



Research Article

Study of the Combined Effect of Low Frequency Stimulation and Carbamazepine on Motor and Balance Behavior Indices during Unilateral Kindling in the CA1 Region of the Dorsal Hippocampus in Adult Male Rats

Reza Moghaddasi ^{1,*} , Ahmad Ali Moazedi ² , Zohreh Ghotbeddin ³ , Mohamad Reza Akhond ⁴ 

¹PhD of Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

²Professor of Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³Associate Professor of Physiology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁴Assistant Professor, Department of Statistics, Mathematical Sciences and Computer Faculty, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

* **Corresponding author:** Reza Moghaddasi, PhD of Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E-mail: ghr.moghaddasi@gmail.com

DOI: [10.52547/nkums.14.2.75](https://doi.org/10.52547/nkums.14.2.75)

How to Cite this Article:

Moghaddasi R, Moazedi AA, Ghotbeddin Z, Akhond MR. Study of the Combined Effect of Low Frequency Stimulation and Carbamazepine on Motor and Balance Behavior Indices during Unilateral Kindling in the CA1 Region of the Dorsal Hippocampus in Adult Male Rats *J North Khorasan Univ Med Sci.* 2022;**14**(2):66-74. DOI: 10.52547/nkums.14.2.75

Received: 05 Jan 2022

Accepted: 24 May 2022

Keywords:

Electrical Kindling
Low Frequency Stimulation
Carbamazepine
Rat

Abstract

Introduction: In this study, the combined effects of low frequency stimulation (LFS) and carbamazepine (CBZ) were investigated on the motor behavior and balance indices of adult male rats during dorsal hippocampal epilepsy by electrical kindling method.

Method: In this experimental study, 56 adult male Wistar rats were randomly divided into 8 groups. Kindling stimulations were performed rapidly in the dorsal hippocampus. In other groups, carbamazepine was injected before kindling. LFS stimulation was also performed immediately after kindling in the target groups. The animals' motor behavior and balance indices were measured using open field and rotating bar tests. Behavioral data analysis was performed using analysis of variance and Kruskal-Wallis tests.

Results: The results showed that the ability to maintain balance in the rotating rod test in the CBZ20+K+LFS and CBZ40+K+LFS groups had a significant increase compared to the Kindle and K+LFS groups. Analysis of the motor behavior of Kindley mice showed that the search behavior of the drug and LFS groups has significantly increased compared to the K+LFS and K groups. Also, in the study of bipedal standing index, the combined groups showed a significant decrease compared to K+LFS and drug-receiving groups.

Conclusion: The duration of balance on the rotating bar in the drug and LFS groups showed a significant increase compared to the Kindle and K+LFS groups ($P < 0.05$). Comparison of the mean number of bipedal standing indices indicated significant decrease in the drug and LFS groups compared to the Kindle and K+LFS groups ($P < 0.05$).



مطالعه اثر توام تحریک الکتریکی با فرکانس پائین و کاربامازپین بر شاخص‌های رفتار حرکتی و تعادلی در طی کیندلینگ یک طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ پستی در موش‌های صحرایی نر بالغ

رضا مقدسی^{۱*}، احمد علی معاضدی^۲، زهره قطب الدین^۳، محمدرضا آخوند^۴

^۱ دکتری فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ استاد فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ دانشیار فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۴ استادیار گروه آمار، دانشکده آمار، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

* نویسنده مسئول: رضا مقدسی، دکتری فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

ایمیل: ghr.moghaddasi@gmail.com

DOI: 10.52547/nkums.14.2.75

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۵
مقدمه: در این مطالعه، به بررسی اثرات توام تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (LFS) و کاربامازپین (CBZ)، در طی صرع زائی هیپوکامپ پستی با روش کیندلینگ الکتریکی (K)، بر شاخص‌های رفتار حرکتی و تعادلی موش‌های صحرایی نر بالغ پرداخته شد.	تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۳
روش کار: این مطالعه از نوع تجربی بود و برای اجرای آن تعداد ۵۶ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به طور تصادفی به ۸ گروه تقسیم شدند. تحریکات کیندلینگ به روش سریع در ناحیه هیپوکامپ پستی انجام شد. در گروه‌های دیگر، تزریق کاربامازپین قبل از کیندلینگ انجام می‌شد. تحریکات LFS نیز بلافاصله بعد از اعمال کیندلینگ در گروه‌های مورد نظر انجام می‌شد. شاخص‌های رفتار حرکتی و تعادل حیوانات با استفاده از آزمون‌های میدان باز و میله چرخان اندازه‌گیری می‌شدند. تجزیه و تحلیل داده‌های رفتاری با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس و کروسکال-والیس انجام شدند.	واژگان کلیدی:
یافته‌ها: نتایج نشان داد که توانایی حفظ تعادل در آزمون میله چرخان در گروه‌های CBZ20+K+LFS و CBZ40+K+LFS نسبت به گروه کیندل و K+LFS افزایش معنی‌داری داشته است. تحلیل نتایج رفتار حرکتی موش‌های کیندل نشان داد که میزان رفتار جستجوگرانه گروه‌های دریافت‌کننده دارو و LFS نسبت به گروه K+LFS و K به صورت معنی‌داری افزایش یافته است. همچنین، در بررسی شاخص ایستادن دوپائی گروه‌های ترکیبی نسبت به K+LFS و گروه‌های دریافت‌کننده دارو کاهش معنی‌داری نشان دادند.	کیندلینگ الکتریکی
نتیجه‌گیری: مدت زمان حفظ تعادل بر روی میله چرخان در گروه‌های دریافت‌کننده دارو و LFS نسبت به گروه کیندل و K+LFS افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). مقایسه میانگین شاخص تعداد ایستادن دوپائی، بیانگر کاهش معنی‌دار گروه‌های دریافت‌کننده دارو و LFS نسبت به گروه کیندل و K+LFS است ($P < 0.05$).	تحریک الکتریکی با فرکانس پایین
	کاربامازپین
	موش صحرایی

مقدمه

بیماری صرع یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عصبی رایج در دنیا است که به دنبال اختلال در انتقال پیام‌های عصبی بین سلول‌های مغز به وجود می‌آید [۱]. تشنج یا حمله عصبی، رویدادی حمله‌ای ناشی از فعالیت نورونی هم زمان و فوق العاده غیرطبیعی در مغز است [۲]. بیماری صرع بعد از سکتة مغزی شایع‌ترین بیماری عصبی است. صرع یک بیماری مزمن با مجموعه‌ای از علائم ناهمگون است که مشخصه مهم آن حملات تشنجی عودکننده می‌باشد [۳]. به طور کلی، تشنج شامل دو نوع کانونی و منتشر است. تشنج منتشر، برخلاف تشنج کانونی، از شبکه‌های عصبی دو نیمکره مغزی منشأ گرفته و به سرعت گسترش می‌یابد [۴، ۲].

صرع لوب گیجگاهی، متداول‌ترین شکل بیماری صرع در بالغین مصروع می‌باشد [۵]. صرع لوب گیجگاهی، مهم‌ترین نمونه صرع موضعی و مقاوم به دارو (Drug- refractory) می‌باشد [۶، ۷]. در این بیماری تحلیل ساختارهای لوب گیجگاهی و اسکروز هیپوکامپ مشاهده می‌شود [۸]. صرع لوب گیجگاهی، توسط عوامل فارماکولوژیکی یا تحریک الکتریکی در جوندگان ایجاد می‌شود [۹].

بیماری صرع یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عصبی رایج در دنیا است که به دنبال اختلال در انتقال پیام‌های عصبی بین سلول‌های مغز به وجود می‌آید [۱]. تشنج یا حمله عصبی، رویدادی حمله‌ای ناشی از فعالیت نورونی هم زمان و فوق العاده غیرطبیعی در مغز است [۲]. بیماری صرع بعد از سکتة مغزی شایع‌ترین بیماری عصبی است. صرع یک بیماری مزمن با مجموعه‌ای از علائم ناهمگون است که مشخصه مهم آن حملات تشنجی عودکننده می‌باشد [۳]. به طور کلی، تشنج شامل دو نوع کانونی و منتشر است. تشنج منتشر، برخلاف تشنج کانونی، از شبکه‌های عصبی دو نیمکره مغزی منشأ گرفته و به سرعت گسترش می‌یابد [۴، ۲].

صرع لوب گیجگاهی، متداول‌ترین شکل بیماری صرع در بالغین مصروع می‌باشد [۵]. صرع لوب گیجگاهی، مهم‌ترین نمونه صرع موضعی و مقاوم به دارو (Drug- refractory) می‌باشد [۶، ۷]. در این بیماری تحلیل ساختارهای لوب گیجگاهی و اسکروز هیپوکامپ مشاهده می‌شود [۸]. صرع لوب گیجگاهی، توسط عوامل فارماکولوژیکی یا تحریک الکتریکی در جوندگان ایجاد می‌شود [۹].

دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز، با دوره روشنائی/تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، در دمای 23 ± 2 درجه سانتی گراد در قفس‌های پلکسی گلاس نگهداری می‌شدند. حیوانات در تمام مراحل آزمایش، به‌طور آزاد به آب و غذای مناسب و کافی دسترسی داشتند. تغذیه حیوانات از کنسانتره‌ی پلت شرکت خوراک دام پارس (تهران) انجام می‌شد.

به‌طور کلی ۸ گروه موش صحرایی در این پژوهش استفاده شدند. هر گروه با علامت اختصاری ویژه‌ای معرفی شده است. گروه‌های مورد مطالعه عبارتند از: ۱. کیندل (K): روزانه ۱۲ تحریک کیندلینگ (فرکانس ۵۰ هرتز، مدت ۳ ثانیه با فاصله ۱۵ دقیقه) دریافت می‌کردند. ۲. کیندل+LFS (K+LFS): پس از پایان تحریکات کیندلینگ، تحریکات LFS دریافت می‌کردند. ۳. متیل‌سلولز+کیندلینگ (MC+K): قبل از تحریکات کیندلینگ، ۲ میلی‌لیتر محلول متیل‌سلولز به صورت درون صفاقی دریافت می‌کردند. ۴ و ۵. دارو+کیندلینگ (CBZ20+K و CBZ40+K): قبل از تحریکات کیندلینگ، مقادیر ۲۰ یا ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم کاربامازپین به صورت درون صفاقی دریافت می‌کردند. ۶. حلال+کیندل+LFS (MC+K+LFS): قبل از تحریکات کیندلینگ، ۲ میلی‌لیتر محلول متیل‌سلولز به صورت درون صفاقی دریافت می‌کردند. ۷ و ۸. کاربامازپین+کیندلینگ+LFS (CBZ40+K+LFS) و (CBZ20+K+LFS): قبل از تحریکات کیندلینگ مقادیر ۲۰ یا ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم کاربامازپین به صورت درون صفاقی دریافت می‌کردند. دستورالعمل کیندلینگ سریع در کلیه گروه‌ها یکسان و همانند گروه کیندل بود. با توجه به نامحلول بودن کاربامازپین در آب، از متیل‌سلولز به عنوان کمک‌حلال استفاده می‌شد [۱۳، ۱۷]. هر گروه شامل ۷ سر موش صحرایی نر بالغ (۲ ماهه) بود.

ب- جراحی و الکتروگذاری: برای ساخت الکترودهای سه قطبی و یک قطبی از مفتول فلزی استیل ضد زنگ با روکش تفلونی به قطر ۰/۰۸ اینچ ساخت شرکت A-M SYSTEM کشور آمریکا استفاده شد. استقرار الکترودهای سه قطبی و یک قطبی در هیپوکامپ پستی موش صحرایی، بعد از بیهوشی حیوانات با تزریق درون صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۴۰ میلی گرم 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، خوانش و بر اساس اطلس پاکسینوس-واتسون منطقه هیپوکامپ پستی CA1 (۲/۵mm) به سمت عقب و ۱/۸ mm به سمت راست برگما و ۲/۸ mm زیر سخت شامه) در سطح جمجمه علامت گذاری شد [۱۹]. سپس، جمجمه سوراخ شده و الکتروده سه قطبی به آرامی وارد هیپوکامپ پستی می‌شد. الکتروده تک قطبی نیز، به استخوان پیشانی جمجمه متصل می‌شد. پس از آن الکترودها از طریق پین‌های 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 طی کردند [۲۰].

ج- کیندلینگ الکتریکی: برای به‌دست آوردن حداقل شدت تحریک ایجاد کیندلینگ، ابتدا با جریانی به شدت ۳۰ میکروآمپر ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی تحریک می‌شد. اگر امواج تخلیه متعاقب مناسب ثبت می‌شد، این شدت به عنوان شدت جریان آستانه تولید

برای مطالعه صرع، تاکنون چندین مدل معرفی شده‌اند. اغلب مدل‌های آزمایشگاهی بر اساس استفاده از داروها و ترکیبات شیمیایی یا تحریک الکتریکی می‌باشند [۱۰]. کیندلینگ الکتریکی یکی از بهترین مدل‌های مطالعه صرع لوب گیجگاهی است [۱۱]. پدیده کیندلینگ از طریق تخلیه‌های متعاقب تکراری در ناحیه مشخصی از مغز، باعث افزایش پیش‌رونده قابلیت تشنج می‌شود. کیندلینگ در نهایت، تشنجهای خودبخودی را به اوج می‌رساند و وضعیت صرع دائمی را پایدار می‌سازد [۵، ۱۲].

کاربامازپین (Carbamazepine; CBZ)، یکی از پرمصرف‌ترین داروهای ضد تشنجی بیماران صرعی است. این دارو برای درمان صرع لوب گیجگاهی و پیشگیری از تشنجهای موضعی ساده و پیچیده استفاده می‌شود [۱۳]. کاربامازپین، از طریق افزایش زمان غیرفعال کانال‌های ولتاژی سدیمی در نورون پیش‌سیناپسی، توانائی آن را برای فرکانس زیاد پتانسیل‌های عمل تکراری، کاهش و تشنج را متوقف می‌کند. همچنین، آزادسازی میانجی عصبی از نورون پیش‌سیناپسی را مهار می‌کند. بنابراین، در مجموع انتقال سیناپسی را کاهش می‌دهد [۱۴]. اثر مهاري نسبي تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (Low frequency stimulation; LFS) بر فرایندهای 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 [۱۵].

متأسفانه، استفاده از داروهای ضد صرع عوارض مختلفی مانند اختلال در تمرکز و عدم هماهنگی حرکات را به دنبال دارد. مثلاً کاربامازپین باعث کندی حرکت، کاهش چالاکی و آسیب به حافظه می‌شود [۱]. با وجود پژوهش‌های بی‌شمار درباره اثرات LFS، هنوز سؤالات زیادی درباره اثربخشی آن، از قبیل انتخاب هسته‌های مغزی و شاخص‌های LFS (از قبیل شدت و مدت تکانه و دوره پروتکل اجرائی) وجود دارد. از طرفی، با وجود تلاش جهانی در جهت تولید و گسترش داروهای نسل جدید برای درمان صرع و گسترش روش‌های غیردارویی، تاکنون در زمینه استفاده هم‌زمان دارودرمانی صرع و الکتروتراپی گزارش‌های چندانی منتشر نشده است [۱۶].

با توجه به نقش کلیدی هیپوکامپ در فرایند صرعی (epil)، وجود گزارش‌های متناقض درباره اثربخشی LFS و عوارض متعدد داروهای ضد صرع، ضرورت پژوهش‌های کاربردی درباره اثرات ترکیبی LFS و داروهای ضد صرع بر عملکردهای رفتاری بیماران و تعیین پروتکل درمانی احساس می‌شود. لذا، در این کار تحقیقاتی، از روش توأم درمان با LFS همراه با داروی کاربامازپین در طی روند کیندلینگ هیپوکامپ استفاده شده است.

روش کار

الف- حیوانات: این مطالعه از نوع تجربی بود و 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 موش صحرایی نر بالغ دو ماهه نژاد ویستار در محدوده وزنی 25 ± 2.5 گرم استفاده شد. حیوانات، در شرایط مناسب و بهداشتی خانه حیوانات

باید توجه شود که بهترین زمان آزمون رفتاری، نیمه اول دوره روشنایی (صبح تا اول ظهر) است [۲۵]. همچنین، با توجه به تأثیر اضطراب‌زای شدید شدت نور، یکنواختی آن بسیار اهمیت دارد. با استفاده از این آزمون، رفتارهای وابسته به اضطراب و فعالیت (مانند رفتارهای جستجوگرانه)، فاکتور کشیدگی بدن (تعداد دفعاتی که موش روی پاهای عقبی خود به صورت عمودی قرار می‌گیرد یا ایستادن دوپائی)، تعداد دفعاتی که موش به تیمار خود می‌پردازد (خودتیماری) و مسافت کلی پیموده شده اندازه‌گیری می‌شود. میزان ایستادن‌ها و مسافت کلی پیموده شده یا سرعت حرکت، نشان دهنده سطح بالای فعالیت است. مقادیر اضطراب، براساس مدت زمان توقف در مرکز جعبه سنجش می‌شود؛ مدت زمان پائین توقف، نشانه اضطراب بالا می‌باشد. در مقابل، میزان خودتیماری به عنوان شاخص رفتار غیراضطرابی است [۲۶، ۲۷].

آزمون میله چرخان (ROTA-ROD test): این آزمون برای ارزیابی تعادل و هماهنگی بین اندام‌های حرکتی در جوندگانی مانند موش صحرایی استفاده می‌شود. برای انجام این آزمون، از دستگاه روتارود UGOBAILE استفاده شد. دستگاه روتارود شامل یک گردونه است که سرعت چرخش آن ۴۰-۰ دور در دقیقه (Revolutions per Minute (rpm)) است. گردونه حدود ۲۰ cm از زمین فاصله دارد و توسط صفحات کروی شکل به ۴ بخش مجزا تقسیم می‌شود. در این آزمایش سرعت چرخیدن ۷ rpm در نظر گرفته شد که تقریباً ۱۱-۱۰ دور در دقیقه است [۲۷].

موش‌های صحرایی پس از انتقال به آزمایشگاه، به مدت ۳۰ دقیقه به حال خود رها شدند، تا به محیط عادت کنند. برای یادگیری مهارت حرکت بر روی میله چرخان، هر موش دو مرتبه و هر بار به مدت ۳ دقیقه تحت آموزش قرار داده شدند. سپس، مدت زمان حفظ تعادل و حرکت حیوان بر روی میله چرخان را سه مرتبه (هر یک ۵ دقیقه)، با فاصله ۱۵ دقیقه اندازه‌گیری و میانگین آن برحسب ثانیه ثبت شد. بعد از هر آزمایش دستگاه با الکل ۷۰٪ کاملاً تمیز می‌شد. شرایط آزمایشگاه از نظر دما، تهویه و شدت نور برای همه حیوانات یکنواخت بود. بیشتر جوندگان توانایی حفظ تعادل خود را برای چند دقیقه دارند. ولی در صورت آسیب مراکز عصبی هماهنگ کننده حرکات و تعادل، به سرعت سقوط می‌کنند. این آزمون برای ارزیابی یادگیری حرکتی نیز استفاده می‌شود. در صورت یادگیری بهتر، حیوان بعد از روزهای آموزش، آن را به خوبی اجرا می‌کند [۲۶].

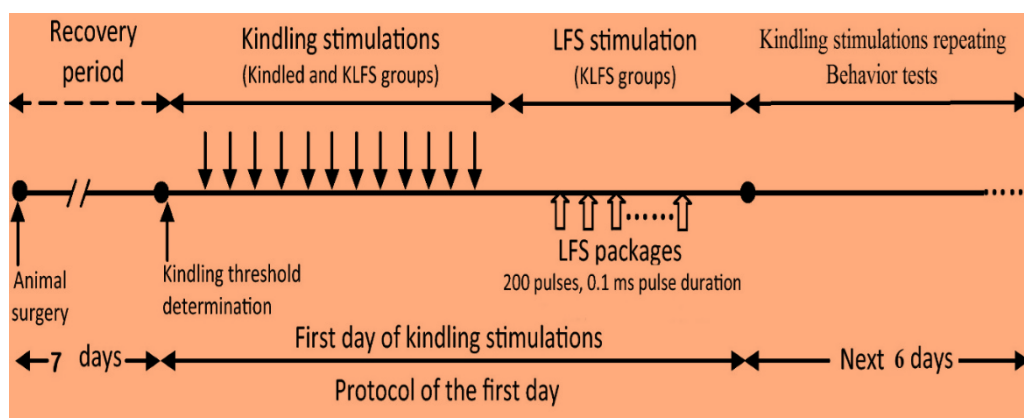
امواج تخلیه متعاقب شناخته می‌شد. در غیر این صورت، هر بار شدت جریان به اندازه ۱۰ میکروآمپر با فاصله ۱۵ دقیقه افزایش داده می‌شد تا وقتی که امواج تخلیه متعاقب مناسب ثبت شود [۲۱].

برای ایجاد کیندلینگ 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 ۱/ میلی ثانیه، به مدت ۳ ثانیه) تحریک می‌شدند. این تحریکات به صورت روزانه (۱۲ بار، با فاصله ۱۰ دقیقه) در طی ۶ روز اعمال می‌شد [۲۲]. پس از اعمال تحریکات کیندلینگ، امواج الکتریکی مغزی توسط الکتروود ثبات به دستگاه الکتروماحول (ساخت شرکت پرتودانش، تهران) و سپس رایانه منتقل می‌شدند.

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 موج مربعی دوفازی است؛ که هر پالس آن ۰/۱ میلی ثانیه و فرکانس آن نیز ۱ هرتز می‌باشد [۲۳]. دستورالعمل این تحریکات در ناحیه CA1 هیپوکامپ و بین ساعات ۹ صبح الی ۱۷ بعدازظهر اعمال می‌شد (شکل ۱).

د- آزمون‌های رفتاری: برای بررسی اثرات تشنج صرعی، LFS و داروی کاربامازپین بر میزان تعادل و فعالیت‌های حرکتی موش صحرایی دو آزمون در نظر گرفته شده است:

آزمون جعبه باز (Open feild): در این آزمون، فعالیت حرکتی حیوان، براساس جابجایی از یک نقطه به نقطه دیگر توسط چشم‌های الکترونیکی دستگاه اندازه‌گیری و محاسبه می‌شود. این دستگاه شامل یک جعبه مکعبی روباز با کف پلاستیکی سفید و دیواره‌های پلاستیکی گلاس شفاف به ابعاد ۵۰×۵۰×۵۰ سانتی‌متر می‌باشد. موش‌های صحرایی پس از انتقال به آزمایشگاه، به مدت ۳۰ دقیقه به حال خود رها می‌شوند؛ تا به محیط عادت کنند و میزان استرس آنها به حداقل برسد. بعد از تنظیم دستگاه (Mode: RAT و T=5min) و تمیز کردن جدار داخلی جعبه مکعبی، حیوان در مرکز جعبه قرار داده شده و تعداد حرکات (locomotion= Motion)، کشیدگی بدن یا ایستادن روی دو پا (Rearing)، خودتیماری (Grooming) به مدت ۵ دقیقه ثبت می‌شود [۲۴]. تمام آزمایش‌ها در دوره روشنایی فعالیت حیوان، در محدوده زمانی ساعت ۹ صبح تا ۱۴ بعدازظهر انجام شدند.



شکل ۱. پروتکل کیندلینگ و اعمال LFS در ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی

$MC+K$ ، $CBZ40+K$ ، $CBZ20+K$ ، $CBZ40+K+LFS$ و $MC+K+LFS$ به ترتیب $۱۳۲/۵۷ \pm ۵/۶۹$ ، $۱۶۶/۵۷ \pm ۱۳/۰۶$ ، $۱۳۶ \pm ۱۷/۲۶$ ، $۱۱۸/۴۳ \pm ۷/۷۲$ ، $۱۱۸/۴۳ \pm ۷/۷۲$ و $۱۸۰/۲۹ \pm ۱۱/۲۷$ بود. این شاخص در گروه‌های دریافت‌کننده دارو و LFS ($CBZ40+K+LFS$ ، $CBZ20+K+LFS$) نسبت به گروه کیندل و $K+LFS$ افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < ۰/۰۵$). درحالی‌که، بین گروه‌های توأم ($CBZ40+K+LFS$ ، $CBZ20+K+LFS$) و دریافت‌کننده دارو به تنهایی ($CBZ40+K$ ، $CBZ20+K$) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۲). میانگین کل تعداد "ایستادن دوپائی" در گروه‌های K ، $CBZ20+K$ ، $CBZ40+K$ ، $MC+K$ و $K+LFS$ ، $CBZ20+K+LFS$ ، $CBZ40+K+LFS$ و $MC+K+LFS$ به ترتیب $۴۲/۱۴ \pm ۳/۴۸$ ، $۳۹/۸۷ \pm ۲/۶۲$ ، $۴۰/۷۱ \pm ۲/۰۷$ ، $۴۲ \pm ۲/۷$ ، $۳۸/۱۴ \pm ۳/۳۳$ ، $۲/۳ \pm ۳۰/۴۳$ ، $۴/۸۶ \pm ۳۳/۶۷$ و $۳/۱ \pm ۳۹$ به‌دست آمد. مقایسه میانگین شاخص تعداد ایستادن دوپائی، بیانگر کاهش معنی‌دار گروه‌های دریافت‌کننده دارو و LFS ($CBZ40+K+LFS$ ، $CBZ20+K+LFS$) نسبت به گروه کیندل و $K+LFS$ است ($P < ۰/۰۵$). درحالی‌که بین گروه‌های دریافت‌کننده دارو به تنهایی ($CBZ40+K$ ، $CBZ20+K$) نسبت به گروه‌های K و $K+LFS$ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۳). میانگین تعداد خودتیماری در گروه‌های K ، $CBZ20+K$ ، $CBZ40+K$ ، $MC+K$ ، $K+LFS$ ، $CBZ20+K+LFS$ و $CBZ40+K+LFS$ به ترتیب $۶/۸۶ \pm ۰/۶۷$ ، $۵/۴۲ \pm ۰/۸۹$ ، $۴/۳۳ \pm ۰/۷۹$ ، $۵ \pm ۱/۰۹$ ، $۶/۷۱ \pm ۰/۵$ ، $۳/۸۶ \pm ۰/۷۹$ و $۶/۱۷ \pm ۰/۷۵$ بود. مقایسه میانگین شاخص خودتیماری، بیانگر کاهش معنی‌دار گروه‌های دریافت‌کننده دارو و LFS ($CBZ40+K+LFS$ ، $CBZ20+K+LFS$) نسبت به گروه کیندل است ($P < ۰/۰۵$) (نمودار ۴).

بحث

نتایج حاصل از تجویز توام کاربامازپین و LFS بر عملکردهای رفتاری موش‌های صحرایی نشان داد که توانایی حفظ تعادل در آزمون میله چرخان در گروه‌های CBZ20+K+LFS و CBZ40+K+LFS نسبت به گروه کیندل و K+LFS افزایش معنی‌داری داشته است. ضمن اینکه، نسبت به گروه CBZ20+K کاهش یافته است. تحلیل نتایج رفتار حرکتی موش‌های کیندلی نشان می‌دهد که میزان رفتار جستجوگرانه گروه‌های دریافت کننده دارو و LFS (CBZ20+K+LFS و CBZ40+K+LFS) نسبت به گروه K+LFS و K به صورت معنی‌داری افزایش یافته است. ولی، نسبت به گروه‌های دریافت کننده دارو (CBZ20+K و CBZ40+K) تغییر معنی‌داری نشان نمی‌دهند. همچنین، در بررسی شاخص ایستادن دوطائی گروه‌های ترکیبی نسبت به K+LFS و گروه‌های دریافت کننده دارو (CBZ20+K و CBZ40+K) کاهش معنی‌داری نشان می‌دهند. به علاوه، در شاخص خودتیماری گروه‌های ترکیبی نسبت به K+LFS و گروه CBZ20+K افزایش معنی‌داری نشان می‌دهند (نمودارهای ۱، ۲، ۳ و ۴).

برای تزریق داروی ضد سرع کاربامازپین (ساخت شرکت Sigma-Aldrich کشور آلمان)، مقدار ۸ میلی گرم بر کیلوگرم دارو را به صورت روزانه در ۲/ میلی لیتر کمک حلال متیل سلولز حل نموده و به صورت درون صفاتی تزریق می شد [۱۳، ۱۷].

برای آنالیز آماری از نرم افزار SPSS استفاده شد. نتایج به صورت انحراف استاندارد میانگین $\pm$ انحراف استاندارد بیان شد. برای همگنی واریانس ها از آزمون Leven استفاده شد. جهت بررسی نرمال بودن توزیع متغیر وابسته به تفکیک در هر یک از گروه ها متغیر مستقل از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. در کلیه آزمون ها در صورت وجود اختلاف معنی دار بین گروه ها و همگن بودن واریانس ها از پس آزمون Tukey و در صورت همگن نبودن از آزمون ناپارامتری Kruskal-Wallis استفاده شد. همچنین، در تمامی موارد $p < 0/05$ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

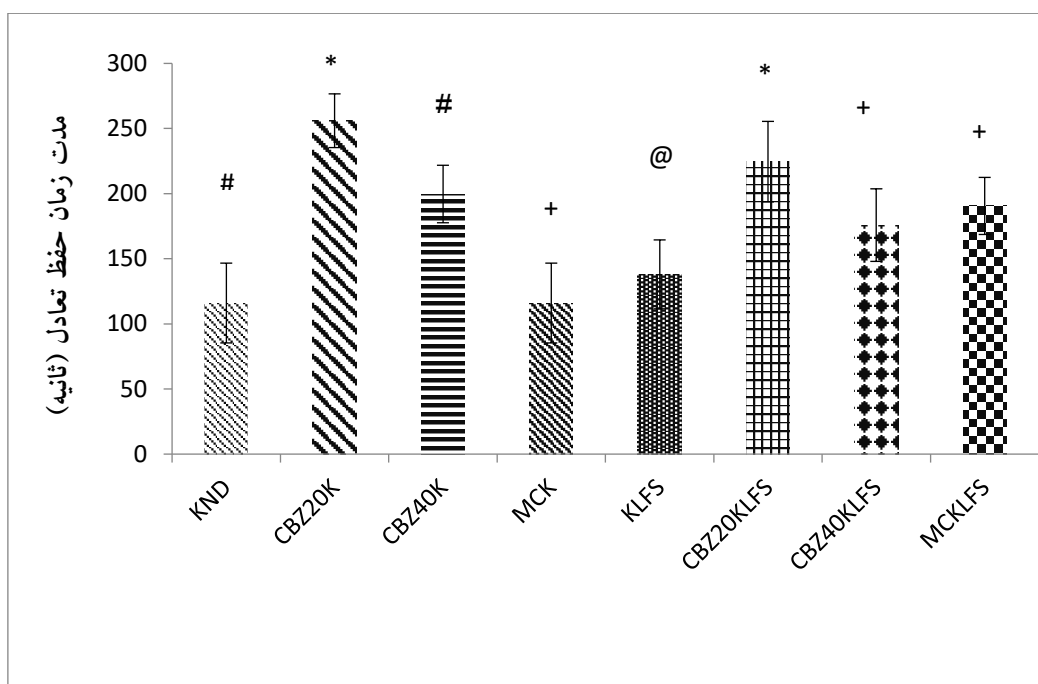
مافته‌ها

به منظور ارزیابی و مقایسه اثرات LFS و داروی کاربامازپین بر میزان حرکت و تعادل موش صحرایی به دنبال کیندلینگ الکتریکی ناحیه CA1 هیپوکامپ در حین فرایند صرع‌زائی از آزمون‌های میدان باز و میله چرخان استفاده شد. شاخص‌های رفتاری مورد مطالعه شامل ارزیابی حرکتی حیوان با استفاده از اندازه‌گیری تعداد کل حرکات یا تعداد عبور از خطوط، تعداد ایستادن دوپایی و تعداد خودتیماری بود. ارزیابی تعادل حیوان با استفاده از اندازه‌گیری میانگین مدت زمان حفظ تعادل بر روی میله چرخان در حال چرخش با استفاده از دستگاه روتارود انجام شد.

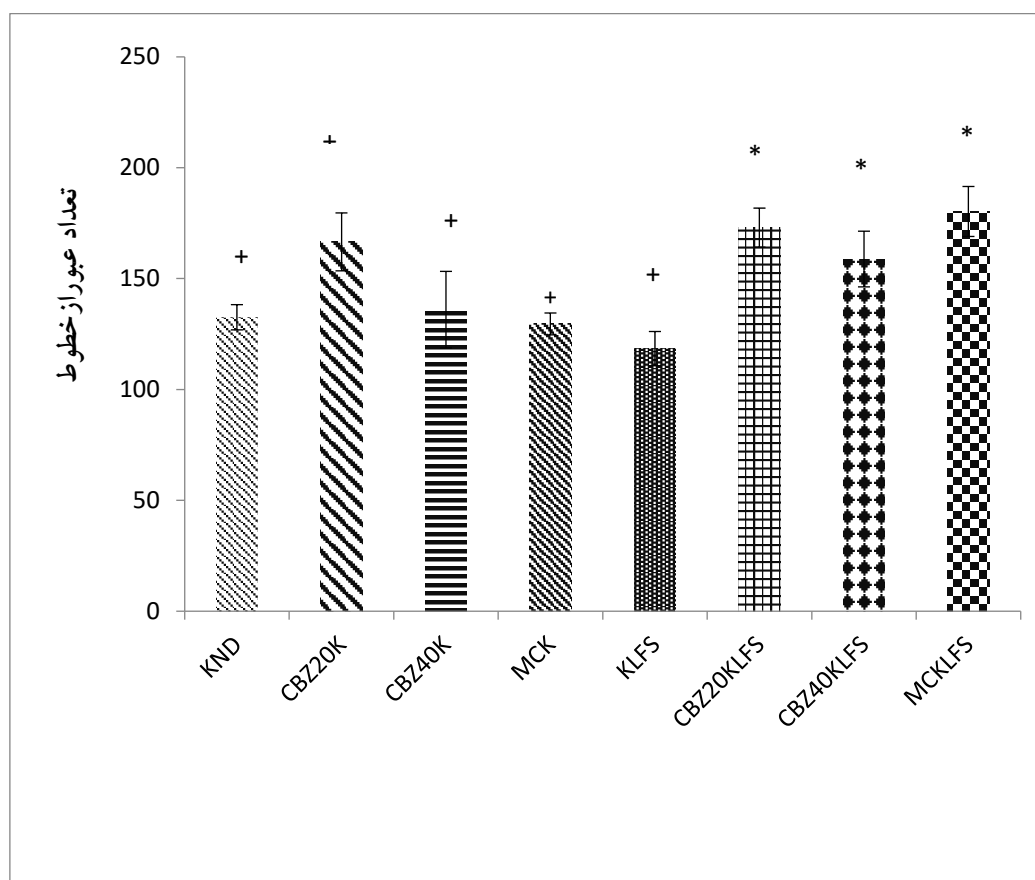
بر اساس تحلیل آماری نتایج، تجویز توام کاربامازپین و LFS بر متغیرهای حرکتی و تعادلی بین گروه‌های مورد مطالعه اثرگذار است ($P < 0.05$). در نمودارهای ۱، ۲، ۳ و ۴ مقدار میانگین و خطای استاندارد شاخص‌های حرکتی و تعادل به تفکیک برای گروه‌های K، CBZ20+K، CBZ40+K، MC+K و LFS+K مشخص شده است.

میانگین مدت زمان حفظ تعادل با استفاده از آزمون میله چرخان، در گروه‌های K، CBZ20+K، CBZ40+K، MC+K، K+LFS، CBZ20+K+LFS و MC+K+LFS به ترتیب $116 \pm 30/64$ ، $256 \pm 20/62$ ، $119/71 \pm 42/07$ ، $175/83 \pm 27/86$ ، $224/57 \pm 30/91$ ، $138 \pm 26/47$ ، $116/28 \pm 30/64$ و $191/91 \pm 21/56$ ثانیه بود. با توجه به نتایج به دست آمده مدت زمان حفظ تعادل بر روی میله گرد در گروه‌های دریافت کننده دارو و LFS (CBZ40+K+LFS، CBZ20+K+LFS) نسبت به گروه کیندل و K+LFS افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$). درحالی که، این شاخص بین گروه‌های توام (CBZ20+K+LFS، CBZ40+K+LFS) و دریافت کننده دارو و کیندل (CBZ20+K، CBZ40+K) تفاوت معنی‌داری نشان نداده است (نمودار ۱).

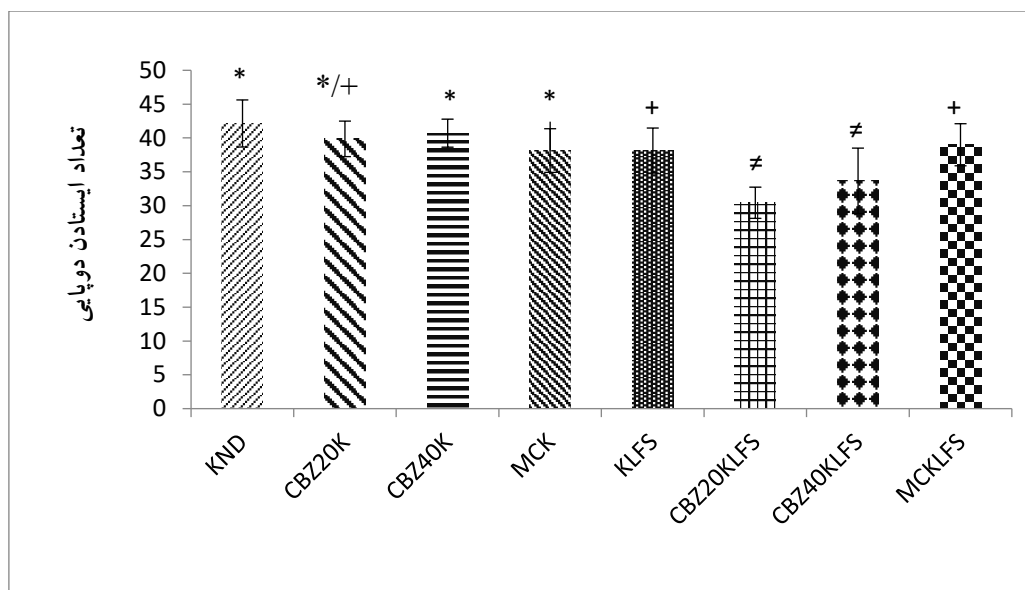
در ارزیابی حرکتی با استفاده از دستگاه میدان باز، تعداد حرکات، تعداد ایستادن دوپائی و خودتیماری در گروه‌های مختلف بررسی و مورد مقایسه قرار گرفت. میانگین تعداد عبور از خطوط مقاطع در گروه‌های



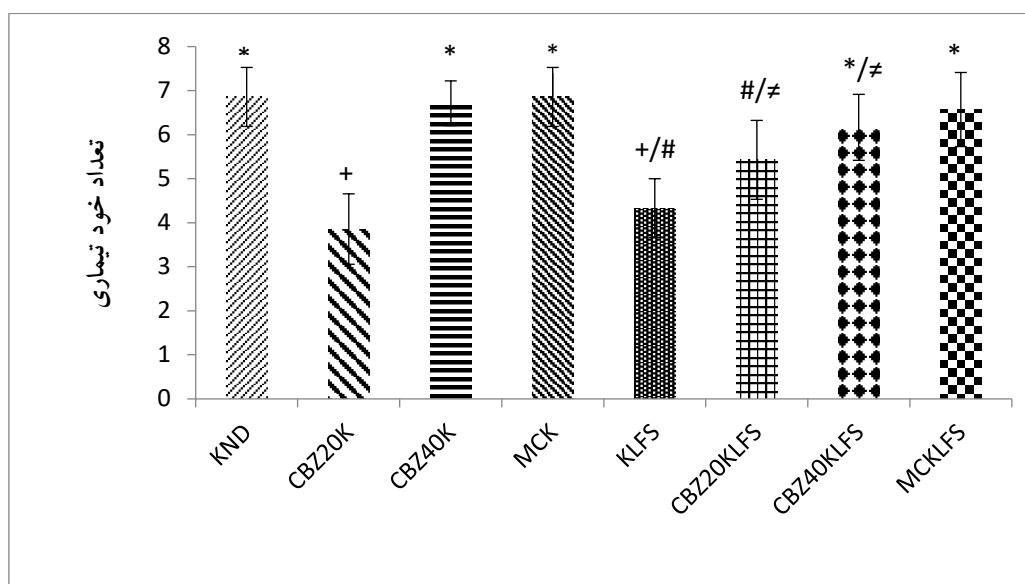
نمودار ۱. مطالعه اثر تجویز کاربامازپین و LFS بر شاخص مدت زمان حفظ تعادل در موش‌های صحرایی کیندلی. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. علامت نامتشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد ($P < 0.05$) ($n=7$).



نمودار ۲. مطالعه اثر تجویز کاربامازپین و LFS بر شاخص تعداد عبور از خطوط در موش‌های صحرایی کیندلی. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. علامت نامتشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد ($P < 0.05$) ($n=7$).



نمودار ۳. مطالعه اثر تجویز کاربامازپین و LFS بر شاخص ایستادن دوتایی در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. علامت نامتشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد ($P < 0.05$) ($n=7$).



نمودار ۴. مطالعه اثر تجویز کاربامازپین و LFS بر شاخص خود تیماری در موش‌های صحرایی کیندلی. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. علامت نامتشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد ($P < 0.05$) ($n=7$).

کاربامازپین و LFS بر میزان حرکت و تعادل موش‌های صحرایی کیندلی مؤثر باشد.

امروزه، از تحریک عمیق مغز در مهار فعالیت نورونی غیرطبیعی در بیماری پارکینسون و صرع استفاده می‌شود. برای این منظور، مناطقی از مغز مانند هیپوکامپ (دارای خاصیت تحریک پذیری بالا) و شکنج دندانه‌ای (دارای آستانه تخلیه متعاقب بالاتر نسبت به CA1) بیشتر مورد توجه می‌باشند [۳۰]. به نظر می‌رسد، استفاده ترکیبی LFS با داروهای ضدصرع نیز اثر درمانی مطلوب‌تر و عوارض جانبی کم‌تری داشته باشد [۳۱].

امروزه، مشخص شده است که نورون‌های گاباژژیک نقش مهمی در ایجاد اثرات ضد تشنجی داروهای ضدصرع دارند. بنابراین، با وجود این که اثرات مهار LFS بر تشنج و صرع‌زائی به درستی مشخص نشده

با وجود مطالعات بسیار گسترده‌ای که درباره اثربخشی داروهای ضدصرع و LFS انجام شده است؛ اما مطالعات ترکیبی داروهای ضدصرع و LFS بسیار محدود می‌باشد. موارد مشاهده شده نیز شامل اثرات ضد تشنجی است. داروی کاربامازپین با افزایش غیرفعال ماندن کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ در یاخته‌های عصبی پس‌سیناپسی و مهار آزادسازی میانجی‌عصبی از یاخته‌های عصبی پیش‌سیناپسی، انتقال سیناپسی را کاهش و تشنج‌های صرعی را مهار می‌نماید (۱). به این ترتیب، اثرات ضد تشنجی و رفتاری خود را اعمال می‌کند. مطالعات متعددی در طول نیم قرن گذشته درباره اثربخشی LFS بر کاهش شاخص‌های تشنجی انجام شده است [۲۸]. با توجه به استفاده از روش‌های تحریک عمیق مغز و همچنین LFS برای درمان اختلالات حرکتی مختلف [۲۹]، به نظر می‌رسد استفاده ترکیبی از داروی

موش‌های صحرایی کیندلی تأثیر داشته باشد. به نظر می‌رسد، برخی از نتایج متفاوت این پژوهش با نتایج پژوهش‌های قبلی ناشی از نوع دستورالعمل و هسته عصبی مورد استفاده در کیندلینگ می‌باشد. چنین نتایجی در استفاده منفرد LFS مشاهده شده است [۳۵]. شاید این تفاوت‌ها ناشی از اثرات متناقض کیندلینگ بر اساس موقعیت الکترودهای تحریکی و برنامه زمانی آزمایش (دوره کیندلینگ، فاصله‌های بدون تشنج) می‌باشد [۳۸].

نتیجه‌گیری

سازوکار دقیق سلولی-مولکولی کاربامازپین و LFS به درستی مشخص نشده است. به طور کلی، به نظر می‌رسد اعمال LFS به همراه کاربامازپین نسبت به LFS اثرات موثرتری بر بهبود تعادل و میزان کلی حرکت داشته باشد. ولی، بر رفتار ایستادن دوطائی اثر کاهشی نسبت به LFS و کاربامازپین دارد.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با کد اخلاق EE97/3/24- 61254/SCU.AC.IR به وسیله بودجه پژوهشی (گرن: ۹۶/۳/۲۱۶۶۷۰) دانشگاه شهید چمران اهواز در آزمایشگاه الکتروفیزیولوژی دانشکده علوم پایه به سرانجام رسیده است. لذا شایسته است از حمایت‌های بی‌دریغ و همه جانبه معاونت پژوهشی دانشگاه در تأمین مالی پروژه تقدیر و تشکر شود.

References

- Bertram GK. Basic and Clinical pharmacology: McGraw-Hill Companies; 2012.
- Lowenstein DH. Seizures and Epilepsy. Harrison's Principles of Internal Medicine, 20e: MC GRAW-HILL; 2017.
- Singh A, Trevick S. The Epidemiology of Global Epilepsy. *Neurol Clin.* 2016;**34**(4):837-847. DOI: 10.1016/j.ncl.2016.06.015 PMID: 27719996
- Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2017;**58**(4):S12-S21. DOI: 10.1111/epi.13709 PMID: 28276062
- Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2014;**10**:1693-1705. DOI: 10.2147/NDT.S50371 PMID: 25228809
- Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. *Lancet.* 2006;**367**(9516):1087-1100. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68477-8
- Engel J. Clinical neurophysiology, neuroimaging, and the surgical treatment of epilepsy. *Curr Opin Neurol Neurosurg.* 1993;**6**(2):240-249.
- Cendes F. Progressive hippocampal and extrahippocampal atrophy in drug resistant epilepsy. *Curr Opin Neurol.* 2005;**18**(2):173-177. DOI: 10.1097/01.wco.0000162860.49842.90 PMID: 15791149
- Reddy DS, Kuruba R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. *Int J Mol Sci.* 2013;**14**(9):18284-18318. DOI: 10.3390/ijms140918284 PMID: 24013377
- Loscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2002;**50**(1-2):105-123. DOI: 10.1016/s0920-1211(02)00073-6 PMID: 12151122

است؛ ولی به نظر می‌رسد LFS از طریق گیرنده‌های GABA اثر مهارتی خود را اعمال می‌کند [۳۲]. همچنین، گمان می‌رود LFS از طریق LTD نقش ضدصرعی داشته باشد [۳۳]. به علاوه به نظر می‌رسد، LFS از طریق تغییر مدارهای عصبی سامانه لیمبیک (کناری) اثر ضدتنجی داشته باشد [۳۸].

براساس نتایج پژوهش Wu و همکاران، استفاده ترکیبی Perampanel (نوعی داروی ضدتنج، آنتاگونیست گیرنده‌های گلوتامینی AMPA) با داروهای ضدصرع مختلف در موش‌های صحرایی کیندلی آمیگدال منجر به کاهش معنی‌دار شاخص‌های تشنجی می‌شود. همچنین، به منظور بررسی اثرات سمیت داروها بر میزان تعادل حیوانات آزمون میله‌چرخان انجام گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، درمان منفرد با مقادیر غیرموثر پرامپنل، لاموتریزین، کاربامازپین و والپرووات سدیم میانگین مدت زمان حفظ تعادل را نسبت به گروه شاهد کاهش می‌دهد. استفاده ترکیبی مقادیر غیرموثر داروهای ضدصرع با مقدار غیرموثر پرامپنل اثر کاهشی معنی‌داری (۵۰٪) بر مدت زمان تعادل نسبت به گروه شاهد دارد. ولی، تفاوت بین مقدار غیر موثر پرامپنل و هر یک از چهار نوع داروی ضدصرع از نظر آماری معنی دار نبود [۳۴]. مطالعات متعدد Glauser و Asghari درباره افزایش اثربخشی داروهای ضدصرع با اعمال LFS نشان می‌دهد که، استفاده ترکیبی این دو روش باعث کاهش شاخص‌های تشنجی در موش‌های صحرایی کیندلی می‌شود [۳۱، ۳۵-۳۷]. لذا با توجه به نتایج استفاده ترکیبی داروهای ضدصرع و داروهای ضدصرع با LFS انتظار می‌رود اعمال تحریک الکتریکی با فرکانس پائین بر رفتارهای حرکتی و تعادلی

- Hargreave E. Kindling , A model of focal epilepsy. *Neurol.* 2016;**7**.
- Goddard GV. The kindling model of epilepsy. *Trend Neurosci.* 1983;**6**(1983):275-279. DOI: 10.1016/0166-2236(83)90118-2
- Srivastava AK, White HS. Carbamazepine, but not valproate, displays pharmacoresistance in lamotrigine-resistant amygdala kindled rats. *Epilepsy Res.* 2013;**104**(1-2):26-34. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2012.10.003 PMID: 23158096
- Bron GVR. Handbook of Experimental Pharmacology: Springer Press; 2009.
- Bertram E. The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia.* 2007;**48** Suppl 2:65-74. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2007.01068.x PMID: 17571354
- 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 Kashan Univ Med Sci.* 2018;**22**(6):538-546.
- Srivastava AK, Alex AB, Wilcox KS, White HS. Rapid loss of efficacy to the antiepileptic drugs lamotrigine and carbamazepine: a novel experimental model of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia.* 2013;**54**(7):1186-1194. DOI: 10.1111/epi.12234 PMID: 23750799
- McNamara JO. Pursuit of the mechanisms of kindling. *Trends Neurosci.* 1988;**11**(1):33-36. DOI: 10.1016/0166-2236(88)90047-1 PMID: 2469153
- Paxinos G, Watson C. The Rat Brain. London: Academic Press; 2005.
- Durmulder N, Porsolt R. Current protocols in Pharmacology: John Wiley & Sons Inc.; 2003.
- Toibaro L, Pereyra M, Pastorino J, Smigliani A, Ocariz F, Ortmann G. Effect of unilateral low-frequency stimulation of hippocampus on rapid kindling—induced seizure development in rats. *Neurosci Med* 2012;**3**(2):174. DOI: 10.4236/nm.2012.32022

22. 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):273-278. DOI: 10.1017/s0317167100025117 PMID: 597802
23. Ghotbedin Z, Janahmadi M, Mirnajafi-Zadeh J, Behzadi G, Semnani 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 Stimul.* 2013;**6**(4):515-523. DOI: 10.1016/j.brs.2012.11.001 PMID: 23228730
24. Moazedi AA. The effect of oral and central administration of ALC13 on movement and coordination in adult male rat. *J Anim Res.* 2014;**26**(4):460-467.
25. Minjarez B, Camarena HO, Haramati J, Rodriguez-Yanez Y, Mena-Munguia S, Buritica J, et al. Behavioral changes in models of chemoconvulsant-induced epilepsy: A review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017;**83**:373-380. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2017.10.016 PMID: 29107831
26. Hannesson DK, Howland J, Pollock M, Mohapel P, Wallace AE, Corcoran ME. Dorsal hippocampal kindling produces a selective and enduring disruption of hippocampally mediated behavior. *J Neurosci.* 2001;**21**(12):4443-4450. PMID: 11404431
27. Rabiei Z, Alibabaei Z, Rafieian-kopaei M. Determining the Antioxidant Properties of Chamomile and Investigating the Effects of Chamomile Ethanol Extract on Motor Coordination Disorders in Rats. *J Babol Univ Med Sci.* 2015;**17**(4):50-44.
28. Wang Y, Xu Z, Cheng H, Guo Y, Xu C, Wang S, et al. Low-frequency stimulation inhibits epileptogenesis by modulating the early network of the limbic system as evaluated in amygdala kindling model. *Brain Struct Funct.* 2014;**219**(5):1685-1696. DOI: 10.1007/s00429-013-0594-7 PMID: 23754239
29. Mitchell JW, Seri S, Cavanna AE. Pharmacotherapeutic and Non-Pharmacological Options for Refractory and Difficult-to-Treat Seizures. *J Cent Nerv Syst Dis.* 2012;**4**:105-115. DOI: 10.4137/JCNSD.S8315 PMID: 23650471
30. Cuellar-Herrera M, Pena F, Alcantara-Gonzalez D, Neri-Bazan L, Rocha L. Antiepileptic drugs combined with high-frequency electrical stimulation in the ventral hippocampus modify pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Epilepsia.* 2010;**51**(3):432-437. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2009.02315.x PMID: 19863580
31. Asgari A, Semnani 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. *Neurol Sci.* 2014;**35**(8):1255-1260. DOI: 10.1007/s10072-014-1693-9 PMID: 24609823
32. Lopez-Meraz ML, Neri-Bazan L, Rocha L. Low frequency stimulation modifies receptor binding in rat brain. *Epilepsy Res.* 2004;**59**(2-3):95-105. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2004.02.005 PMID: 15246114
33. Carrington CA, Gilby KL, McIntyre DC. Effect of focal low-frequency stimulation on amygdala-kindled afterdischarge thresholds and seizure profiles in fast- and slow-kindling rat strains. *Epilepsia.* 2007;**48**(8):1604-1613. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2007.01077.x PMID: 17433055
34. 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):732-739. DOI: 10.1016/j.seizure.2014.06.001 PMID: 24997072
35. Asgari A, Semnani 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. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.05.038 PMID: 27235746
36. Asghari A, Moradi H, Shojaei A, Mirnajafi Zadeh J. Interaction Between The Anticonvulsant Effects Of Low-Frequency Stimulation and Phenobarbital in Amygdala Kindled Seizures in rats. *Neuroscience.* 2013;**330**:26-38.
37. Glauser T, Ben-Menachem E, Bourgeois B, Cnaan A, Guerreiro C, Kalviainen R, et al. Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia.* 2013;**54**(3):551-563. DOI: 10.1111/epi.12074 PMID: 23350722
38. Subedeel SR, Sibgatullah MD, Siddamma A, Brahadeesh M. Role of Multiple Ion Channel Blocker-Amiodarone In Model of Convulsion, Locomotor Activity and Cognition in Albino Rats. *J Pharm Pharm Sci.* 2014;**6**:690-692.