فصلنامه علمی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۶۳، دوره ۱۶، شماره ۳، تابستان۱۴۰۲، صفحه ۱۲۶ تا ۱۳۴
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

مطالعه اثر تحریک الکتریکی با فرکانس پائین بر میزان بیان گیرنده های کانابینوئیدی CB2 در شکنج دندانه دار درطی کیندلینگ مسیر پرفورنت در موش صحرایی

پرستو مردانی [۱] ، سید جواد میرنجفی زاده [۲]

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. نویسنده مسئول: Mardani24826@pnu.ac.ir
۲- استاد گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۲/۰۱/۱۰ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۵**

چکیده

زمینه و هدف : تحریکات با فرکانس پایین(LFS)، تغییرات القا شده توسط کیندلینگ هیپوکمپ در موش‌های صحرایی را کاهش داده و از گسترش فعالیت تشنجی جلوگیری نموده است. در این مطالعه، به منظور بررسی مکانیسم اثرات مهاری LFS بر اکتساب تشنج‌های ناشی از کیندلینگ مسیر پرفورنت در موش‌های صحرایی نر، اثر گیرنده‌های اندوکانابینوئیدی CB2 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: حیوانات جهت القای صرع با استفاده از امواج الکتریکی کیندل شدند و پاسخ های الکتریکی ناحیه شکنج دندانه دار ثبت شد. حیوانات شامل چهار گروه کیندل، کیندل + LFS (KLFS)، LFS و کنترل بودند. در گروه KLFS، ۵ دقیقه بعد از اتمام تحریکات کیندلینگ، LFS (امواج مربعی با فرکانس ۱ هرتز، مدت پالس ۰/۱ میلی ثانیه، ۸۰۰ پالس) اعمال شد. در پایان آزمایش، بعد از فیکس کردن حیوانات با روش پرفیوژن داخل قلبی با پارافرمالدئید ۴٪، نیمکره های مغزی با روش ایمونوهیستوفلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج : کاربرد LFS در گروه KLFS پارامترهای تشنجی را به طور معنی داری کاهش داد. بر اساس یافته‌های ایمونوفلورسنت، میزان بیان گیرنده های CB2 در ژیروس دندانه دار هیپوکمپ حیوانات گروه KLFS، بعد از اعمال LFS در مقایسه با گروه کنترل تغییری نداشت در حالیکه نسبت به گروه کیندلینگ افزایش معنی داری داشت.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می رسد که LFS برهمکنشی با گیرنده های اندوکانابینوئیدی CB2 نداشته باشد ولی در شرایط پاتولوژیک کیندلینگ، LFS ممکن است تا حدودی با افزایش میزان بیان گیرنده های اندوکانابینوئیدی CB2 تا سطح بیان نرمال، در مهار تشنج اعمال اثر نماید اگر چه این افزایش میزان بیان، متفاوت از شرایط عادی نبود.

کلید واژه: تحریکات با فرکانس پایین، کیندلینگ، گیرنده کانابینوییدی، مسیر پرفورنت، موش صحرایی

مقدمه:

صرع لوب گیجگاهی اغلب به دنبال اختلالات مغزی مانند سکته، تروما و بیماری‌های نورودژنراتیو ایجاد می شود و از جمله شایع‌ترین اختلال صرعی در بالغین است که کیفیت زندگی بیماران صرعی را به طور جدی تحت تأثیر قرار می دهد (۱). بنابراین، نیاز فوری به توسعه روش های نوین و داروهای جدید برای مدیریت و کنترل صرع مقاوم به درمان وجود دارد. استفاده از جریانهای الکتریکی یکی از روشهای درمانی است که در دو دهه اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از لحاظ بالینی و آزمایشگاهی مشاهده شده که تحریک با فرکانس پائین (LFS) اثر مهاری بر کانون صرع دارد (۲, ۳). اشکال مختلف شکل پذیری سیناپسی از قبیل تضعیف طولانی مدت (LTD) و تضعیف پس از تقویت در نواحی مختلف مغزی توسط LFS در invitro و in vivo بوجود آمده است که به عنوان مکانیسمهای احتمالی LFS در نظر گرفته شده اند (۴ و ۵).

در مطالعه Szabo و همکاران در سال ۲۰۰۶، دخالت اندوکانابینوئید 2-AG در LTD القا شده توسط LFS مطرح شده است (۶). همچنین مشخص شده است که کاربرد LFS در ورودی های Temperoammonic به ناحیه CA1 هیپوکمپ باعث تضعیف پس از تقویت می شود و این فرایند با میانجی گری اندوکانابینوئیدها صورت می گیرد (۷). در مطالعه Mardani و همکاران در سال ۲۰۱۸، پیشنهاد شده است که LFS حداقل بخشی از اثر ضد تشنجی خود را از طریق گیرنده های کانابینوئیدی نوع I اعمال می نماید (۸). استفاده از کانابینوئیدها به عنوان داروی ضدتشنج به دوران باستان برمی گردد (۹) و در طی دهه های اخیر نیز مطالعات بالینی و آزمایشگاهی متعددی در این خصوص انجام شده است. CB_1 و CB2 دو گیرنده اصلی سیستم اندوکانابینوییدی می باشند (۱۰). گیرنده CB1 تعدیل کننده انتقالات عصبی در بخش‌های مختلف مغز بوده (۱۱) اما گیرنده CB2 به طور عمده در بافت‌های محیطی و سلول‌های ایمنی وجود دارد(۱۲). اخیراً، طبق شواهد، توزیع گیرنده های CB2در سیستم اعصاب مرکزی در تراکم کمتری نسبت به گیرنده CB1 گزارش شده است (۱۲-۱۵) .در مطالعات مدل‌های حیوانی و کشت‌های عصبی مشخص شده است که کانابینوییدها می توانند در تنظیم طول تشنج و خاتمه آن مداخله کنند (۱۵ و ۱۶). نتایج مطالعات Wendt و همکاران نشان داد که آگونیست گیرنده CB1 (WIN55.212-2)، پیشرفت کیندلینگ را به تاخیر انداخته و همچنین در به تاخیر انداختن پیشرفت شبکه صرعی نیز تاثیر داشته است (۱۷). در مقایسه با گیرنده های CB1، گیرنده های مرکزی CB2 ویژگی های منحصر به فردی را نشان می دهند و از آنجایی که سطوح بیان پایینی را در مغز در شرایط عادی نشان می‌دهند، اما در طول حالت‌های مختلف بیماری بسیار قابل القا هستند و به نظر می‌رسد که بستر مهمی برای محافظت عصبی باشند (۱۸). شواهد در حال ظهور نشان داده اند که گیرنده های CB2 در فعالیت صرع در مدل های حیوانی نقش دارند. در موش های در حال رشد، Huizenga و همکاراندر سال ۲۰۱۷، اثرات ضد تشنجی انواع لیگاندهای کانابینوئید را بررسی کرد و دریافت که ترکیبی از آگونیست های گیرنده های CB1/CB2 اثرات ضد تشنجی را در مدل تشنج شیمیایی القا شده با متیل-۶،۷-دی متوکسی-۴-اتیل-بتا-کربولین-۳-کربوکسیلات نشان می دهند (۱۹). اگرچه آگونیست انتخابی (HU-308) اثر ضد تشنجی را نشان نداد، آنتاگونیست انتخابی گیرنده CB2 (AM630) شدت تشنج

را افزایش داد (۱۹). در مطالعات اخیر نقش‌های جدید گیرنده CB2در تحریک پذیری سلول‌های هرمی هیپوکامپ و مهار تشنج‌های صرع شناسایی شده است (۲۰). بررسی مکانیسمهای ملکولی فرایندهای سلولی که توسط سیستم کانابینوئیدی واسطه گری می شود، قطعاً ما را در درک بهتر مکانیسم ملکولی عملکرد ضدتشنجی LFS یاری می رساند. لذا با توجه به اثرات ضد تشنجی بارز کانابینوئیدها این سوال مطرح می‌شود که آیا گیرنده های کانابینوئیدی CB2 در اثرات مهاری LFS به دنبال تحریکات کیندلینگ نواحی هیپوکمپ و مهار صرع زایی نقش دارد؟

مواد و روشها:

در تحقیق حاضر، موش‌های صحرایی نر با نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۲۷۰ گرم در شروع آزمایشات مورد بررسی قرار داده شدند. پس از بی هوش کردن حیوان و قرار دادن درون دستگاه استریوتاکسی، یک الکترود دو قطبی در مسیر پرفورنت و یک الکترود یک قطبی در ناحیه ژیروس دندانه‌دار در سطح جمجه بر اساس اطلس Paxinos و Watson قرار داده شد (۲۱). پس از ۱۰ روز جهت بهبودی زخم ها و دست آموز شدن، برای تحریک حیوانات از دستگاه Electromodule R12 (ساخت شرکت Science Beam، ایران) و موج مربعی تک فازی با مشخصات فرکانس ۵۰ هرتز، شدت آستانه تولید امواج تخلیه متعاقب، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و به مدت ۳ ثانیه استفاده شد (۲۲). به فاصله هر ۱۰ دقیقه یک‌بار و ۱۲ بار در روز، تحریک کیندلینگ انجام شده و تا زمان نشان دادن مرحله ۵ تشنج، تحریک‌ها ادامه داشت. امواج تخلیه متعاقب پس از اعمال هر تحریک کیندلینگ توسط آمپلی فایر تقویت و توسط برنامه کامپیوتری ثبت می‌شدند. یادداشت مراحل تشنج نیز بر اساس طبقه بندی Racine بود (۲۳). هر روز ۵ دقیقه پس از پایان ۱۲ تحریک کیندلینگ، LFS به صورت ۴ بسته تحریکی که هر بسته شامل امواج مربعی با فرکانس ۱ هرتز، مدت پالس ۰/۱ میلی ثانیه، شدت آستانه ایجاد تخلیه متعاقب و ۲۰۰ پالس است، هر ۵ دقیقه یک‌بار به حیوان اعمال می‌شد. در پایان آزمایش برای نمونه های مغزی تهیه شده، پس از فیکس کردن، دپارافینه کردن و آبدهی، رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوفلورسنت انجام گردید.

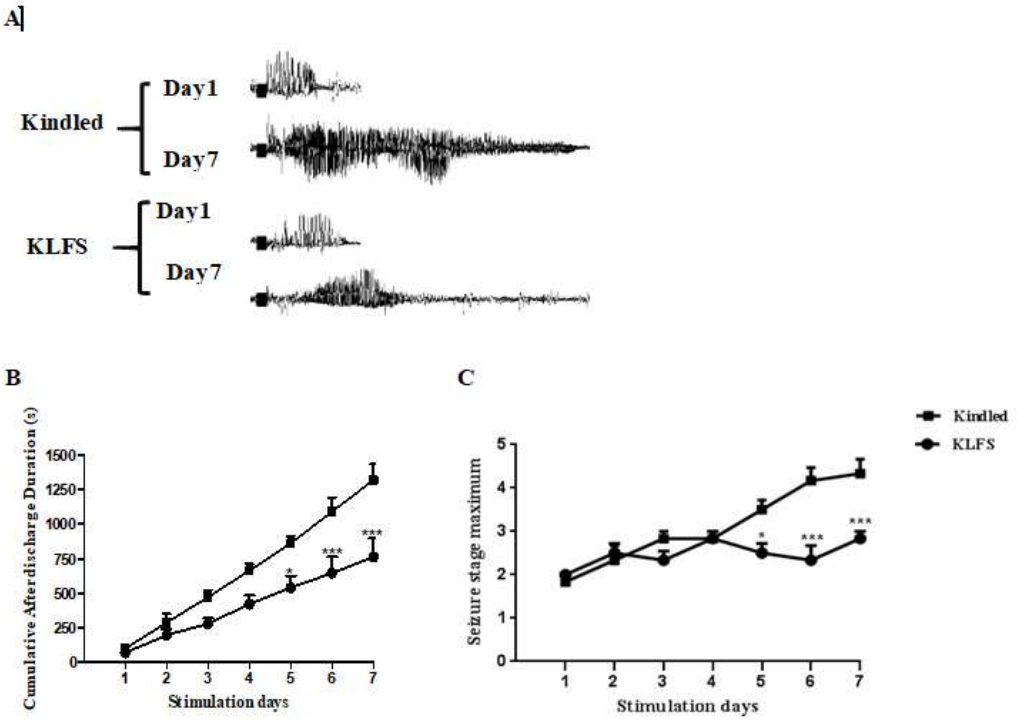
نمونه ها برای بازیابی آنتی ژنی در (Tris-Buffered Saline, pH 9.2) TBS به مدت ۱۵ دقیقه در مایکروویو قرار گرفتند. سپس H2O2 ده درصد و تریتون X-100 (سیگما – آلمان) برای بلاک کردن پراکسیداز درون زا استفاده شد. رنگ‌آمیزی غیراختصاصی توسط سرم طبیعی بز ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه و آنتی بادی اولیه (Santacruz, US) به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. به دنبال شستشو، آنتی بادی ثانویه بزی علیه IgG خرگوشی (Alexa Fluor 488, A11008, Thermo-Scientific, US) به مدت ۳۰ دقیقه اضافه شد. هسته ها با کمک یدید پروپیدیوم (PI)شناسایی شدند. در نهایت اسلایدها توسط میکروسکوپ فلورسانس (BX51, Olympus, Tokyo, Olympus Japan) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

داده‌ها به‌صورت میانگین±خطای معیار میانگین ارائه شده و P<۰/۰۵ به عنوان حداقل سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج:

اعمال LFS روند کیندلینگ را کند نمود (شکل ۱). با توجه به نتایج تحقیق، تحریک الکتریکی مسیر پرفورنت توسط LFS بلافاصله بعد از تحریکات کیندلینگ در گروه

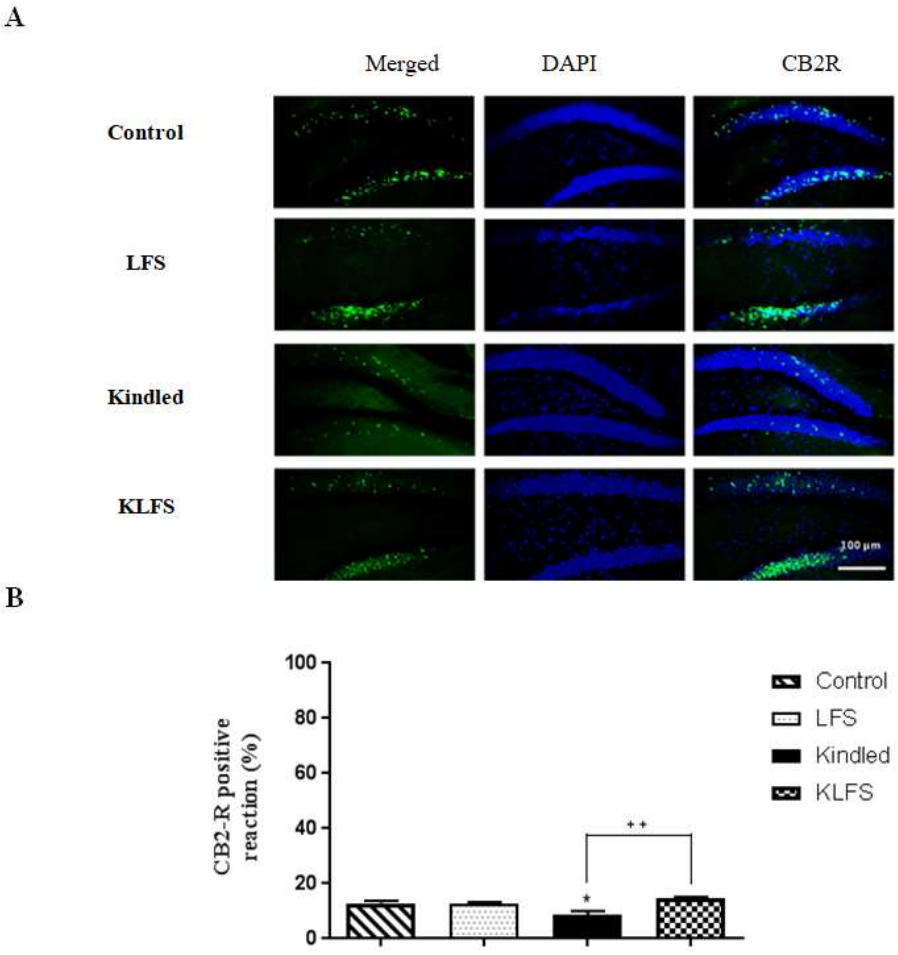
KLFS، مدت زمان امواج تخلیه متعاقب تجمعی روزانه (cADD) و همچنین متوسط بروز مراحل تشنج در روزهای پنجم، ششم و هفتم نسبت به گروه کیندل کاهش معنی داری نشان دادند. در مرحله دوم برای بررسی تغییر بیان گیرنده کانابینوئیدی CB2 در اثر اعمال LFS بر روند کیندلینگ آزمایش دوم طراحی و انجام شد. آنالیز رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوفلوئورسنت گیرنده CB2 در آزمایش دوم نشان داد که کاربرد LFS تاثیر معنی‌داری بر گروهی که به دنبال تحریکات کیندلینگ، LFS دریافت نمودند نداشت. علی‌رغم این‌که کاهش معنی داری در میزان بیان این گیرنده در گروه کیندل در مقایسه با گروه کنترل، مشاهده شد، اعمال تحریکات LFS به تنهایی بر میزان گیرنده CB2 هیچ تاثیر معنی‌داری نداشت (شکل ۲).



شکل ۱. بررسی اثر LFS بر روند کیندلینگ. (A) مقایسه دو نمونه از ثبت تخلیه‌های متعاقب پس از اولین تحریک از ۱۲ تحریک کیندلینگ در روز اول و روز هفتم تحریک در دو گروه کیندل و KLFS. (B) اثر اعمال LFS بر مدت زمان تخلیه‌های متعاقب تجمعی روزانه طی روند کیندلینگ. (C) تأثیر اعمال LFS بر بروز مراحل رفتاری تشنج طی روند کیندلینگ مسیر پرفورنت. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار میانگین نشان داده شده‌اند.*نشان‌دهنده P<۰/۰۵ و ***نشان‌دهنده P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کیندل است (n=٦).

بحث:

در مطالعات اخیر نشان داده شده است که LFS بر روند صرع زایی اثر مهاری دارد. از آن جایی که در مصروعین مقاوم به دارو، تحریکات LFS به عنوان روش درمانی مناسب در نظر گرفته می شود، شناخت گیرنده هایی که LFS به واسطه آنها اثرات مهاری را اعمال می کند، می تواند به محققین در جهت درمان افراد مصروع کمک کند.



شکل ۲. بررسی ایمونوهیستوفلوئورسنت گیرنده CB2 در گروه‌های آزمایشی. (A) میکروگراف‌ها نشان‌دهنده بیان گیرنده CB2 (مناطق سبز رنگ) می‌باشند. (B) نمودار میانگین درصد تراکم پیکسل‌های گیرنده CB2. مقادیر بر اساس میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شده‌اند. هسته‌ها با DAPI (رنگ آبی) رنگ‌آمیزی شده‌اند.* نشان‌دهنده P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کیندل است. ++ نشان‌دهنده P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه KLFS است.

در بخش اول نتایج مشاهده شد که به دنبال اعمال LFS به‌طور روزانه بعد از اتمام تحریکات کیندلینگ، از شدت مراحل مختلف رفتاری تشنج کاسته می شود. در مطالعات پیشین نشان داده است که اعمال LFS (۱-۳ HZ) باعث تداخل در روند کیندلینگ آمیگدال می شود (۲۴) و تقویت طولانی مدت در انتقال سیناپسی آمیگدال ایجاد شده توسط کیندلینگ را مهار می کند (۲۵). همچنین، اثرات ضد تشنجی LFS در صورت کاربرد مستقیم در کانون صرع در انسان ثابت شده است (۲۶). یافته‌های تحقیق حاضر، کاهش تخلیه‌های متعاقب تجمعی پس از اعمال LFS را نشان داد. از طرفی اعمال LFS باعث کاهش معنی‌داری در بروز مراحل ۴ و ۳ تشنج شد. لذا تصور می رود، LFS اثر بازدارندگی بر تبدیل تشنجات کانونی به تشنجات عمومی دارد. در نتایج ایمنوهیستوفلوئورسنت، میزان بیان گیرنده CB2 با اعمال LFS نسبت به گروه کنترل تغییری نکرد. اگرچه تصور بر این بود که گیرنده CB2 در مغز وجود ندارد و به عنوان گیرنده

کانابینوئیدی محیطی در نظر گرفته شده بود. امروزه، با توسعه فناوری‌های تشخیص حساس‌تر، گیرنده های CB2 در سطح بیان پایین در مقایسه با گیرنده های CB1 در چندین ناحیه مغز در CNS یافت شده‌اند (۱۲ و ۲۷). مطالعه حاضر نشان می دهد که LFS برهم‌کنشی با گیرنده CB2 ندارد. از آن جایی که میزان گیرنده CB2 در نواحی هیپوکمپ نسبت به گیرنده CB1 بسیار کم است (۱۴) ممکن است گیرنده CB2 در اثرات مهاری LFS نقشی نداشته باشد. در حالیکه تحریکات کیندلینگ میزان بیان گیرنده‌های کانابینوئیدی CB2 را نسبت به گروه کنترل کاهش داد که ممکن است به دلیل مرگ سلولی باشد. این در حالی است که افزایش سطح بیان گیرنده های CB2 در برخی از بیماریها مانند تشنج گزارش داده شده است (۱۲). بخش جذاب نتایج، همانطور که در شکل ۲ مشخص است این است که میزان بیان گیرنده CB2 با اعمال LFS به دنبال تحریکات کیندلینگ، نسبت به گروه کیندلینگ افزایش معنی داری داشته است. لذا با این که بیان گیرنده CB2 به سرعت و عمیقا تحت شرایط پاتولوژیک کیندلینگ کاهش یافته است ولی به نظر می رسد با اعمال LFS افزایش یافته و بستر مهمی برای محافظت عصبی فراهم نموده است (۲۸). این ویژگی جذاب به این معنی است که گیرنده CB2 به عنوان یک هدف مرتبط با درمان در نظر گرفته شده، که نشان می دهد LFS، از طریق تعدیل فعالیت گیرنده CB2 که در طی کیندلینگ کاهش داشته است برای بهبود اختلالات عصبی نقش ضد تشنجی خود را اعمال نماید. صرع مقاوم به دارو به طور جدی کیفیت زندگی بیماران را تحت تاثیر قرار می دهد، که نیاز به ابداع درمان های موثرتر را برجسته می کند. اگرچه مکانیسم های اساسی صرع مقاوم به دارو هنوز نامشخص است، لذا گیرنده CB2 احتمالاً یک استراتژی درمانی جدید برای درمان تشنج های صرع بدون عوارض جانبی ارائه می دهد که از طریق کاهش تحریک‌پذیری عصبی و تنظیم عملکرد سیستم ایمنی (۱۲) می تواند هدف مهم برای کنترل تشنج های صرع باشد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می رسد که LFS برهمکنشی با گیرنده های اندوکانابینوئیدی CB2 نداشته باشد ولی در شرایط پاتولوژیک کیندلینگ، LFSممکن است تا حدودی با افزایش میزان بیان گیرنده های اندوکانابینوئیدی CB2 تا سطح بیان نرمال، در مهار تشنج اعمال اثر نماید اگر چه این افزایش میزان بیان، متفاوت از شرایط عادی نبود.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله تعارض در منافع ندارند.

فهرست منابع

1. Bausch SB. Axonal sprouting of GABAergic interneurons in temporal lobe epilepsy. Epilepsy & Behavior. 2005;7(3):390-400.

2. Goodman JH. Low frequency sine wave stimulation decreases the incidence of kindled seizures. Kindling 6: Springer. 2005; 343-53.

3. Ozen L, Young N, Koshimori Y, Teskey G. Low-frequency stimulation reverses kindling-induced neocortical motor map expansion. Neuroscience. 2008;153(1):300-7.

4. Weiss SR, Li XL, Rosen JB, Li H, Heynen T, Post RM. Quenching: inhibition of development and expression of amygdala

kindled seizures with low frequency stimulation. Neuroreport. 1995; 6(16): 2171-6.

5. Velisek L, Veliskova J, Stanton PK. Low-frequency stimulation of the kindling focus delays basolateral amygdala kindling in immature rats. Neurosci Lett. 2002;326(1): 61-3.

6. Szabo B, Urbanski MJ, Bisogno T, Di Marzo V, Mendiguren A, Baer WU, et al. Depolarization-induced retrograde synaptic inhibition in the mouse cerebellar cortex is mediated by 2-arachidonoylglycerol. J Physiol. 2006; 577(1): 263-80.

7. Izumi Y, Zorumski CF. GABA and Endocannabinoids Mediate Depotentiation of Schaffer Collateral Synapses Induced by Stimulation of Temperoammonic Inputs .PLoS One. 2016;11(2):e0149034.

8. Mardani, P., Oryan, S., Sarihi, A., Alaei, E., Komaki, A., & Mirnajafi-Zadeh, J. Endocannabinoid CB1 receptors are involved in antiepileptogenic effect of low frequency electrical stimulation during perforant path kindling in rats. Epilepsy Research. 2018; 144, 71-81.

9. Karler R, Cely W, Turkanis SA. Anticonvulsant properties of delta 9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids. Life Sci. 1974; 15(5): 931-47.

10. Mackie K. Cannabinoid receptors as therapeutic targets . Annual review of pharmacology and toxicology. 2006; 46(1): 101-22.

11. Sullivan JM. Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. Learning & Memory. 2000; 7(3): 132-9.

12. Ji, X., Zeng, Y., & Wu, J. The CB2 receptor as a novel therapeutic target for epilepsy treatment. International Journal of Molecular Sciences.2021; 22(16), 8961.

13. Gong J-P, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu Q-R, Tagliaferro PA, Brusco A, et al. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. Brain research. 2006; 1071(1): 10-23.

14. Brusco A, Tagliaferro P, Saez T, Onaivi ES. Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. Synapse. 2008; 62(12): 944-9.

15. Wallace MJ, Martin BR, DeLorenzo RJ. Evidence for a physiological role of endocannabinoids in the modulation of seizure threshold and severity. European journal of pharmacology. 2002; 452(3): 295-301.

16. Blair RE, Deshpande LS, Sombati S, Falenski KW, Martin BR, DeLorenzo RJ. Activation of the cannabinoid type-1 receptor mediates the anticonvulsant properties of cannabinoids in the hippocampal neuronal culture models of acquired epilepsy and status epilepticus. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2006; 317(3): 1072-8.

17. Wendt, H., Soerensen, J., Wotjak, C. T., & Potschka, H. (2011). Targeting the endocannabinoid system in the amygdala kindling model of temporal lobe epilepsy in mice. Epilepsia. 2011; 52(7): e62-e65.

18. Cassano, T., Calcagnini, S., Pace, L., De Marco, F., Romano, A., & Gaetani, S. Cannabinoid receptor 2 signaling in neurodegenerative disorders: from pathogenesis to a promising therapeutic target. Frontiers in neuroscience. 2017; 11: 30.

19. Huizenga, M. N., Wicker, E., Beck, V. C., & Forcelli, P. A. Anticonvulsant effect of cannabinoid receptor agonists in models of seizures in developing rats. Epilepsia. 2017; 58(9): 1593-1602.

20. Sugaya, Y., Yamazaki, M., Uchigashima, M., Kobayashi, K., Watanabe, M., Sakimura, K., & Kano, M. Crucial roles of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the suppression of epileptic seizures. Cell reports. 2016; 16(5): 1405-1415.

21. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Vol. Academic Press, San Diego. 1998.

22. Austin-Lafrance RJ, Morgane PJ, Bronzing JD. Prenatal protein malnutrition and hippocampal function: rapid kindling. Brain research bulletin. 1991; 27(6): 815-8.

23. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. Electroencephalography and clinical neurophysiology. 1972; 32(3): 281-94.

24. Gaito J, Nobrega JN, Gaito ST. Interference effect of 3 Hz brain stimulation on kindling behavior induced by 60 Hz stimulation. Epilepsia. 1980; 21(1): 73-84.

25. Adamec R ,Young B. Neuroplasticity in specific limbic system circuits may mediate specific kindling induced changes in animal affect—implications for understanding anxiety associated with epilepsy. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2000; 24(7): 705-23.

26. Yamamoto J, Ikeda A, Satow T, Takeshita K, Takayama M, Matsuhashi M, et al. Low-frequency electric cortical stimulation has an inhibitory effect on epileptic focus in mesial temporal lobe epilepsy. Epilepsia. 2002; 43(5): 491-5.

27. Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. Physiological reviews. 2009.

28. Cassano, T., Calcagnini, S., Pace, L., De Marco, F., Romano, A., & Gaetani, S. Cannabinoid receptor 2 signaling in neurodegenerative disorders: from pathogenesis to a promising therapeutic target. Frontiers in neuroscience. 2017; 11: 30.

Journal of Animal Physiology and Development
Volume 16, Issue 3, Number 63, Pages 126-134
Qjaphd.sinaweb.net **ISSN: 9880-1735**

Effect of low frequency electrical stimulation on CB2 receptors expression level in the dentate gyrus during perforant path kindling in rats

Parastoo Mardani [1], Javad Mirnajafi zadeh [2]

1- Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran. Corresponding Author : Mardani24826@pnu.ac.ir
2- Professor, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received:2023.03. 30 **Accepted: 2023.06.15**

Abstract

Background & Aim: Application of Low-frequency stimulation (LFS), is accompanied with a decrease in hippocampal kindled-seizure induced changes rats and prevents propagation of seizure. The purpose of this study is to investigate the role of the endocannabinoids receptors CB2 in the inhibitory effects of LFS on perforant path kindling- arose seizures.

Materials & Methods: Rats Animals were kindled through electrical stimulation of perforant path and recorded responses in the dentate gyrus. Animals included of four groups kindled, Kindled+LFS (KLFS), LFS and control. Semi- rapid kindling procedure was used to induce seizures in animals. In group of KLFS, LFS (0.1 ms pulse duration at 1 Hz, 800 pulses) was applied five min after termination of kindling stimulations. At the end of the experiment, after fixing the animals by intracardiac perfusion method with 4% paraformaldehyde, the cerebral hemispheres were examined by Immunofluorescence.

Results: Obtained results showed that LFS application in the LFS-treated group (KLFS) had significantly reduced seizures parameters. However, on basis immunofluorescent findings, no significant change in level of expression CB2 receptors was observed following LFS stimulations in the gyrus dentate of the KLFS group while it increased significantly compared to the kindling group.

Conclusion: It is suggested that LFS does not interact with CB2 endocannabinoid receptors but in the pathological conditions of kindling, LFS may have an effect in suppressing seizures by increasing the expression level of CB2 endocannabinoid receptors to the normal expression level, although this increase in the expression level was not different from normal conditions.

Keywords: Low-frequency stimulation, Kindling, Cannabinoid receptor, Perforant path, Rat.