

## Protective Effects of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (rTMS) on Seizure Attacks and Neuronal Injuries in Rats

Babak Khodaie<sup>1,2</sup>, Hassan Hosseini Ravandi<sup>2</sup>, Kamran Azma<sup>1</sup>, Valiallah Saba<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Radiation Research Center, Faculty of Paramedicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>2</sup> Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran.

### Article Info:

Received: 28 Jun 2014

Accepted: 31 Jul 2014

## ABSTRACT

**Introduction:** Epilepsy has been known as a chronic brain disorder, influences large number of population around the world. Seizures should be treated as soon as possible to avoid the development of chronic epilepsy. Furthermore, there are some complications following surgical resection of epileptic focus and drug treatment. Transcranial magnetic stimulation has been suggested to generate current flow in the brain and could be an alternative to drug treatment or surgery. We study the protective effects of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on seizure attacks and cellular damage in the amygdala in rats. **Materials and Methods:** In the present study four groups of rats including intact, pentylenetetrazole, rTMS+pentylenetetrazole and rTMS were used to investigate rTMS effects on cellular activity and seizure attacks in a model of epilepsy. The rTMS was applied for a month and then seizures was induced by intraperitoneally injection of pentylenetetrazole and seizure scores were determined. Finally, rats were killed and neuronal injury was evaluated in the amygdala. **Results:** Seizure scores as well as histological assessment revealed a significant reduction on seizure attacks and the mean number of necrotic cells in the amygdala following rTMS application. **Conclusion:** This study advocated a protective effect of rTMS on cellular structure in epilepsy. However, safety of rTMS in clinical practice need further investigations.

### Key words:

1. Transcranial Magnetic Stimulation
2. Epilepsy
3. Pentylenetetrazole
4. Amygdala
5. Seizures

\* **Corresponding Author:** Valiallah Saba

E-mail: [vsaba@aut.ac.ir](mailto:vsaba@aut.ac.ir)

## بررسی اثرات محافظتی تحریکات مغناطیسی جمجمه‌ای مکرر (rTMS) بر حملات تشنج و آسیب‌های نورونی در موش‌های صحرائی

بابک خدائی<sup>۱،۲</sup>، حسن حسینی روندی<sup>۲</sup>، کامران آزما<sup>۱</sup>، ولی اله صبا<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات رادیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی، تهران، ایران.

<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیا، تهران، ایران.

### اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۹ مرداد ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۷ تیر ۱۳۹۳

### چکیده

**مقدمه:** صرع به عنوان یکی از اختلالات مزمن مغز شناخته شده است که جمعیت زیادی در سراسر جهان به آن مبتلا می‌باشند. تشنج باید هر چه سریع‌تر درمان شود تا از تبدیل شدن به صرع مزمن جلوگیری گردد. ضمناً روش‌های جراحی و درمان دارویی دارای برخی عوارض جانبی هستند. تحریکات مغناطیسی جمجمه‌ای برای تولید جریان در مغز پیشنهاد شده است و می‌تواند جایگزینی برای درمان دارویی و جراحی باشد. ما نقش محافظت‌کنندگی تحریکات مغناطیسی جمجمه‌ای مکرر را بر روی حملات تشنج و آسیب‌های سلولی در منطقه آمیگدال در موش صحرائی مطالعه کردیم. **مواد و روش‌ها:** در بررسی حاضر چهار گروه از موش‌های صحرائی شامل: گروه‌های سالم، پنتیلین تترازول، تحریک مغناطیسی به همراه تزریق پنتیلین تترازول و تحریک مغناطیسی برای بررسی تأثیر تحریکات مغناطیسی جمجمه‌ای مکرر بر روی فعالیت سلولی و حملات تشنج در یک مدل از صرع بکار برده شد. تحریکات مغناطیسی جمجمه‌ای مکرر به مدت یک ماه اعمال گردید و سپس تشنج با استفاده از تزریق داخل صفاقی پنتیلین تترازول القاء گردید و امتیازهای تشنجی ثبت شد. در انتها موش‌های صحرائی کشته شدند و آسیب عصبی در آمیگدال ارزیابی شد. **یافته‌ها:** امتیازهای تشنجی و نیز ارزیابی‌های بافت‌شناسی نشان دادند که به دنبال استفاده از تحریکات مغناطیسی جمجمه‌ای مکرر، حملات تشنج و میانگین تعداد سلول‌های نکروتیک در آمیگدال، به طور معنی‌داری کاهش پیدا می‌کند. **نتیجه‌گیری:** این مطالعه یک اثر محافظتی از تحریکات مغناطیسی جمجمه‌ای مکرر بر ساختار سلولی در صرع را نشان داد. در هر حال ایمنی تحریکات مغناطیسی جمجمه‌ای مکرر در کاربردهای بالینی نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

### کلید واژه‌ها:

۱. تحریکات مغناطیسی جمجمه‌ای
۲. صرع
۳. پنتیلین تترازول
۴. آمیگدال
۵. تشنج

\* نویسنده مسئول: ولی اله صبا

آدرس الکترونیکی: vsaba@aut.ac.ir

## مقدمه

هستند فعالیت‌های الکتریکی و بیوشیمیایی سلول‌های عصبی را تغییر دهند اما تولید تشنج نمی‌کنند (۱۵).

استفاده از تحریک مغناطیسی جمجمه‌ای در سال ۱۹۸۵ توسط بارکر و همکارانش معرفی شد (۱۶). این روش امروزه به طور گسترده‌ای در مطالعه عملکردی سیستم عصبی و حرکتی مورد استفاده قرار گرفته است و به عنوان ابزار تشخیصی در مطالعه سیستم عصبی نیز کاربرد دارد (۱۷). مطالعات زیادی بی‌ضرر بودن این روش درمانی را روی سیستم عصبی نشان دادند (۱۸). بررسی صورت گرفته توسط زایمن و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان داد که استفاده از میدان مغناطیسی جمجمه‌ای می‌تواند از بروز تحریک عصبی در مغز به دنبال مصرف داروهای محرک سیستم عصبی جلوگیری کند (۱۹). مدل‌های حیوانی نشان دادند که استفاده از جریان‌های ضعیف مغناطیسی می‌تواند در درمان بیماران صرعی مفید باشد (۵).

ضمناً این امواج علاوه بر افزایش میزان انتقال دهنده‌های مهاری، اثرات محافظتی نیز بر روی سلول‌های عصبی دارند (۲۰). تا جایی که استفاده مکرر از تحریک مغناطیسی جمجمه‌ای می‌تواند بهبود آسیب‌های ناشی از تشنج را در سلول‌های عصبی تسریع کند (۲۱). کنترل امواج صرعی به کمک تحریک مغناطیسی جمجمه‌ای در بررسی‌های الکتروفیزیولوژی نیز به اثبات رسیده است (۲۲).

در سال ۲۰۰۳، تراگو و همکاران با بررسی بر روی ۱۷ بیمار صرعی مشاهده کردند که مهار معنی‌دار امواج صرعی به دنبال استفاده از جریان‌های ضعیف ناشی از تحریک مغناطیسی جمجمه‌ای بروز می‌کند (۲۳). اغلب مطالعات پیشین بر روی تحریک مغناطیسی جمجمه‌ای با فرکانس‌های پایین صورت گرفته است (۲۴) و نتایج متناقضی در خصوص تأثیر فرکانس‌های بالای این امواج بر روی حملات صرعی گزارش شده است (۲۵، ۲۶). بنابراین تأثیر این امواج با فرکانس‌های بالا در مقابله با حملات صرعی نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

به علاوه بررسی‌های بافت‌شناسی به دنبال استفاده از تحریک مغناطیسی جمجمه‌ای در حملات صرعی جهت تعیین نقش این پدیده در جلوگیری از آسیب‌های مغزی ضروری به نظر می‌رسد. در ضمن آمیگدال از جمله مهم‌ترین مناطق درگیر در بیماران تشنجی است که آسیب دیدگی‌های آن به دنبال تشنج به اثبات رسیده است (۶). ارتباطات گسترده‌ای بین این ناحیه و نواحی دیگر مغز گزارش شده و نقش این ناحیه در حملات صرعی مورد تأکید قرار گرفته است (۲۷). به همین دلیل بررسی اثر پیش‌درمانی تحریک مغناطیسی جمجمه‌ای و نقش آن در آسیب بافتی در تشنج القاء شده با پنتیلین تترازول در منطقه آمیگدال می‌تواند بر حملات صرعی و عوارض ناشی از آن تأثیرگذار باشد.

## مواد و روش‌ها

به منظور اجرای این مطالعه ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم به طور تصادفی به ۴

صرع یکی از شایع‌ترین بیماری‌های سیستم عصبی می‌باشد که ۱ تا ۲ درصد جمعیت جهان را مبتلا کرده است (۱). علل متعددی برای بروز صرع مطرح شده اما در اغلب موارد هیچ علت خاصی یافت نمی‌شود (۲). صرع به صورت حملات ناگهانی و تکرار شونده حسی، حرکتی و اتونومیک یا روانی می‌باشد، که به دنبال تحریک‌پذیری زیاد در گروهی از سلول‌های عصبی بروز می‌کند (۳) و بهترین روش برای تأیید بروز این حملات ثبت اسپایک‌های<sup>۱</sup> غیرطبیعی هنگام ثبت امواج مغزی فرد در حین بروز حمله می‌باشد (۴). این افزایش تحریک‌پذیری سلول‌های عصبی به دنبال برهم خوردن تعادل در ترشح واسطه‌های مهاری و تحریکی بروز می‌کند (۵).

بررسی‌ها نشان دادند که القای حملات تشنجی به وسیله پنتیلین تترازول (PTZ)<sup>۲</sup> سبب آسیب سلولی در بسیاری از نواحی مغز همانند هیپوکامپ، آمیگدال، کورتکس و دیگر ساختارهای سیستم لیمبیک می‌شود (۶). تعداد سلول‌های آسیب دیده با تعداد حملات تشنجی ارتباط مستقیم دارد به طوری که با تکرار حملات میزان آسیب‌های سلولی نیز افزایش می‌یابد (۶، ۷). در این بین آمیگدال یکی از مناطق مناسب برای بروز حملات صرعی در افراد مستعد می‌باشد (۸).

بیماران مبتلا به صرع، نیاز به مصرف منظم داروی ضد تشنج دارند. مصرف این داروها معمولاً به مدت دو تا چهار سال بعد از آخرین حمله تشنج ادامه می‌یابند (۹). در مجموع تشنج حدود ۸۵ درصد این بیماران با یک یا چند دارو کنترل می‌شود و در ۲۰-۱۵ درصد موارد ممکن است با مصرف دارو حتی در دوزهای بالا درمان صورت نگیرد. بسیاری از داروهای رایج در درمان صرع دارای اثرات جانبی مانند خواب‌آلودگی، گیجی، سردرد و افزایش وزن می‌باشند (۱۰). ضمن اینکه در بسیاری از موارد تداخلات دارویی بروز کرده در اثر مصرف داروهای متعدد که با مکانیسم‌های مختلفی عمل می‌کنند، برای بیماران مشکل ساز می‌شود. اگر حملات صرع با دارو کنترل نشوند و تصویربرداری‌های مغزی یک ضایعه مغزی را نشان دهد، ممکن است جراحی نیز مورد استفاده قرار بگیرد (۱۱). در حالی که جراحی نیز اثرات جانبی متعددی به همراه دارد و تنها در ۵ درصد از بیماران مفید می‌باشد (۱۲، ۱۳).

با توجه به اثرات جانبی برخی از داروهای ضد صرع و خروج بخشی از بافت مغز به دنبال جراحی، نیاز مبرمی برای یافتن روش‌های درمانی جدید احساس می‌شود (۱۴). به دلیل نقش پررنگ فعالیت‌های الکتریکی مغز در بیماران تشنجی و همین‌طور ارتباط نزدیک این فعالیت‌ها با غلاف بالینی افراد دچار حملات تشنجی، استفاده از میدان‌های الکتریکی و مغناطیسی می‌تواند کمک کننده باشد. استفاده از تحریک مغناطیسی جمجمه‌ای (TMS)<sup>۳</sup> به صورت سیگنال تک پالسی<sup>۴</sup> یا به صورت مداوم و پیوسته (rTMS)<sup>۵</sup> در درمان برخی از اختلالات سیستم عصبی مورد استفاده قرار گرفته است. این سیگنال‌ها با وجود اینکه قادر

<sup>۱</sup> Spike

<sup>۲</sup> Pentylentetrazole

<sup>۳</sup> Transcranial Magnetic Stimulation

<sup>۴</sup> Single pulse

<sup>۵</sup> Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation

اندازه‌گیری شده به موش‌های صحرایی نمراتی بین ۱ تا ۵ داده شد.

نحوه تخصیص نمرات به آن‌ها پس از تزریق PTZ به این شرح می‌باشد: موش‌هایی که بدون حرکت یا بدون علامت باقی می‌مانند امتیاز ۱، موش‌هایی که حرکات خشک و در نواحی گوش انقباضاتی دارند امتیاز ۲، موش‌هایی که دچار انقباضات شدید دست‌ها شدند امتیاز ۳، موش‌هایی که علاوه بر انقباضات دست‌ها انقباض پا را نیز داشتند امتیاز ۴ گرفتند و در نهایت برای موش‌هایی که از شدت انقباض به پشت افتادند امتیاز ۵ ثبت گردید (۶).

### بررسی‌های بافت شناسی

پس از اتمام دوره مطالعه تمامی موش‌ها با استفاده از دوز کشنده کلرال هیدرات (شرکت سیگما با دوز ۳۵۰ mg/kg) بیهوش و کشته شدند، سپس مغز آن‌ها ابتدا توسط ۲۰۰ میلی‌لیتر سرم رینگر و سپس توسط ۶۰۰ میلی‌لیتر پارافرمالدئید ۴٪ از طریق آئورت بالا رو شسته شده و خارج گردید. مغز موش‌ها به طور کامل و به مدت یک هفته در پارافرمالدئید ۴٪ قرار گرفته تا جهت تهیه مقاطع میکروسکوپی مورد استفاده قرار گیرند. سپس بافت‌های قرار گرفته در پارافرمالدئید پس از طی مراحل تثبیت و قالب‌گیری در پارافین، به صورت مقاطع ۷ میکرونی برش زده شدند. در نهایت تعداد ۶ عدد بافت از هر گروه در مطالعات بافت‌شناسی مورد استفاده قرار گرفتند.

تعداد ۱۲ لام مناسب به روش سریالی انتخاب شد و با رنگ تولوئیدن‌بلو رنگ آمیزی گردید (۲۸). مقاطع رنگ آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. عکس‌های دیجیتالی از مقاطع با استفاده از دوربین (لایکای ژاپن) گرفته شد و در کامپیوتر ذخیره گردید. در بررسی، پارامترهای آسیب سلول‌های عصبی همانند تیره شدن جسم سلولی نورون‌ها همراه با تغییر حجم پریکاریون نورون در آمیگدال مورد ارزیابی قرار گرفت. روش اندازه‌گیری حجم نورونی براساس روش مرسوم در مقالات گذشته صورت گرفت (۳۰، ۲۹).

به طور خلاصه، نرم افزار کامپیوتری (اینفینیتی) خطوطی را به شکل تصادفی بر روی مقاطع میکروسکوپی ایجاد می‌کند که این خطوط دارای نقاط پر رنگی هستند که در مناطقی این نقاط با هسته سلول برخورد کرده، هسته سلول در این نواحی بر روی این خط علامت گذاری می‌شود (تصویر ۱)، سپس میانگینی از طول این خطوط به روش‌های ریاضی محاسبه شده و تحت عنوان حجم سلولی گزارش می‌شود (۳۰).

### آنالیز آماری

امتیازهای ثبت شده از حملات تشنجی در ۴ گروه مورد مطالعه و همین‌طور داده‌های بررسی‌های بافت‌شناسی توسط نرم افزار آماری SPSS 21 مورد بررسی آماری قرار گرفت. امتیازهای در حین تشنج گرفته شده و همچنین تعداد سلول‌های آسیب دیده و حجم نورون‌ها در منطقه آمیگدال به صورت میانگین

گروه ۸ تایی تقسیم شده و به شکل انفرادی در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴۵ تا ۶۵ درصد در یک محیط کنترل شده قرار گرفتند. سیکل نوری ۱۲ ساعته با دسترسی آزاد به آب و غذا برای موش‌ها در نظر گرفته شد. تمامی مراحل آزمایش تحت نظارت کمیته اخلاقی مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا قرار داشت.

در این مطالعه موش‌های صحرایی به چهار گروه تقسیم شدند:

• **گروه سالم:** موش‌های صحرایی این گروه بدون هیچ مداخله پس از طی شدن زمان مورد نظر توسط بیهوشی عمیق با داروی کلرال هیدرات (۳/۵ mg/kg) بیهوش شده و مغز آن‌ها خارج شد.

• **گروه پنتیلن تترازول:** به موش‌های صحرایی این گروه تشنجات تونیک-کلونیک به کمک تزریق تک دوز داخل صفاقی پنتیلن تترازول با دوز (۵۰ mg/kg) القاء گردید. سپس به رفتارهای تشنجی ظاهر شده نمره داده شد و در پایان مغز آن‌ها خارج شد.

• **گروه تحریک مغناطیسی به همراه تزریق پنتیلن تترازول:** موش‌های صحرایی در این گروه ابتدا به صورت مزمن (با فرکانس ۲۰ هرتز و شدت ۵۰۰ میلی‌تسلا به مدت ۱۰ دقیقه و به مدت یک ماه و روزانه) تحت پیش درمانی با تحریک مغناطیسی حجمه‌ای (rTMS) قرار گرفتند، سپس تشنجات تونیک-کلونیک به کمک تزریق تک دوز داخل صفاقی (PTZ) با دوز (۵۰ mg/kg) القاء گردید. سپس به رفتارهای تشنجی ظاهر شده نمره داده شد و در پایان مغز آن‌ها خارج شد.

• **گروه تحریک مغناطیسی:** موش‌های صحرایی این گروه تحت تحریک مغناطیسی حجمه‌ای (با فرکانس ۲۰ هرتز و شدت ۵۰۰ میلی‌تسلا به مدت ۱۰ دقیقه و به مدت یک ماه و روزانه) قرار گرفتند و در پایان مغز آن‌ها خارج شد.

### اعمال تحریک مغناطیسی حجمه‌ای

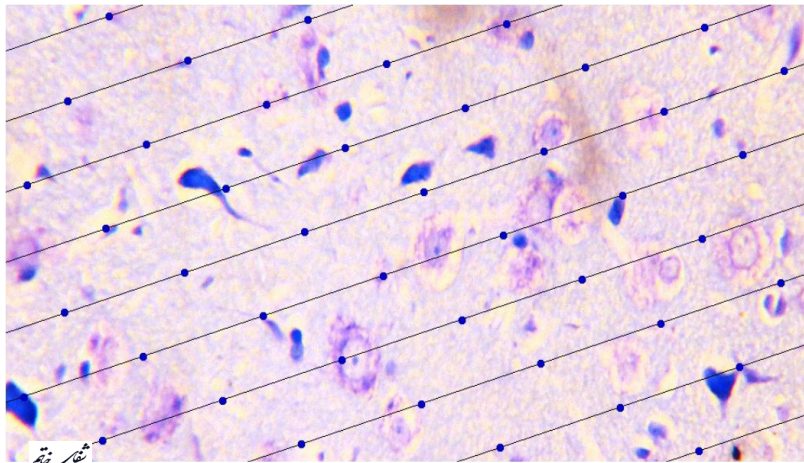
برای اعمال rTMS موش‌های صحرایی در درون محفظه مهارکننده قرار داده شدند و با توجه به آستانه اندازه‌گیری شده به مدت ۱۰ دقیقه تحت تابش با فرکانس ۲۰ هرتز با استفاده از دستگاه (تکولوژی سی آر، سونگنام، کره جنوبی) که با برق ۲۲۰ وات تغذیه شده و حداکثر تا ۳ تسلا خروجی دارد، قرار گرفتند. این روند به مدت ۳۰ روز بر روی موش‌های گروه تحریک مغناطیسی به همراه تزریق پنتیلن تترازول و تحریک مغناطیسی rTMS اعمال گردید.

### ارزیابی رفتارهای تشنجی

پس از پایان دوره پیش درمانی با rTMS ماده تشنج‌زای PTZ به حیوان تزریق شده و به مدت ۲۰ دقیقه رفتارش به کمک دوربین ثبت گردید. در این مدت شروع مراحل تشنجی مورد توجه قرار گرفته و با توجه به شدت تشنج‌های تونیک-کلونیک

<sup>6</sup> Euthanasia

<sup>7</sup> Infinity software



تصویر ۱- عکس میکروسکوپی از ناحیه آمیگدال با بزرگ نمایی (۴۰X) را در نرم افزار ایفینیتی با رنگ آمیزی تولوئیدن‌بلو نشان می‌دهد.

بررسی‌های بافت‌شناسی پس از چهار هفته اعمال rTMS نشان داد که تعداد متوسط سلول‌های تیره در گروه سالم  $0/17 \pm 1/97$ ، در گروه پنتیلین تترازول  $0/41 \pm 4/68$ ، در گروه تحریک مغناطیسی به همراه تزریق پنتیلین تترازول  $0/24 \pm 3/3$  و در گروه تحریک مغناطیسی  $0/11 \pm 2/15$  در میلی‌متر مکعب بود که نشان از افزایش معنی‌دار تعداد متوسط سلول‌های تیره در گروه پنتیلین تترازول در مقایسه با گروه سالم و تحریک مغناطیسی داشت ( $P < 0/001$ ، تصویر ۲ ب). در حالی‌که پیش‌درمانی با تحریک مغناطیسی مجموعه‌ای توانست به طور معنی‌داری از تعداد متوسط سلول‌های تیره شده در مقایسه با گروه پنتیلین تترازول بکاهد ( $P < 0/01$ ، تصویر ۲ ب).

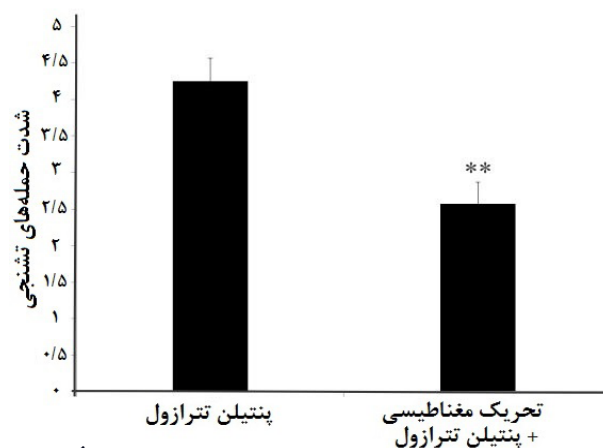
متوسط حجم سلولی (برحسب میکرومتر مکعب) سلول‌های سالم در نمودار ۲ نشان داده شده است. بررسی‌های بافت‌شناسی نشان داد که به دنبال القای تشنج در گروه پنتیلین تترازول، متوسط حجم سلول‌های سالم در ناحیه آمیگدال برابر با  $12/02 \pm 394/14$  بود که در مقایسه با گروه سالم ( $14/89 \pm 536/63$ )

$\pm$  انحراف معیار (Mean  $\pm$  SEM) گزارش شد و توسط آزمون یکطرفه ANOVA آنالیز گردید. ضمناً برای بیان ارتباط بین حجم نورون‌های سالم و تعداد سلول‌های تیره از روش پیرسون استفاده گردید. معیار معناداری برای هر گروه ( $P < 0/05$ ) در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

بررسی امتیازهای تشنجی به دنبال پیش‌درمان و تزریق PTZ نشان داد که شدت حملات تشنجی در گروه پنتیلین تترازول  $0/31 \pm 4/25$  و در گروه تحریک مغناطیسی به همراه تزریق پنتیلین تترازول برابر با  $0/29 \pm 2/5$  بود که نشان از کاهش معنی‌دار شدت این حملات در گروه تحریک مغناطیسی به همراه تزریق پنتیلین تترازول در مقایسه با گروه پنتیلین تترازول بود ( $P < 0/01$ ، نمودار ۱).

تصاویر بافت‌شناسی سلول‌های تیره<sup>۸</sup> شده در ناحیه آمیگدال در گروه‌های مختلف آزمایش در تصویر ۲ الف مشاهده می‌شود.



شکل ۲

نمودار ۱- مقایسه امتیازهای تشنجی ثبت شده به دنبال تزریق داخل صفاقی پنتیلین تترازول که به صورت Mean  $\pm$  SEM نمایش داده شده است. کاهش معنی‌داری در شدت حملات تشنجی به دنبال پیش‌درمان با تحریک مغناطیسی مجموعه‌ای در مقایسه با گروه پنتیلین تترازول مشاهده شد ( $P < 0/01$ ). در نمودار \*\* و \*\*\* به ترتیب نمایانگر  $P < 0/05$ ،  $P < 0/01$  و  $P < 0/001$  می‌باشد.

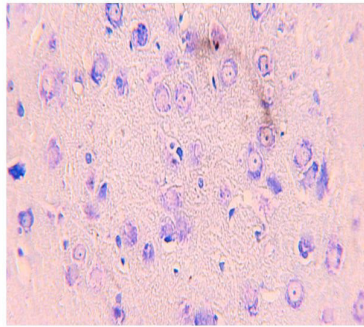
<sup>8</sup> Dark neuron

الف

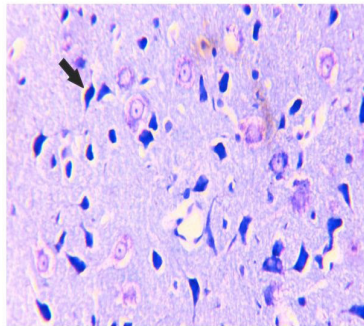
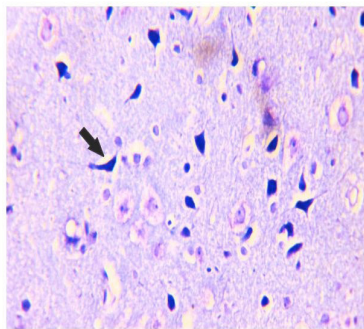
آمیگدال

ب

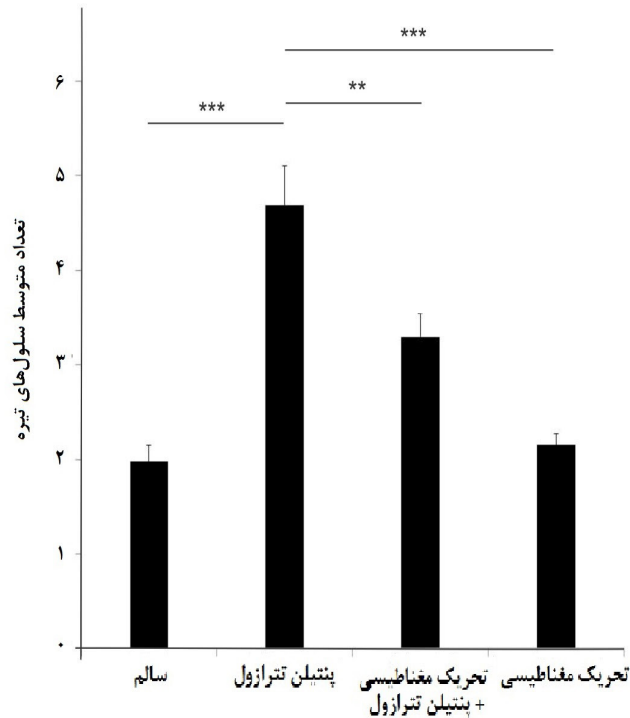
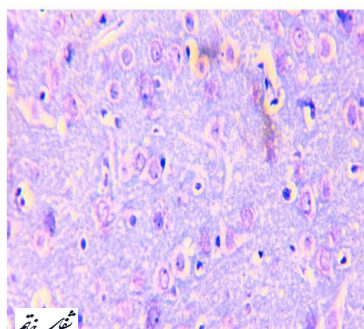
سالم



پنتیلین تترازول

تحریک مغناطیسی  
+ پنتیلین تترازول

تحریک مغناطیسی

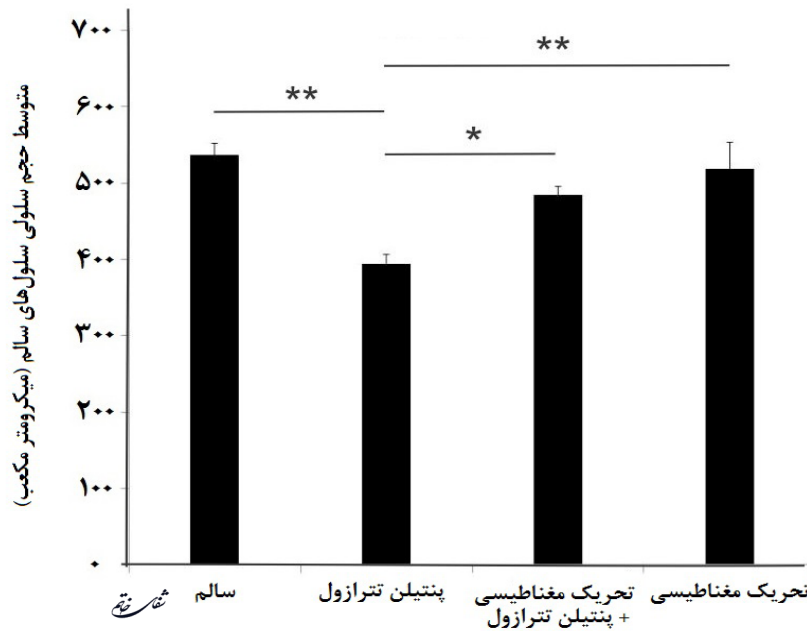


تصویر ۲- الف) عکس میکروسکوپی از ناحیه آمیگدال یا بزرگ نمایی  $40\times$  و رنگ آمیزی تولوئیدین بلو که سلول‌های تیره را با نشانگر نشان می‌دهد. ب) نمودار بیانگر تعداد متوسط سلول‌های تیره در این ناحیه می‌باشد که به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  نمایش داده شده است. بررسی آماری نشان دهنده افزایش متوسط سلول‌های تیره در گروه پنتیلین تترازول در مقایسه با گروه‌های سالم و تحریک مغناطیسی است ( $P < 0.001$ )، در حالی که تعداد سلول‌های تیره شده به دنبال پیش درمان با تحریک مغناطیسی مجموعه‌ای به طور معنی‌داری نسبت به گروه پنتیلین تترازول کاهش یافت ( $P < 0.01$ ). در نمودار \*، \*\* و \*\*\* به ترتیب نمایانگر  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  می‌باشد.

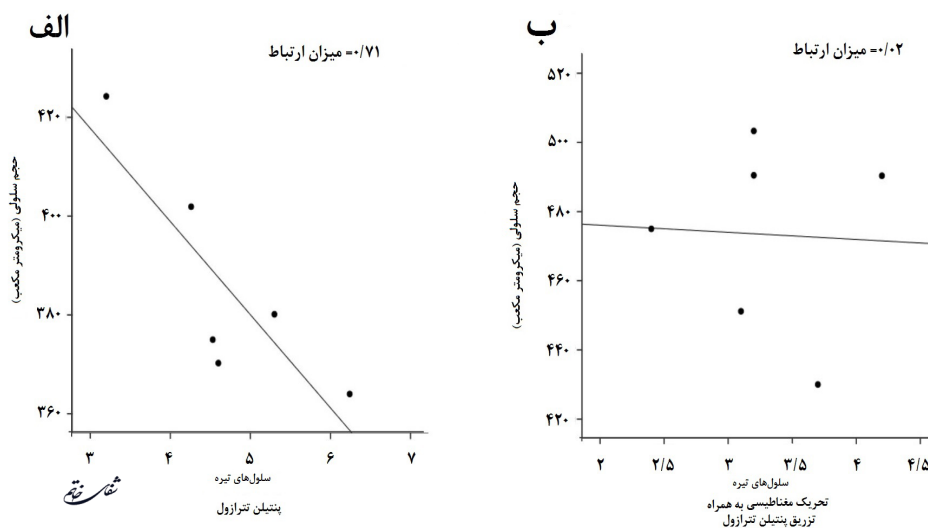
گروه پنتیلین تترازول و در گروه تحریک مغناطیسی به همراه تزریق پنتیلین تترازول در نمودار ۳ نشان داده شده که این ارتباط در گروه پنتیلین تترازول برابر با  $R^2 = 0.71$  ( $P < 0.01$ )، نمودار ۳ الف) که نشان از معنی‌دار بودن ارتباط بین تغییر در حجم سلولی سلول‌های سالم با افزایش تعداد سلول‌های تیره دارد. در حالی که در گروه تحریک مغناطیسی به همراه تزریق پنتیلین تترازول ارتباط معنی‌داری بین تغییرات در حجم

و تحریک مغناطیسی ( $518/25 \pm 34/62$ ) به صورت معنی‌داری کاهش پیدا می‌کند ( $P < 0.01$ )، نمودار ۲). در حالی که امواج ناشی از تحریک مغناطیسی مجموعه‌ای به طور معنی‌داری از کاهش حجم سلولی سلول‌های سالم در گروه پیش درمان (تحریک مغناطیسی به همراه تزریق پنتیلین تترازول) جلوگیری کرد ( $483/83 \pm 11/30$ ) ( $P < 0.05$ )، نمودار ۲).

ارتباط بین سلول‌های تیره و متوسط حجم سلول‌های سالم در



نمودار ۲- بیانگر متوسط حجم سلولی (برحسب میکرومتر مکعب) سلول‌های سالم در ناحیه آمیگدال می‌باشد که به صورت  $Mean \pm SEM$  نمایش داده شده است. بررسی آماری نشان دهنده کاهش متوسط حجم سلول‌های سالم در گروه پنتیلین تترازول در مقایسه با گروه‌های سالم و تحریک مغناطیسی است ( $P < 0.01$ ). در حالی که پیش درمان با تحریک مغناطیسی جمع‌های توانست به طور معنی‌داری از کاهش حجم سلول‌های سالم نسبت به گروه پنتیلین تترازول جلوگیری کند ( $P < 0.05$ ). در نمودار \*، \*\* و \*\*\* به ترتیب نمایانگر  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  می‌باشد.



نمودار ۳- ارتباط بین تغییر در تعداد سلول‌های تیره با حجم سلولی سلول‌های سالم را نشان می‌دهد. نمودار الف) نمایانگر این ارتباط در گروه پنتیلین تترازول است که ارتباط معنی‌داری بین تغییرات در تعداد سلول‌های تیره با حجم سلولی سلول‌های سالم را نشان می‌دهد. در حالی که در نمودار ب) ارتباط معنی‌داری بین تعداد سلول‌های تیره با حجم سلولی سلول‌های سالم در ناحیه آمیگدال در گروه تحریک مغناطیسی به همراه تزریق پنتیلین تترازول مشاهده نمی‌شود.

شدت حملات تشنجی بکاهد و موجب کاهش معنی‌دار سلول‌های تیره در آمیگدال مورد مطالعه گردد.

بررسی‌ها نشان دادند که در هنگام بروز تشنج دو اتفاق اصلی یعنی تحریک پذیری شدید سلول‌های عصبی و همزمانی بین سلول‌هایی که دچار این تحریک پذیری شده‌اند، بروز می‌کند. ضمناً عدم مهار این فعالیت تحریکی شدید و غیر معمول در نورون‌های بعدی نیز در انتشار و عمومی شدن این حملات نقش دارند (۳۱). در هنگام بروز صرع میزان انتقال دهنده‌های تحریکی بالا رفته که با روند این حملات همراهی دارد، در

سلول‌های سالم و تعداد سلول‌های تیره مشاهده نمی‌شود ( $R^2 = 0.02$ ,  $P = 0.84$ ). نمودار ۳ ب).

### بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بررسی‌های ما نشان دادند که تشنج قادر به ایجاد آسیب‌های ساختاری در سلول‌های عصبی در ناحیه آمیگدال مغز می‌باشد، که این موضوع با استفاده از ثبت امتیازهای تشنجی بروز کرده در زمان القای تشنج به دنبال تزریق داخل صفاقی PTZ و همین‌طور بررسی‌های بافت‌شناسی تأیید شد. در حالی که پیش درمان با تحریک مغناطیسی جمع‌های توانست از

نشان دادند که القای این امواج، سطح انتقال دهنده عصبی گابا را از طریق مهار نورون‌ها و بالا بردن میزان سطح یون کلر در داخل سلول و ریولاریزاسیون سلولی به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (۴۰).

مطالعه ما نشان داد که فرکانس‌های بالا قادر به کاهش شدت حملات تشنجی است. از طرفی همان‌طور که اشاره شد، برخی مطالعات تأثیرگذاری فرکانس بالا در افزایش آستانه حملات تشنجی را مورد تردید قرار دادند (۲۵). مطالعه دیگری آزادسازی بیشتر گابا را در فرکانس‌های پایین نشان داد (۴۱). بررسی‌های تازه کلینیکی نشان دادند که تحریک مغناطیسی مجموعه‌ای قادر به افزایش میزان دوپامین است که در بسیاری از داروهای مورد استفاده برای بیماران صرعی مصرف دارد (۴۲، ۴۳).

نتایج به دست آمده در بررسی‌های بافت‌شناسی ما نشان دهنده کاهش تعداد سلول‌های تیره در ناحیه آمیگدال بود که ممکن است به دنبال بالا رفتن میزان این دو انتقال دهنده مهاری در مغز بروز کرده باشد. از طرفی بخش بسیار زیادی از آسیب‌های سلولی به دنبال بروز تشنج را می‌توان با اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها و همین‌طور تولید رادیکال‌های آزاد مرتبط دانست (۴۴). در حالی که تحقیقات صورت گرفته همگی حاکی از نقش محافظتی تحریک مغناطیسی مجموعه‌ای در برابر رادیکال‌های آزاد است (۲۰)، این نتایج نیز در حمایت از کاهش مرگ سلولی در ناحیه آمیگدال می‌تواند نشان دهنده اثرات محافظتی تحریک مغناطیسی مجموعه‌ای به دنبال القای تشنج باشد.

به طور خلاصه تغییر در جریانات مغناطیسی درون مغز توانست از شدت آسیب به سلول‌های عصبی در ناحیه آمیگدال و همین‌طور تشنجات عصبی به دنبال القای تشنج به وسیله PTZ بکاهد. مطالعه حاضر همچنین گویای این مطلب است که شروع درمان با rTMS در مراحل نخستین بروز تشنجات در کودکان و پس از ضربه به سر احتمالاً بتواند از پیشرفت تشنجات، آسیب سلولی و تبدیل شدن آن در دراز مدت به صرع جلوگیری کند. البته این مطالعه از نوع تجربی و آزمایشگاهی بوده و استفاده از rTMS در بالین بیماران تشنجی و صرعی مستلزم مطالعات بالینی بیشتر می‌باشد.

حالی که کاهش انتقال دهنده‌های مهاری نیز از طرف دیگر می‌تواند فرد را برای بروز حملات صرعی مستعد کند (۳۲).

کروچر و همکارانش نقش مهار انتقال دهنده‌های تحریکی را در دو گونه موش خاص مورد بررسی قرار دادند و ابراز داشتند که مهار انتقال دهنده‌های تحریکی توسط آنتاگونیست‌های آن‌ها در هر دو گونه به طور معنی‌داری از بروز صرع جلوگیری می‌کنند (۳۳). در ادامه همین بررسی‌ها نقش گابا و همین‌طور دوپامین به عنوان بازیگران مهم در روند تحریک سلولی مطرح گردید. این بررسی‌ها نشان دادند که هر عاملی که بتواند میزان گابا و دوپامین را در مغز افزایش دهد، می‌تواند تا حد زیادی از شدت صرع بکاهد (۳۴).

در بررسی دیگری سنکار<sup>۹</sup> و همکارانش نشان دادند که القای تشنج سبب مرگ سلولی در نواحی مختلف مغز می‌شود (۳۵). بررسی بافت‌شناسی در تحقیق حاضر نیز بروز مرگ سلولی در ناحیه آمیگدال را به دنبال القای تشنج نشان می‌دهد. این آسیب در برخی نواحی دیگر مغز نیز قبلاً نشان داده شده است (۶۳، ۶۴). تحریک مغناطیسی مجموعه‌ای به عنوان یک ابزار بدون خطر و کارآمد مورد بررسی‌های زیادی قرار گرفته و امروزه نیز در درمان برخی از بیماری‌ها و هم در مطالعه تحریک پذیری قشر مغز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۷، ۱۷). بررسی‌هایی که با فرکانس‌های بالای تحریک مغناطیسی مجموعه‌ای (۲۰ هرتز) صورت گرفت هیچ گونه آسیب سلولی را به دنبال القای این امواج در مغز نشان نداد (۳۸).

بررسی‌های ما نیز عدم بروز آسیب سلولی به دنبال القای تحریک مغناطیسی مجموعه‌ای با فرکانس بالا و در مدت یک ماه را تأیید کرد. اطلاعات به دست آمده از بررسی‌های پیشین نشان می‌دهند که این ابزار در هر دو فرکانس بالا و پایین (۱ هرتز) باعث تغییر در سطح گابا شده و به طور معنی‌داری از شدت حملات صرعی می‌کاهد. هرچند مطالعات نشان دادند که فرکانس‌های پایین موجب بالا رفتن آستانه تحریک‌پذیری سیستم عصبی می‌شود، اما فرکانس‌های بالا تحریک‌پذیری سیستم عصبی را افزایش می‌دهند (۳۹، ۲۶). بررسی‌های پیشین نیز تغییر در سطح انتقال دهنده‌های مهاری به دنبال القای این امواج را در کاهش شدت حملات مورد تأکید قرار دادند (۲۴). فرگنی و همکارانش

## منابع

1. Ding D, Wang W, Wu J, Ma G, Dai X, Yang B, et al. Premature mortality in people with epilepsy in rural China: a prospective study. *Lancet Neurol*. 2006; 5(10): 823-7.
2. Falconer MA, Serafetinides EA, Corsellis JN. Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol*. 1964; 10(3): 233-48.
3. Gorji A, Stemmer N, Rambeck B, Jürgens U, May

<sup>۹</sup> Sankar

- T, Pannek HW, et al. Neocortical microenvironment in patients with intractable epilepsy: potassium and chloride concentrations. *Epilepsia*. 2006; 47(2): 297-310.
4. Sarkisian MR. Overview of the current animal models for human seizure and epileptic disorders. *Epilepsy Behav*. 2001; 2(3): 201-16.
5. Anselmi DJ, Pascual-Leone A, Holmes GL. Anti-

kindling effect of slow repetitive transcranial magnetic stimulation in rats. *Neurosci Lett*. 2003; 351(1): 9-12.

6. Karimzadeh F, Alavi H, Mahmoudian AR, Hassanzadeh G, Hosseini M. The effect of PTZ-induced seizures on neuronal damage in amygdala of rats. *Pharmacologyonline*. 2009; 3: 560-6.

7. Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Meth*. 2008; 172(2): 143-57.

8. Aroniadou-Anderjaska V, Figueiredo TH, Aplan JP, Qashu F, Braga MF. Primary brain targets of nerve agents: the role of the amygdala in comparison to the hippocampus. *Neurotoxicology*. 2009; 30(5): 772-6.

9. Piazzini A, Ramaglia G, Turner K, Chifari R, Kiky EE, Canger R, et al. Coping strategies in epilepsy: 50 drug-resistant and 50 seizure-free patients. *Seizure*. 2007; 16(3): 211-7.

10. Stefan H, Steinhoff B. Emerging drugs for epilepsy and other treatment options. *Eur J Neurol*. 2007; 14(10): 1154-61.

11. Duchowny MS. Surgery for intractable epilepsy: issues and outcome. *Pediatrics*. 1989; 84(5): 886-94.

12. Halasz P, Vajda J, Czirjak S. Surgical treatment of epilepsy. *Ideggyogy Sz*. 2004; 57(5-6): 189-205.

13. Li Y, Mogul DJ. Electrical control of epileptic seizures. *J Clin Neurophysiol*. 2007; 24(2): 197-204.

14. Patsalos PN, Perucca E. Clinically important drug interactions in epilepsy: general features and interactions between antiepileptic drugs. *Lancet Neurol*. 2003; 2(6): 347-56.

15. Markov MS. Magnetic field therapy: a review. *Electromagn Biol Med*. 2007; 26(1): 1-23.

16. Barker AT, Jalinous R, Freeston IL. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet*. 1985; 325(8437): 1106-7.

17. Hallett M. Transcranial magnetic stimulation and the human brain. *Nature*. 2000; 406(6792): 147-50.

18. Kolbinger HM, Höflich G, Hufnagel A, Müller HJ, Kasper S. Transcranial magnetic stimulation (TMS) in the treatment of major depression-a pilot study. *Hum Psychopharm Clin*. 1995; 10(4): 305-10.

19. Ziemann U, Hallett M, Cohen LG. Mechanisms of deafferentation-induced plasticity in human motor

cortex. *J Neurosci*. 1998; 18(17): 7000-7.

20. Post A, Müller MB, Engelmann M, Keck ME. Repetitive transcranial magnetic stimulation in rats: evidence for a neuroprotective effect in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci*. 1999; 11(9): 3247-54.

21. Kinoshita M, Ikeda A, Begum T, Yamamoto J, Hitomi T, Shibasaki H. Low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation for seizure suppression in patients with extratemporal lobe epilepsy-a pilot study. *Seizure*. 2005; 14(6): 387-92.

22. Daniele O, Brighina F, Piazza A, Giglia G, Scalia S, Fierro B. Low-frequency transcranial magnetic stimulation in patients with cortical dysplasia. *J Neurol*. 2003; 250(6): 761-2.

23. Tergau F, Neumann D, Rosenow F, Nitsche MA, Paulus W, Steinhoff B. Can epilepsies be improved by repetitive transcranial magnetic stimulation?-interim analysis of a controlled study. *Suppl Clin Neurophysiol*. 2003; 56: 400-5.

24. Akamatsu N, Fueta Y, Endo Y, Matsunaga K, Uozumi T, Tsuji S. Decreased susceptibility to pentylenetetrazol-induced seizures after low-frequency transcranial magnetic stimulation in rats. *Neurosci Lett*. 2001; 310(2-3): 153-6.

25. Wassermann EM, Lisanby SH. Therapeutic application of repetitive transcranial magnetic stimulation: a review. *Clin Neurophysiol*. 2001; 112(8): 1367-77.

26. Ebert U, Ziemann U. Altered seizure susceptibility after high-frequency transcranial magnetic stimulation in rats. *Neurosci Lett*. 1999; 273(3): 155-8.

27. Gloor P. Role of the amygdala in temporal lobe epilepsy. Aggleton JP. The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction. New York, NY: Wiley-Liss. 1992; p. 505-38.

28. Khodaie B, Lotfinia AA, Ahmadi M, Lotfinia M, Jafarian M, Karimzadeh F, et al. Structural and functional effects of social isolation on the hippocampus of rats with traumatic brain injury. *Behav Brain Res*. 2014; 278C: 55-65.

29. Khodaie B. Dexamethasone multifunctional role in spreading depression. *J Neurol Sci*. 2013; 333: e492.

30. Sadeghian H, Jafarian M, Karimzadeh F, Kafami L, Kazemi H, Coulon P, et al. Neuronal death by repetitive cortical spreading depression in juvenile rat brain. *Exp Neurol*. 2012; 233(1): 438-46.

31. Green R, Wilson W. Asymmetries of beta activity in epilepsy, brain tumor, and cerebrovascular disease. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1961; 13(1): 75-8.
32. Snell LD, Claffey DJ, Ruth JA, Valenzuela CF, Cardoso R, Wang Z, et al. Novel structure having antagonist actions at both the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor and neuronal voltage-sensitive sodium channels: biochemical, electrophysiological and behavioral characterization. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 292(1): 215-27.
33. Croucher M, Collins J, Meldrum B. Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists. *Science*. 1982; 216(4548): 899-901.
34. Löscher W. Influence of pharmacological manipulation of inhibitory and excitatory neurotransmitter systems on seizure behavior in the Mongolian gerbil. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985; 233(1): 204-13.
35. Sankar R, Shin DH, Liu H, Mazarati A, de Vasconcelos AP, Wasterlain CG. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J Neurosci*. 1998; 18(20): 8382-93.
36. Khodaie B, Saba V, Lotfinia A, Karimzadeh F. Cellular protection of transcranial magnetic stimulation in seizures induced rat. *Epilepsia*; 2014; 55(S2): 95.
37. Khodaie B, Saba V, Lotfinia A. Improvement of seizures score by reparative pretreatment by transcranial magnetic stimulation on rat model. *Epilepsia*; 2014; 55(S2): 94.
38. Agnew W, McCreery D. Considerations for safety in the use of extracranial stimulation for motor evoked potentials. *Neurosurgery*. 1987; 20(1): 143-7.
39. Plewnia C, Lotze M, Gerloff C. Disinhibition of the contralateral motor cortex by low-frequency rTMS. *Neuroreport*. 2003; 14(4): 609-12.
40. Fregni F, Pascual-Leone A. Technology insight: noninvasive brain stimulation in neurology-perspectives on the therapeutic potential of rTMS and tDCS. *Nat Clin Pract Neurol*. 2007; 3(7): 383-93.
41. Romero JR, Ansel D, Sparing R, Gangitano M, Pascual-Leone A. Subthreshold low frequency repetitive transcranial magnetic stimulation selectively decreases facilitation in the motor cortex. *Clin Neurophysiol*. 2002; 113(1): 101-7.
42. Strafella AP, Paus T, Barrett J, Dagher A. Repetitive transcranial magnetic stimulation of the human prefrontal cortex induces dopamine release in the caudate nucleus. *J Neurosci*. 2001; 21(15): RC157.
43. Starr MS. The role of dopamine in epilepsy. *Synapse*. 1996; 22(2): 159-94.
44. Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(12): 1951-62.