مدت زمان تخلیه‌های متعاقب روزانه را از روز دهم به بعد نسبت به گروهی که ابتدا نرمال سالین و سپس تحریکات کیندلینگ همراه LFS دریافت می‌کردند "سالین+LFS+Kindled" به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0.001$).

شکل ۲. تاثیر تحریکات الکتریکی کیندلینگ و LFS بر بیان ژن گیرنده‌های نوع ۲ گالانین در ژيروس دنداندار.



الف) بیان ژن GAI2 به صورت درصد نسبت به دانسیته باند B-اکتین نشان داده شده. همانگونه که در شکل مشاهده می‌شود اعمال تحریکات کیندلینگ تا بروز مرحله ۵ رفتاری تشنج در گروهی که تنها تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند (Kindled) سبب کاهش معنی‌داری در میزان mRNA گیرنده نوع ۲ گالانین نسبت به گروه کنترل می‌شود. ($p < 0.01$ §§) در حالیکه در گروهی که همراه تحریکات کیندلینگ LFS دریافت می‌کردند "Kindled+LFS" این کاهش میزان mRNA نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نیست اما این گروه نسبت به گروه Kindled تفاوت معناداری را نشان می‌دهد. علاوه بر اعمال تحریکات LFS به تنهایی و بدون اعمال تحریکات کیندلینگ (گروه LFS) سبب تغییر معناداری در میزان mRNA گیرنده نوع ۲ گالانین نسبت به گروه کنترل نشد ($p < 0.1$ *). دانسیته باند مربوط به گیرنده نوع ۲ گالانین برای هر نمونه نسبت به دانسیته باند B-اکتین نرمالایز شده است. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین نشان داده شده است ($n = 6$).



الف) بیان ژن GAI2 به صورت درصد نسبت به دانسیته باند B-اکتین نشان داده شده. همانگونه که در شکل مشاهده می‌شود اعمال تحریکات کیندلینگ تا بروز مرحله ۵ رفتاری تشنج در گروهی که تنها تحریکات کیندلینگ دریافت می‌کردند (Kindled) سبب کاهش معنی‌داری در میزان mRNA گیرنده نوع ۲ گالانین نسبت به گروه کنترل می‌شود. ($p < 0.01$ §§) در حالیکه در گروهی که همراه تحریکات کیندلینگ LFS دریافت می‌کردند "Kindled+LFS" این کاهش میزان mRNA نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نیست اما این گروه نسبت به گروه Kindled تفاوت معناداری را نشان می‌دهد. علاوه بر اعمال تحریکات LFS به تنهایی و بدون اعمال تحریکات کیندلینگ (گروه LFS) سبب تغییر معناداری در میزان mRNA گیرنده نوع ۲ گالانین نسبت به گروه کنترل نشد ($p < 0.1$ *). دانسیته باند مربوط به گیرنده نوع ۲ گالانین برای هر نمونه نسبت به دانسیته باند B-اکتین نرمالایز شده است. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین نشان داده شده است ($n = 6$).

excitability and seizures by galanin. *J Neurosci* 2000; 20: 6276-81.

11. Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD, De Lacalle S, Mufson EJ. Galanin in Alzheimer disease. *Mol Interv*, 2003. 3: 137-56.

12. Zhang X, et al. Expression of neuropeptides and neuropeptide mRNAs in spinal cord after axotomy in the rat, with special reference to motoneurons and galanin. *Exp Brain Res* 1993; 93: 450-61.

13. Kuteeva E, et al. Distribution of galanin and galanin transcript in the brain of a galanin-overexpressing transgenic mouse. *J Chem Neuroanat* 2004; 28: 185-216.

14. Miller MA, Kolb PE, Leverenz JB, Peskind ER, Raskind MA. Preservation of noradrenergic neurons in the locus ceruleus that coexpress galanin mRNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1999; 73: 2028-36.

15. Perez SE, et al. Distribution of galaninergic immunoreactivity in the brain of the mouse. *J Comp Neurol* 2001; 434: 158-85.

16. Xu ZQ, Shi TJ, Hokfelt T. Galanin/GMAP- and NPY-like immunoreactivities in locus coeruleus and noradrenergic nerve terminals in the hippocampal formation and cortex with notes on the galanin-R1 and -R2 receptors. *J Comp Neurol* 1998; 392: 227-51.

17. Coumis U, Davies CH. The effects of galanin on long-term synaptic plasticity in the CA1 area of rodent hippocampus. *Neuroscience* 2002; 112: 173-82.

18. Crawley JN, Minireview. Galanin-acetylcholine interactions: relevance to memory and Alzheimer's disease. *Life Sci* 1996; 58: 2185-99.

19. Floren A, Land T, Langel U. Galanin receptor subtypes and ligand binding. *Neuropeptides* 2000; 34:

References

1. Hauser WA, Hesdorffer DH. *Epilepsy frequency, causes and consequences*. New York, Demos Press; 1990.

2. Gaito J, Nobrega JN, Gaito ST. Interference effect of 3 Hz brain stimulation on kindling behavior induced by 60 Hz stimulation. *Epilepsia*, 1980. 21: 73-84.

3. Weiss SR, Eidsath A, Li XL, Heynen T, Post RM. Quenching revisited: low level direct current inhibits amygdala-kindled seizures. *Exp Neurol* 1998. 154: 185-92.

4. Weiss SR, et al. Quenching: inhibition of development and expression of amygdala kindled seizures with low frequency stimulation. *Neuroreport* 1995; 6: 2171-6.

5. Fujii S, et al. Endogenous adenosine regulates the effects of low-frequency stimulation on the induction of long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Neurosci Lett* 2000; 279: 121-4.

6. Lopez-Meraz ML, Neri-Bazan L, Rocha L. Low frequency stimulation modifies receptor binding in rat brain. *Epilepsy Res* 2004; 59: 95-105.

7. Velisek L, Veliskova J, Stanton PK. Low-frequency stimulation of the kindling focus delays basolateral amygdala kindling in immature rats. *Neurosci Lett* 2002; 326: 61-3.

8. Lundkvist J, et al. cDNA sequence, ligand binding, and regulation of galanin/GMAP in mouse brain. *Neurosci Lett* 1995; 200: 121-4.

9. Lundstrom L, Elmquist A, Bartfai T, Langel U. Galanin and its receptors in neurological disorders. *Neuromolecular Med* 2005; 7: 157-80.

10. Mazarati AM, et al. Modulation of hippocampal

- Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1972; 32: 281-94.
29. McIntyre DC, Wong RK. Modification of local neuronal interactions by amygdala kindling examined in vitro. *Exp Neurol* 1985; 88: 529-37.
30. Sollenberg UL, et al. M871-A novel peptide antagonist selectively recognizing the galanin receptor type 2. *Int J Peptide Res Therapeut* 2006; 12: 115-9.
31. Goodman JH, Berger RE, Tchong TK. Preemptive low-frequency stimulation decreases the incidence of amygdala-kindled seizures. *Epilepsia* 2005; 46: 1-7.
32. 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. *Epilepsy Res* 2007; 75: 154-61.
33. Yamamoto J, Ikeda A, Satow T, Takeshita K, Takayama M, Matsushashi M, et al. Low-frequency electric cortical stimulation has an inhibitory effect on epileptic focus in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2002; 43: 491-5.
34. Yang LX, et al. Unilateral low-frequency stimulation of central piriform cortex delays seizure development induced by amygdaloid kindling in rats. *Neuroscience* 2006; 138: 1089-96.
35. Zini S, et al. Galanin reduces release of endogenous excitatory amino acids in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 1993; 245: 1-7.
36. Sakurai E, et al. Galanin inhibits long-term potentiation at Schaffer collateral-CA1 synapses in guinea-pig hippocampal slices. *Neurosci Lett* 1996; 212: 21-4.
- 331-7.
20. Wang S, et al. Differential intracellular signaling of the GalR1 and GalR2 galanin receptor subtypes. *Biochem* 1998; 37: 6711-7.
21. Mazarati A, et al. Galanin type 2 receptors regulate neuronal survival, susceptibility to seizures and seizure-induced neurogenesis in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 3235-44.
22. Mazarati A, et al. Patterns of seizures, hippocampal injury and neurogenesis in three models of status epilepticus in galanin receptor type 1 (GalR1) knockout mice. *Neuroscience* 2004; 128: 431-41.
23. Mazarati AM, Halaszi E, Telegdy G. Anticonvulsive effects of galanin administered into the central nervous system upon the picrotoxin-kindled seizure syndrome in rats. *Brain Res* 1992; 589: 164-6.
24. Mazarati AM, et al. Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus. *J Neurosci* 1998; 18: 10070-7.
25. Sadegh M, et al. The role of galanin receptors in anticonvulsant effects of low-frequency stimulation in perforant path-kindled rats. *Neurosci* 2007.
26. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press 1986.
27. Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK, A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 1969; 25: 295-330.
28. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure.

37. Wasterlain CG, Mazarati AM, Naylor D, Niquet J, Liu H, Suchomelova L, et al. Short-term plasticity of hippocampal neuropeptides and neuronal circuitry in experimental status epilepticus. *Epilepsia* 2002; 43: 20-9.
38. Mazarati A, Lu X. Regulation of limbic status epilepticus by hippocampal galanin type 1 and type 2 receptors. *Neuropeptides* 2005; 39: 277-80.
39. Mazarati A, et al. Regulation of kindling epileptogenesis by hippocampal galanin type 1 and type 2 receptors: The effects of subtype-selective agonists and the role of G-protein-mediated signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 700-8.
40. Mazarati A, Wasterlain CG. Anticonvulsant effects of four neuropeptides in the rat hippocampus during self-sustaining status epilepticus. *Neurosci Lett* 2002; 331: 123-7.
41. Smith KE, Forray C, Walker MW, Jones KA, Tamm JA, Bard J, et al. Expression cloning of a rat hypothalamic galanin receptor coupled to phosphoinositide turnover. *J Biol Chem* 1997; 272: 24612-6.