

بررسی تاثیر محدودیت رژيم غذایی بر رفتار تشنجی در موش صحرایی

The Effect of Caloric Restriction on the Seizure Behaviors in Rats

Sanaz Moghadami^{1,2}, Elham Mohammadzadeh¹, Fariba Karimzadeh^{1,3}ساناز مقدمی^{۱,۲}، الهام محمدزاده^۱، فریبا کریمزاده^{۱,۳}

1. Shefa Neuroscience Research Center, Tehran, Iran.
2. Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran.
3. Iran University of Medical Science, Tehran, Iran.

۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، تهران، ایران.
۲. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳. دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله
دریافت: ۸ دی ۱۳۹۱
پذیرش: ۱۵ اسفند ۱۳۹۱

مقدمه: محدودیت غذایی (CR) یکی از انواع درمان با رژیم غذایی در بیماری های عصبی در نظر گرفته شده است. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر محدودیت غذایی بر رفتار تشنجی القا شده در موش صحرایی می باشد. **مواد و روش ها:** به منظور محدود شدن رژیم غذایی، حیوانات یک روز در میان به مدت ۴ هفته متوالی از آب و غذا محروم شدند. تشنجات نیز به کمک تزریق پنتیلن تترازول (PTZ) القا گردید. تحریم غذایی حیوانات گروه CR1 قبل از تزریق PTZ صورت گرفت. تحریم غذایی حیوانات گروه CR2 بعد از تزریق PTZ صورت گرفت. تحریم غذایی در حیوانات گروه CR3 قبل و بعد از تزریق PTZ انجام پذیرفت. **یافته ها:** نمره ی رفتار تشنجی در حیواناتی که محدودیت غذایی را قبل از تزریق PTZ دریافت کرده بودند، به طور چشمگیری کاهش یافت. **نتیجه گیری:** یافته های این مطالعه حاکی از آن است که محدودیت غذایی می تواند نمره ی رفتار تشنجی را کاسته و ممکن است در درمان صرع های مقاوم به درمان اثر بخش باشد.

کلید واژه:
محدودیت غذایی،
رژیم درمانی،
تشنج.

Article info:

Received: 28 Dec. 2012

Accepted: 5 Mar. 2013

ABSTRACT

Introduction Caloric restriction (CR) has been considered as a kind of diet therapy for some neurological diseases. This study was aimed to investigate the effect of CR on the seizure behavior induced in rats. **Materials & Methods** CR was applied with deprivation of food and water for 24 hours every other day for a period of four weeks. Seizure induced by pentylenetetrazol (PTZ) injection. Animals in CR1 group were accessed caloric restriction before PTZ injection. Animals in CR2 group were accessed caloric restriction after PTZ injection. Animals in CR3 group were accessed caloric restriction before and after PTZ injection. **Results** The scores of seizure behaviors were significantly decreased in groups of animals that received CR before PTZ injection. **Conclusion** These findings suggest the CR reduces scores of seizure behaviour and may be helpful in the refractory epilepsy.

Key words:

Caloric Restriction,
Diet Therapy,
Seizures.

* Corresponding Author:

Fariba Karimzadeh

E-mail: Fariba_karimzade@yahoo.com

• نویسنده مسئول:

فریبا کریمزاده

آدرس الکترونیکی: Fariba_karimzade@yahoo.com

مقدمه:

مواد و روش ها:

حیوانات

در این مطالعه از موش های صحرایی نر نژاد ویستار تهیه شده از دانشگاه علوم پزشکی تهران استفاده شد. تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای ثابت ۲۲ درجه ی سانتی گراد نگهداری شدند. تا یک هفته قبل از شروع آزمایش، حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذای کافی داشتند.

حیوانات هم سن و هم وزن به چهار گروه شش تایی کنترل و سه گروه دارای محدودیت غذایی تقسیم شدند. بعد از ۴ هفته (هفته های ۱-۴) به همه گروه ها یک روز در میان پنتیلین تترازول تزریق شد. برای ۴ هفته بعدی (هفته های ۵-۸) رت های گروه کنترل دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند و گروه های با محدودیت غذایی طولانی تحت برنامه زمان بندی محدودیت غذایی متناوب (۲۴ ساعت دسترسی آزاد به غذا هر ۴۸ ساعت) به صورت زیر قرار گرفتند:

CR1: حیوانات این گروه تحت محدودیت غذایی طولانی برای هفته های ۱-۴ (بدون تزریق پنتیلین تترازول) قرار گرفتند سپس در هفته های ۵-۸ دسترسی آزاد به آب و غذا و القا تشنجات به کمک تزریق یک روز در میان پنتیلین تترازول اعمال گردید.

CR2: حیوانات این گروه در هفته های ۱-۴ بدون تزریق پنتیلین تترازول دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. در هفته های ۵-۸ محدودیت غذایی طولانی و تزریق یک روز در میان پنتیلین تترازول اعمال شد.

CR3: حیوانات این گروه در هفته های ۱-۸ تحت محدودیت غذایی طولانی قرار گرفتند ولی القا تشنجات فقط در هفته های ۵-۸ یک روز در میان اعمال گردید.

تزریق پنتیلین تترازول در روزهای تغذیه آزاد (یک ساعت بعد از دسترسی آزاد به غذا) انجام شد زیرا نشان داده شد تغذیه بعد از محدودیت غذایی طولانی تحریک پذیری مغز را تعدیل می کند. بعد از هر تزریق پنتیلین تترازول رفتارهای تشنجی برای نیم ساعت مشاهده شد و تشنج های حاصل به صورت زیر نمره بندی شدند:

۰ = فاقد تشنج، ۱ = بی حرکتی، ۲ = سفتی بدن، ۳ = خاراندن مکرر، عدم تعادل در دویدن و حرکت سریع سر، ۴ = کلونوس اندام جلو، بلند شدن و افتادن، ۵ = رخداد تکراری رفتار رتبه ۴ و ۶ = تونیک کلونیک شدید. صرع پایدار هرگز اتفاق نیفتاد. میزان مرگ بعد از تزریق پنتیلین تترازول ۱۸ درصد بود.

نهفتگی تشنجات به عنوان زمان بروز تشنجات بر حسب دقیقه بعد از تزریق PTZ تعریف شد. تشنج منتشر با تونوس متقارن اندام جلو و عقب و سپس کلونوس اندام عقبی و پرش تعریف شده بود.

بیماری صرع یکی از شایع ترین بیماری های سیستم عصبی به شمار می رود و از نظر بالینی با وجود تشنجات خود به خودی و راجعه، تشنج تعریف می شود. مطالعات انجام گرفته بر روی پیش آگهی درمان صرع نشان دادند که تقریباً ۳۰٪ بیماران با مصرف داروهای ضد صرع، به بهبود کامل دست نیافتند. گزینه های درمانی برای این بیماران محدود و احتمالاً شامل جراحی، تحریک واگ و کنترل رژیم غذایی می باشد. بیماران صرعی قرن ها توسط رژیم های غذایی تغییر یافته یا محدود شده درمان شده اند (۱). گزارشات اولیه تاثیر گرسنگی بر صرع به قرن پنجم بر می گردد، که درمان تشنج ها در یک مرد توسط پرهیز از تمامی غذاها و نوشیدنی ها را گزارش داده اند (۱). بهبود تشنج ها در ۲۰ مورد از ۲۶ بیمار روزه دار به مدت ۲۰ روز گزارش شد و البته دو مورد از این بیماران برای بیش از یک سال بدون تشنج باقی ماندند (۲). رژیم کتوژنیک که رژیمی با چربی بالا و کربوهیدرات محدود می باشد حدود صد سال در درمان صرع دوران کودکی استفاده می شد (۳، ۴). همچنین در پیشگیری از تشنج القا شده توسط پنتیلین تترازول (PTZ) در رت های جوان موثر بوده است اما فقط زمانی که کالری مصرفی حیوانات به ۲۵-۲۰ درصد معمول آن کاهش یافته بود (۵، ۶). رژیم محدودیت کالری، شامل روزه داری دوره ای راهبرد دیگری است که تاثیرات عمیق بر عملکرد مغز و آسیب پذیری نسبت به آسیب ها و بیماری ها دارد (۷). یافته های بحث برانگیزی در مورد اثر ضد صرع و اثرات محافظ عصبی رژیم روزه داری طولانی در مدل های مختلف صرع وجود دارد. برخی مطالعات فواید احتمالی روزه داری طولانی در درمان صرع را نشان داده اند که باعث کاهش فرکانس تشنج و بروز آن و آسیب سلولی می شود. روزه داری طولانی، موش های صحرایی را نسبت به القای صرع پایدار مقاوم کرده و فرایند ایجاد صرع در مدل پیلوکارپین صرع لوب تمپورال در موش های صحرایی را طولانی نموده است (۸). در مقابل روزه داری طولانی تاثیری بر شروع تخلیه های الکتریکی انفجاری ایجاد کننده صرع با افزایش منیزیم خارج سلولی ندارد (۹، ۱۰). هشت هفته بعد از روزه داری طولانی، موش های صحرایی بالغ بعد از تزریق داخل هیپوکمپ اسید کاینیک، در برابر تخریب عصبی محافظت شدند (۱۱).

اثرات سودمند محدودیت غذایی طولانی به فاکتورهای متعددی از جمله مدت و نوع محدودیت کالری بستگی دارد (۱۲). تفاوت ها در اثرات ضد صرع و محافظت عصبی محدودیت غذایی طولانی در طی تشنج های مکرر ممکن است به علت الگوهای محدودیت غذایی مختلف باشد. این مطالعه به منظور بررسی تاثیرات الگوهای مختلف محدودیت غذایی طولانی بر تشنج های القا شده توسط پنتیلین تترازول در موش های صحرایی بالغ طراحی شده است.

مطالعات بافتی

۱۰ میدان میکروسکوپی به روش سیستماتیک تصادفی یکنواخت در هر منطقه انتخاب شدند. با استفاده از قاب شمارش، بدون سوگیری و قانون شمارش نمونه برداری فیزیکی، نورون های تیره در هر تصویر شمارش شدند (۱۴).

تجزیه و تحلیل داده ها

داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نمایش داده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از آزمون یک طرفه (ANOVA) و پس از آن آزمون تعقیبی توکی انجام شد. معیار معنی داری آماری $P \leq 0.05$ بود. این مطالعه توسط کمیته دانشگاه علوم پزشکی تهران به تصویب رسید.

یافته ها

اثر محدودیت غذایی بر شدت تشنجات

در این مطالعه، تمام حیوانات رفتار تشنجی معمول پس از تزریق پنتیلن تترازول داشتند. مدت زمان نهفتگی بین تزریق پنتیلن تترازول و شروع تشنج، توسط محدودیت غذایی طولانی در تمام گروه ها (CR1-CR3) در مقایسه با حیوانات گروه کنترل تحت تاثیر قرار نگرفت ($P=0.86$ ، آزمون ANOVA).

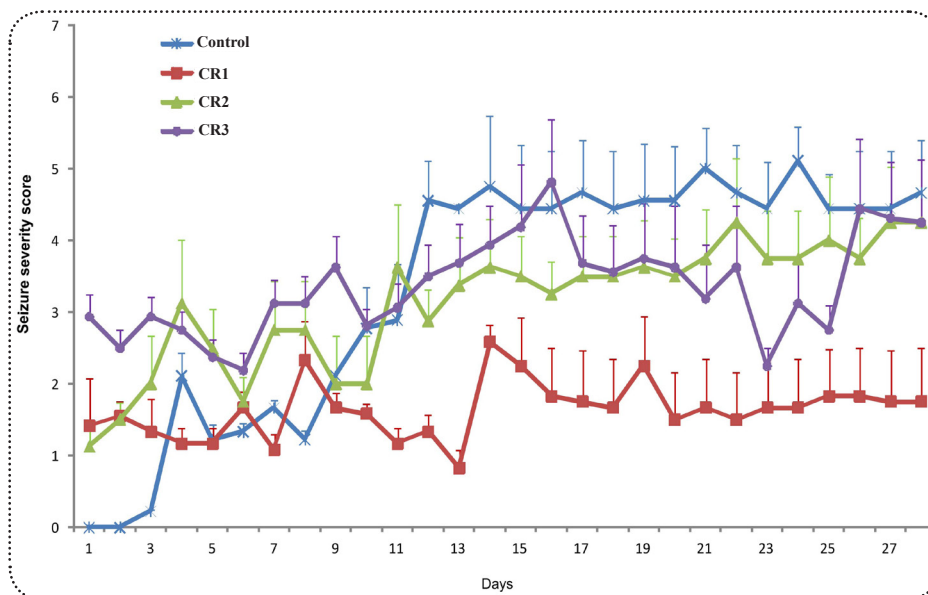
محدودیت غذایی طولانی همچنین در طول مدت تشنج در گروه های CR1، CR2، CR3 نسبت به گروه کنترل تاثیری نداشت ($P=0.75$ ، آزمون ANOVA). هنگامی که محدودیت

حیوانات تحت بیهوشی عمیق با کلرال هیدرات (۳۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) قرار گرفتند. محلول سرم فیزیولوژیک به میزان ۲۰۰ سی سی از طریق سیستم قلبی عروقی تزریق گردید. به دنبال آن محلول فیکساتیو پارافمالدئید ۴ درصد به میزان ۶۰۰ سی سی وارد سیستم قلبی عروقی گردید. سپس سر حیوانات جدا شده و مغز آن ها خارج گردید و در داخل محلول فیکساتیو پارافمالدئید ۴ درصد به مدت حداقل یک هفته نگهداری شد و سپس مطالعات بافتی به صورت زیر انجام شد. برش های بافتی به صورت پشت سر هم (سریال) با ضخامت ۸ میکرومتر در فاصله ۳/۲ تا ۳/۴ میلی متر عقب تر از برگما (Bregma) تهیه شد (۱۳). لام ها توسط کریزل و بولت رنگ آمیزی شدند و با روش نمونه گیری تصادفی سیستماتیک یکنواخت انتخاب شدند. منطقه هیپوکمپ با یک میکروسکوپ نوری (BX51, OLYMPUS, JAPAN) مجهز به دوربین دیجیتال مورد بررسی قرار گرفتند.

عکس های دیجیتال با استفاده از عدسی های شیئی با بزرگنمایی $\times 40$ گرفته شد. بزرگنمایی با استفاده از یک میکرومتر محاسبه شد.

روشهای استریولوژیک و نمونه برداری بدنی

ده جفت از مقاطع با فاصله ۸ میلی متر، از هر مغز انتخاب شد. اولین نمونه هر جفت به عنوان مرجع و نمونه دوم برای مقایسه مورد استفاده قرار گرفت. در هر جفت از مقاطع، حداقل



شماره

نمودار ۱. رتبه بندی شدت تشنجات به دنبال تزریق چهار هفته ای PTZ. شدت تشنجات در گروه CR1

نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نمایش داده شده است.

محدودیت غذایی طولانی به طور قابل توجهی تراکم نورون های تیره را در منطقه CA1 از هیپوکمپ در CR2 و CR3 کاهش داد ($P = 0/001$ ، آزمون ANOVA). تراکم نورون های تیره در منطقه CA3 در CR1، CR2، CR3 نیز به طور قابل توجهی کاهش یافت ($P < 0/001$ ، آزمون ANOVA، تصویر ۱).

بحث و نتیجه گیری

یافته های ما نشان داد که الگوهای مختلف محدودیت غذایی طولانی می توانند اثرات ضد تشنجی و محافظت نورونی متفاوتی در مناطق مختلف مغز داشته باشند. محدودیت غذایی طولانی بیشتر اثرات محافظت نورونی در نورون های هرمی هیپوکمپی CA1 و CA3 داشتند (تصویر ۱). این امر بیانگر آن است که آزمایش های تجربی برای تشخیص آسیب مغزی یا شدت تشنج می تواند نتایج مختلفی را نشان دهد. برای مثال در موقعیتی که روزه داری پیش از القای تشنج انجام شده، شدت تشنج به طور چشمگیری کم شده است. وقتی محدودیت غذایی در طول و یا قبل از القای تشنجات اعمال شد، نورون های تیره به طور مشابهی کم شدند. به نظر می رسد که سهم عمده ای از تاثیرات محدودیت غذایی بر نورون ها حاصل پاسخ استرس سلولی است که در آن مقدار پروتئین چاپرون و عامل های نوروتروپیک زیاد می شوند و بقای

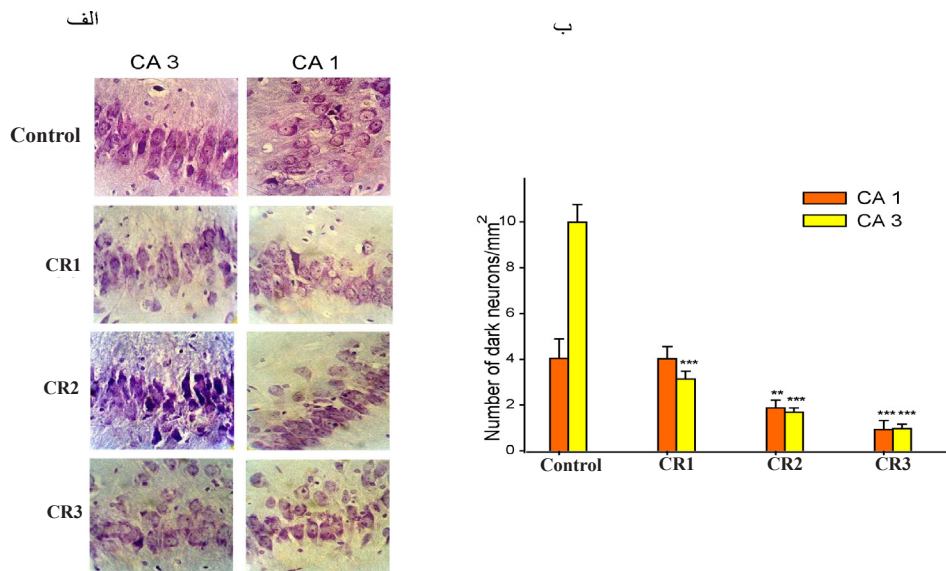
غذایی طولانی ۴ هفته قبل از القاء تشنج داده شد (CR1)، شدت حملات تشنج بین روزهای ۸ و ۲۹ بعد از تزریق پنتیلین تترازول به طور قابل توجهی کاهش یافته بود.

در گروه CR3 که محدودیت غذایی طولانی قبل و بعد از تزریق پنتیلین تترازول داده شده بود، شدت حملات تشنج بین روزهای ۱۶ و ۲۶ پس از تزریق پنتیلین تترازول به میزان قابل توجه کاهش یافته بود ($P = 0/003$ ، آزمون ANOVA، نمودار ۱).

اثر محدودیت غذایی در بقای نورون

سلول های عصبی تیره با سیتوپلاسم اسید دوست و هسته تکه تکه، به طور معمول برای نشان دادن تغییرات ریختی واضح نورون های آسیب دیده به دنبال انواع بسیاری از آسیب ها شناخته شده است.

در بافت مغزی فیکس شده، نورون تیره در صرع، ایسکمی، هیپوگلیسمی، قرار گرفتن در معرض تحریک کننده اسیدهای آمینه و آسیب مکانیکی عصبی دیده شده اند (۱۳). به منظور بررسی اثر محدودیت غذایی طولانی بر آسیب عصبی به دنبال تشنج، تراکم نورون های تیره در لایه هرمی CA1 و CA3 از منطقه هیپوکمپ مورد بررسی قرار گرفت و بین گروه های مختلف مقایسه شد.



تصویر ۱:

اثر محدودیت غذایی متناوب بر تراکم نورون های تیره در منطقه هیپوکمپ به دنبال القا تشنج. الف) نمونه ای از عکس های گرفته شده به کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 40$. ب) میانگین تعداد نورون های تیره در منطقه هیپوکمپ. میانگین تعداد نورون های تیره در گروه های CR2 و CR3 در منطقه CA1 و CA3 به شکل معنی داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است. در گروه CR1 تنها در منطقه CA3 تعداد نورون های تیره کاهش یافته است. * و *** و **** ترتیب بیانگر $P < 0/001$ و $P < 0/0001$ می باشد.

منابع

1. Cross, JH. Dietary therapies--an old idea with a new lease of life. *Seizure*. 2010; 19: 671-4.
 2. Guelpa G, Marie A. La lutte contre l'épilepsie par la desintoxication et par la reeducation alimentaire [The fight against epilepsy by detoxification and by food reduction]. *Rev Ther Med Chir (Paris)*. 1911; 78: 8-13.
 3. Schwartzkroin PA. Mechanisms underlying the anti-epileptic efficacy of the ketogenic diet. *Epilepsy Res*. 1999; 37:171-80.
 4. Neal EG, Cross JH. Efficacy of dietary treatments for epilepsy. *J Hum Nutr Diet*. 2010; 23: 113-9.
 5. Bough KJ, Valiyil R, Han FT, Eagles DA. Seizure resistance is dependent upon age and calorie restriction in rats fed a ketogenic diet. *Epilepsy Res*. 1999; 35: 21-8.
 6. Mantis JG, Centeno NA, Todorova MT, McGowan R, Seyfried TN. Management of multifactorial idiopathic epilepsy in EL mice with caloric restriction and the ketogenic diet: role of glucose and ketone bodies. *Nutr Metab (Lond)*. 2004; 1: 11.
 7. Mattson MP, Duan W, Guo Z. Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms. *J Neurochem*. 2003; 84: 417-31.
 8. Parinejad N, Keshavarzi S, Movahedin M, Raza M. Behavioral and histological assessment of the effect of intermittent feeding in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*. 2009; 86: 54-65.
 9. Yanai S, Okaichi Y, Okaichi H. Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats. *Neurobiol Aging*. 2004; 25: 325-32.
 10. Khaleghi Ghadiri M, Tutam Y, Wassmann H, Speckmann EJ, Gorji A. Periodic fasting alters neuronal excitability in rat neocortical and hippocampal tissues. *Neurobiol Dis*. 2009; 36: 384-92.
 11. Bruce-Keller AJ, Umberger G, McFall R, Mattson MP. Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Ann Neurol*. 1999; 45: 8-15.
 12. Hartman AL, Zheng X, Bergbower E, Kennedy M, Hardwick JM. Seizure tests distinguish intermittent fasting from the ketogenic diet. *Epilepsia*. 2010; 51: 1395-402.
 13. Jafarian M, Rahimi S, Behnam F, Hosseini M, Haghiri H, Sadeghzadeh B, Gorji A. The effect of repetitive spreading depression on neuronal damage in juvenile rat brain. *Neuroscience*. 2010; 169: 388-94.
- سلولی را افزایش می دهند (۱۶، ۱۵). پاسخ استرس سلولی می تواند توسط یک استرس متابولیکی ملایم تحریک شود که مربوط به روزه داری یا استرس فیزیولوژیکی حاصل از گرسنگی یا تشنگی است (۷).
- پاسخ های مختلف رفتاری و فیزیولوژیکی به روزه داری یا محدودیت غذایی طولانی به طور جدی به مدت درمان بستگی دارد. در پایان ۱۲ روز محدودیت غذایی طولانی تغییری در لپتین در گردش و سطح انسولین مشاهده نشده است.
- علاوه بر این، پس از محدودیت غذایی متناوب دراز مدت (۶ هفته)، سطوح لپتین افزایش می یابد (۱۷). تزریق داخل صفاقی لپتین، سبب کاهش آسیب سلولی به دنبال صرع پایدار القا شده با اسید kainic شده است (۱۸). محتوای گلیکوژن کبد در همستر طلایی نر و ماده با محدودیت غذایی متناوب، پس از ۶ هفته محدودیت غذایی متناوب با دسترسی به غذا به مدت ۳ روز در هفته افزایش یافته است (۱۹). سطح سرمی اینترلوکین ۶ و پروتئین واکنشی C پس از ۳ هفته محدودیت غذایی طولانی در انسان در هر دو جنس، به طور قابل توجهی کاهش می یابد (۲۰). افزایش موج مهاری شبکه سیناپسی هیپوکمپ پس از ۴ هفته محدودیت کالری در موش گزارش شده است (۲۱). اثرات ضد صرعی الگوهای مختلف محدودیت کالری معمولاً پس از چند ماه مشاهده شده است (۲۲). تحقیقات قبلی نشان داده اند که مصرف کالری محدود میزان نوروترانسمیتر مهاری گابا را در مغز افزایش می دهد (۲۳). در مقایسه با نتایج ما، برنامه کوتاه مدت محدودیت غذایی در موش ها نوروں ها را در برابر آسیب تحریکی ناشی از تزریق پیلوکارپین محافظت نمی کند (۸). وقتی موش ها در یک محدودیت غذایی طولانی برای چند ماه نگهداری می شدند، کاهش آسیب مغز و بهبود نتیجه رفتاری پس از ایسکمی کانونی گذرا دیده می شد (۱۶، ۱۵). پیشنهاد شده است که بسیاری از اثرات سودمند رژیم محدودیت غذایی طولانی ممکن است از یک پاسخ استرس سلولی القا شده توسط محدودیت غذایی ایجاد شود. استرس، سطح پروتئین های Chaperones و عوامل نوروتروفیک به دنبال یک رژیم محدودیت غذایی را افزایش می دهد (۲۴، ۲۵). اثر برتر ضد تشنج و محافظت نورونی رژیم محدودیت غذایی طولانی در مقایسه با یک رژیم محدودیت غذایی کوتاه تر ممکن است به علت افزایش مقاومت به استرس سلولی باشد. داده های ما اثرات ضد تشنج و محافظت نورونی رژیم محدودیت غذایی طولانی در تشنج القا شده توسط پنتیلن تترازول را نشان می دهد. البته نیاز به مطالعات بیشتری اختصاصاً جهت تعیین نقش محدودیت غذایی طولانی و متناوب در صرع انسان وجود دارد.

14. Braendgaard H, Gundersen HJ. The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *J Neurosci Methods*. 1986; 18: 39-78.
15. Lowenstein DH, Chan P., Miles M. The stress protein response in cultured neurons: characterization and evidence for a protective role in excitotoxicity. *Neuron*. 1991; 7:1053-60.
16. Lowenstein DH, Gwinn RP, Seren MS, Simon TK. McIntosh Increased expression of mRNA encoding calbindin-D28K, the glucose-regulated proteins, or the 72 kDa heat-shock protein in three models of acute CNS injury. *Mol Brain Res*. 1994; 22: 299-308
17. Zhang LN, Mitchell SE, Hambly C, Morgan DG, Clapham JC, Speakman JR. Physiological and behavioral responses to intermittent starvation in C57BL/6J mice. *Physiol Behav*. 2012; 105: 376-87.
18. Bough KJ, Schwartzkroin PA, Rho JM. Calorie restriction and ketogenic diet diminish neuronal excitability in rat dentate gyrus in vivo. *Epilepsia*. 2003; 44: 752-60.
19. Seidenbecher T, Balschun D, Reymann KG. Drinking after water deprivation prolongs «unsaturated» LTP in the dentate gyrus of rats. *Physiol Behav*. 1995; 57: 1001-4.
20. Haase L, Cerf-Ducastel B, Murphy C. Cortical activation in response to pure taste stimuli during the physiological states of hunger and satiety. *Neuroimage*. 2009; 44: 1008-21.
21. Aksungar FB, Topkaya AE, Akyildiz M. Interleukin-6, C-reactive protein and biochemical parameters during prolonged intermittent fasting. *Ann Nutr Metab*. 2007; 51: 88-95.
22. Cheng CM, Hicks K, Wang J, Eagles DA, Bondy CA. Caloric restriction augments brain glutamic acid decarboxylase-65 and -67 expression. *J Neurosci Res*. 2004; 77: 270-6.
23. Mattson MP. Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. *Annu Rev Nutr*. 2005; 25: 237-60.
24. Juge N, Gray JA, Omote H, Miyaji T, Inoue T, Hara C, Uneyama H, Edwards RH, Nicoll RA, Moriyama Y. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron*. 2010; 68: 99-112.
25. Karimzadeh F, Jafarian M, Gharakhani M, Razeghi Jahromi S, Mohamadzadeh E, Khallaghi B, et al. Behavioural and histopathological assessment of the effects of periodic fasting on pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *Nutr Neurosci*. 2013; 16(4): 147-52.