اثر تجویز خوراکی اسیدهای چرب سیس و ترانس بر روند ایجاد کیندلینگ شیمیایی با پنتیلن تترازول در موش‌های صحرایی

محمود رضا نخعی[۱]، دکتر سید ولی رضویه[۲]، دکتررضا مهدوی[۲]، دکتر محمدرضا پالیزوان[۳]، سیروس مددی نوعی[٤]

چکیده

مقدمه: تحقیقات زیادی در زمینه اهمیت مصرف اسیدهای چرب ضروری بر عملکرد های فیزیولوژیک و رفتاری در انسان‌ها و حیوانات انجام گرفته است. اسیدهای چرب ضروری باید از طریق مواد غذایی دریافت شوند. در این مطالعه اثرات مصرف ایزومر های سیس[۵] و ترانس[۶] اسیدهای چرب موجود در رژیم غذایی روی تشنجات ایجاد شده توسط پنتیلن تترازول[۷] در موش ها مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار: این مطالعه از نوع تجربی بود. در این تحقیق ابتدا حیوانات به چهار گروه تقسیم بندی شدند. در سه گروه آزمون به غذای استاندارد آنها به ترتیب اسیدهای چرب cis، trans، cis و trans اضافه شد. و به گروه شاهد فقط غذای استاندارد داده شد. یک ماه پس از شروع مصرف غذا، حیوانات با دوز ۴۵ میلی‌گرم برکیلوگرم تحت کیندلینگ[۸] شیمیایی با پنتیلن تترازول قرار گرفتند. پس از تزریق دارو رفتار های حیوان به مدت ۲۰ دقیقه تحت نظر گرفته شد.

نتایج: نتایج بدست آمده نشان داد که اگر چه اضافه کردن اسیدهای چرب cis به جیره غذایی موش‌های نر بالغ سبب تعدیل مرحله حمله در حیوانات مورد مطالعه شده است، ولی نتیجه آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که در بین گروه هایی که به جیره غذایی آنها اسیدهای چربcis ، trans، cis و trans اضافه شده بود، در متغییر های تشنجی مثل مرحله حمله، مدت زمانی که طول می کشد تا حیوان به مرحله پنج تشنج برسد و مدت زمانی که حیوان در مرحله پنج تشنج به سر می برد اختلاف آماری معناداری وجود ندارد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز اسیدهای چرب cis و trans به موش‌های نر بالغ، اثری بر کیندلینگ ایجاد شده توسط پنتیلن تترازول در موش ها ندارد.

واژگان کلیدی: پنتیلن تترازول، کیندلینگ، اسیدهای چرب سیس، اسیدهای چرب ترانس، تجویز غذایی

مقدمه

صرع یکی از اختلالات عصبی مزمن در انسان است. این بیماری در مجموع به وسیله حملات متناوب حرکتی، حسی، اتونومیک و یا روانی مشخص می‌گردد (۱). در حدود ۵۰ میلیون نفر در دنیا به این بیماری مبتلا هستند(۲). برای مطالعهٔ صرع از مدل‌های آزمایشگاهی مختلفی از جمله مدل کیندلینگ استفاده می‌شود. در این مدل با تحریک مکرر یک ناحیهٔ مغزی به وسیلهٔ محرک الکتریکی و یا شیمیایی، که در ابتدا قادر به ایجاد تشنج نیست، در حیوان تشنج ایجاد می‌کنند(٤-۲). امروزه تحقیقات زیادی در زمینه شناخت مکانیسم‌های ایجاد صرع و نقش نواحی و هسته‌های مختلف مغزی در ایجاد آن و نحوهٔ اثر داروها، مواد شیمیایی و مواد غذایی مختلف بر روی حملات صرعی در حال انجام است. در مورد نقش داروها نیز در درمان صرع تا کنون پژوهش‌های زیادی انجام گرفته است. با این حال به نظر

۱- دانشجوی دکتری تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز.
۲ -دانشیار تغذیه دانشگاه علوم پزشکی تبریز.
۳- استادیار فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اراک.
٤- مهندس صنایع غذایی .

5- Cis.
6-Trans.
7-PTZ: Pentylenetetrazol.
8-Kindling.

می‌رسد که درمان با استفاده از مواد غذایی هنوز جایگاه ویژه خود را حفظ کرده است. نقش مؤثر اسیدهای چرب در تکامل سیستم های عصبی در مطالعات متعددی مورد تأکید قرار گرفته است(۸-۵) .

اسیدهای چرب ضروری(EFAs)[1] به ویژه خانواده امگا-۳ برای تکامل طبیعی شبکیه و غشاء های عصبی(۹،۱۰) و رفتار طبیعی و شناخت ضروری می‌باشند(۱۵-۱۱). اسیدهای چرب غیر اشباع با پیوند دوگانه متعدد (PUFA)[2] نقش میانجی گری برای عملکرد نورون‌ها دارند. اسیدهای چرب می‌توانند موجب کاهش و یا افزایش فرکانس پتانسیل های عمل در نورون‌ها شده و ترشح میانجی های عصبی را تغییر دهند. هم‌چنین باعث تنظیم پاسخ های سیناپسی می‌شوند و فعال شدن کانال های پتاسیم را مهار می‌نمایند(۱۹-۱۶).

با توجه به این که انواع مختلفی از صرع در انسان وجود دارد، محققان برای هر کدام مدل حیوانی خاصی را طراحی کرده اند که از آن جمله می‌توان به الکتروشوک، کیندلینگ الکتریکی و کیندلینگ شیمیایی اشاره کرد.

استفاده از اسیدهای چرب cis در محیط خارج از بدن[3] می‌تواند سبب مهار تشنج در سلول‌های ناحیه CA1 هیپوکمپ گردد، با این حال نقش این اسیدهای چرب در محیط درون بدن[4] و در موش‌های بالغ تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته است واین سؤال هم‌چنان وجود دارد که آیا این نوع اسیدهای چرب علی رغم وجود سد خونی مغزی در حیوان بالغ به راحتی قادر به عبور از این سد و اثر بر روی بافت مغز خواهند بود؟ هدف از این تحقیق بررسی اثر احتمالی اسیدهای چرب cis و trans بر کنترل حملات تشنجی در موش‌های نر بالغ بود.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی بود. در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (تهیه شده از انستیتو پاستورتهران) با وزن بین ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در اتاقی با حرارت ۲٤ درجه سانتی گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و به جز در هنگام انجام آزمایش ها آب و غذا به طور آزادانه در اختیار آنها قرار داشت.

در این تحقیق غذای موش استاندارد تهیه شده از شرکت دانه پارس به عنوان غذای پایه انتخاب شد. میزان ۳ گرم در صد گرم روغن کانولا(به عنوان منبع اسیدهای چرب cis) و یا روغن کانولایی که عمل هیدروژناسیون جزئی بر روی آن صورت گرفته بود اضافه شد(۲۰). روغن کانولا حاوی ٦ درصد اسیدهای چرب اشباع شده و ۹۳ درصد اسیدهای چرب غیر اشباع بوده و فاقد اسیدهای چرب ترانس می‌باشد. پس در مجموع این نوع روغن دارای ۹۳درصد از ایزومرهای cis است(۲۱). غذای مورد استفاده موش‌های گروه ترانس نیز همان روغن کانولا بود که با استفاده از عمل هیدروژناسیون جزیی در کارخانه روغن نباتی، تمام اسیدهای چرب cis آن به trans تبدیل شده است، بنابراین این روغن دارای ۹۳درصد اسید چرب ترانس بوده و برای تغذیه به غذای موش‌های گروه دوم اضافه می شد.

1- EFAs: Essential fatty acids.
2 -PUFA: Pply unsaturated fatty acids.
3 - in vitro.
4 - in vivo.

در این تحقیق، از ٤٠ موش استفاده شده که در قالب چهار گروه تقسیم بندی گردیدند.

۱- گروه cis : در این موش‌ها به مدت یک ماه قبل از شروع کیندلینگ و در طول ایجاد کیندلینگ، روغن کانولا به مقدار۳ گرم به صد گرم ماده غذایی استاندارد اضافه شد.

۲- گروه trans : در این موش‌ها به مدت یک ماه قبل از شروع کیندلینگ و در طول ایجاد کیندلینگ روغن کانولایی که عمل هیدروژناسیون جزئی بر روی آن صورت گرفته و ایزومرهای سیس آن تبدیل به ترانس شده بود به مقدار ۳ گرم درصد گرم ماده غذایی استاندارد اضافه شد.

۳- گروه cis + trans : به این موش‌ها به مدت یک ماه قبل از شروع کیندلینگ و در طول ایجاد کیندلینگ روغن کانولا به علاوهٔ روغن حاوی اسیدهای چرب ترانس (همانند گروه ۱و ۲) از هر کدام به مقدار۱/۵ گرم به صد گرم ماده غذایی استاندارد اضافه شد.

٤- به این موشها به مدت یک ماه قبل از شروع کیندلینگ و در طول ایجاد کیندلینگ ماده غذایی استاندارد داده شد.

به منظور ایجاد کیندلینگ شیمیایی PTZ (٤٥میلی گرم بر کیلوگرم ، داخل صفاقی) هر ٤٨ ساعت یکبار(۲۲، ۳۳) به موش‌ها تزریق شد. پس از تزریق دارو رفتارهای حیوان برای مدت ۲۰ دقیقه تحت نظر گرفته شد و پاسخ‌های تشنجی حیوان بر اساس تحقیقات قبلی(٢٤) به این شکل زیر طبقه‌بندی شدند؛ مرحله صفر : عدم پاسخ، مرحله اول: انقباض عضلات صورت و گوش‌ها، مرحله دوم: موج انقباضی بدن، مرحله سوم: پرش های میوکلونیک و ایستادن روی دو پا، مرحله چهارم : افتادن به پهلو و مرحله پنجم: افتادن به پشت و حملات عمومی تونیک و کلونیک. فعالیت‌های تشنجی در طول بیست دقیقه پس از تزریق PTZ ارزیابی شدند. پس از اولین تزریق بعضی از موش ها مراحل اول و یا دوم تشنج را از خود نشان دادند. با ادامه تزریقات به تدریج تشنج در موش‌ها پیشرفت کرد و پس از ۱۲ تا ۱۵ بار تزریق دارو تمام موش ها مرحله پنجم تشنج را از خود نشان دادند. پس از اینکه موش ها سه بار پیاپی در اثر تزریق PTZ مرحله پنجم تشنج را از خود نشان دادند، به عنوان موش‌های کیندل شده در نظر گرفته و تزریق PTZ در آنها پایان می گرفت.

متغیرهای مورد اندازه‌گیری در این تحقیق عبارت بودند از مرحله حمله، مدت زمانی که طول می‌کشد تا حیوان مرحله پنج تشنج را از خود نشان دهد و مدت زمانی که حیوان در مرحله پنجم تشنج بسر می‌برد.

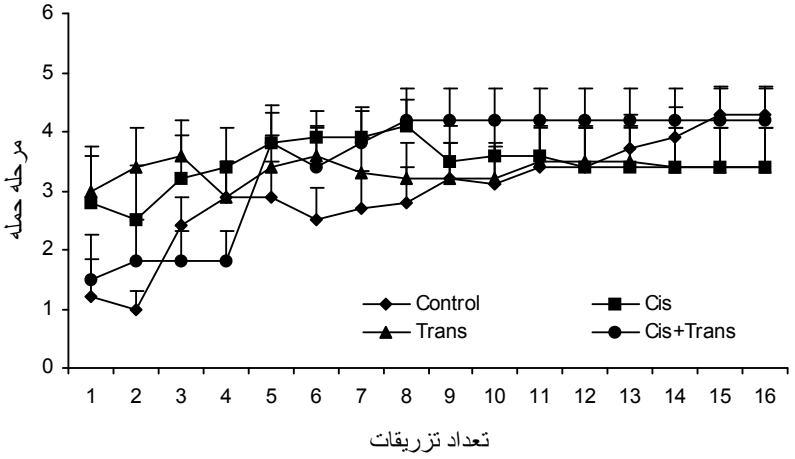
تجزیه و تحلیل اطلاعات به وسیله نرم افزار SPSS انجام شد. جهت استخراج نتایج از شاخص‌های میانگین و انحراف معیار و آزمون‌های کی اس، تی و آنالیز واریانس استفاده گردید.

نتایج

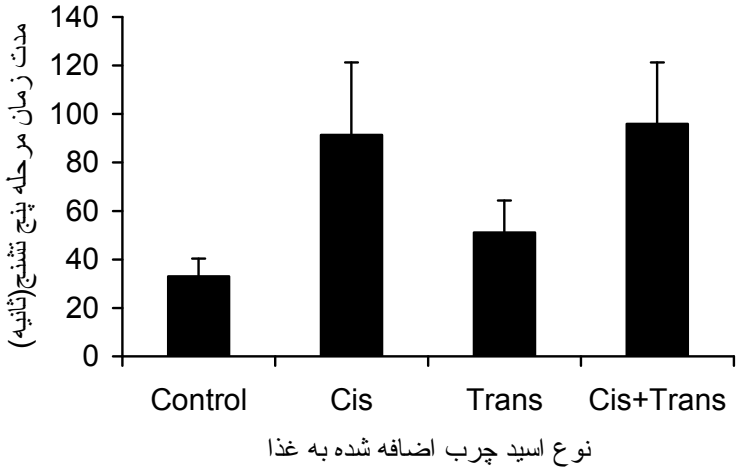
نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که تزریق مکرر پنتیلن تترازول سبب پیشرفت کیندلینگ در حیوانات تحت تجربه، شده است(نمودار۱). اگر چه همان گونه که در نمودار۱ نیز دیده می‌شود، از روز دهم به بعد اختلافی در مرحله حمله بین گروه cis و دیگر گروه‌ها دیده می‌شود و مرحله حمله در این گروه کمتر از گروه‌های دیگر است ولی با این حال آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که بین گروه کنترل، گروه cis، گروه trans و گروهی که هر دوی

اسیدهای چرب را دریافت کرده بودند در مرحله حمله اختلاف معنی دار وجود ندارد.

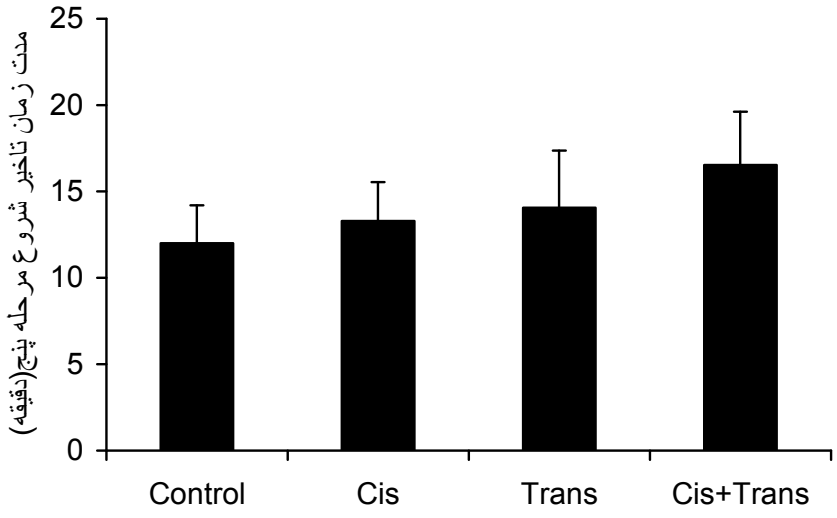
بررسی مدت زمانی که لازم است تا حیوان به مرحله پنج تشنج برسد (نشان دهنده میزان مقاومت مدارهای نورونی در برابر گسترش تشنج) نشان داد که اگر چه این زمان در گروه سیس از گروه های دیگر بیشتر است (نشان دهنده مقاومت بیشتر مغز این حیوانات در برابر گسترش تشنج)، اما نتیجه آزمون آنالیز واریانس یک طرفه در گروه های مختلف نشان داد که نحوهٔ تغذیه با اسیدهای چرب اثری بر روی مدت زمان لازم برای نشان دادن مرحله پنجم تشنج ندارد (نمودار۲). بررسی مدت زمانی که حیوانات کیندل شده در مرحله پنج تشنج بسر می برند نیز نشان داد که بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (نمودار ۳).



نمودار ۱. اثر تجویز خوراکی اسیدهای چرب بر روی تکامل مرحله حمله.



نمودار۲ . اثر تجویز خوراکی اسیدهای چرب برمدت زمانی که حیوان در مرحله پنج تشنج بسر می‌برد.



نمودار۳. اثر تجویز خوراکی اسیدهای چرب بر مدت زمانی که طول می کشد تا حیوان به مرحله پنج تشنج برسد.

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مصرف هر یک از اسیدهای چرب cis و trans به تنهایی و مخلوطی از این دو نوع اسید چرب بر روی کیندلینگ ایجاد شده به روش شیمیایی با تزریق پنتیلن تترازول اگر چه سبب تعدیل متغییرهای تشنج شده است اما اختلاف معنی‌داری نداشته است.

غشاء سلول در تحریک پذیری سلول نقش اساسی دارد. غشاء سلول عمدتاً از فسفولیپید ها تشکیل شده است که در ساختمان آنها اسیدهای چرب به کار رفته است. نوع اسیدهای چرب موجود در رژیم غذایی احتمالاً می‌تواند تعیین کننده نوع اسیدهای چرب موجود در غشاء سلول باشد. فسفولیپیدی که از اسیدهای چرب اشباع درست شده باشد در مقایسه با فسفولیپیدی که در ساختمان آن اسیدهای چرب ضروری به کار رفته است، سیالیت کمتری دارد. به علاوه اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-٦ (دوکوزا هگزا انوئیک اسید[1])در غشاء سلول بر روی عملکرد سلول تأثیر دارند. رابطه بین نقش DHA در ساختمان فسفولیپیدهای غشاء به دو شکل in vitro و in vivo مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعات in vitro که بر روی سلول‌های کشت داده شده استریاتوم انجام گرفته، نشان داده شده است که بعد از تجویز اسید آراشیدونیک، کانال‌های سدیمی حساس به ولتاژ مهار شده و سلول هیپرپلاریزه می‌گردد. این تغییرات موجب کاهش ترشح میانجی‌های عصبی و کاهش تولید پتانسیل‌های عمل در نورون‌ها می‌شود، در نتیجه اثرات مشابهی نظیر عملکرد فنی توئین و کاربامازپین (دو نوع داروی ضد صرع) در سرکوب فعالیت نورون‌ها را

1 - DHA.

ایجاد می‌کند(۲۵). همین نتایج نیز توسط فریزر[1] و همکارانش باکار بر روی نورون‌های کشت داده شده بدست آمده است(۲۶). نقش اسیدهای چرب در افزایش آستانه تحریک الکتریکی که موجب تشنج می‌شود به صورت in vitro در بعضی تحقیقات تعیین شده است(۲۷). مطالعات انجام شده در محیط in vitro با استفاده از اسیدهای چرب از خانواده اسیدهای چرب امگا-۳ نشان داد که این ترکیب، صرع ایجاد شده توسط PTZ را در ناحیه نورون‌های هیپوکمپ مهار می‌کند(۲۸).

سوتیریوس[2] و همکاران گزارش کرده‌اند که تشنج ایجاد شده در حیوانات سبب افزایش هدایت یون‌های پتاسیم در نورون های هرمی ناحیه CA1 هیپوکمپ می گردد(۲۹). ژائو[3] و همکاران گزارش کرده اند که اسیدهای چرب غیر اشباع با پیوند دوگانه متعدد (اسیدهای چرب امگا-۳) سبب کاهش تحریک‌پذیری و ایجاد هیپر پلاریزاسیون در نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکمپ می گردد(۳۰)، درحالی که اسید اولئیک که فقط یک پیوند دوگانه داردتحریک پذیری غشاء را در ناحیه نورون های CA1 تغییر نمی دهد. نقش اضافه کردن اسیدهای چرب cis و trans به رژیم غذایی و اثر آن بر روی تشنج تا کنون بررسی نشده است. با این حال اهمیت ویژه PUFA برای تکامل مغز و شبکیه بر روی نوزادان پره ترم مورد تایید قرار گرفته است (۳۳-۳۱). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مصرف غذایی اسیدهای چرب cis و trans اثری بر روی کیندلینگ شیمیایی با پنتیلن تترازول ندارد. به این ترتیب به نظر می‌رسد که رابطه بین تشنج و اسیدهای چرب پیچیده بوده (۳٤) و بستگی به عوامل مختلفی نظیر تأثیر این مواد بر روی سد خونی مغزی داشته باشد(۳۵). دل[4] و همکارانش نیز نشان داده اند که در موش‌های صحرایی که از رژیم کتوژنیک استفاده می‌کنند علی‌رغم افزایش اسیدهای چرب پلاسما، میزان اسید آراشیدونیک[5] و DHA در مغز آنها به شکل معناداری تغییر پیدا نمی‌کند(۳٦). این مطالعه نشانگر آن بود که مغز موش‌های بالغ در مقابل تغییرات اسیدهای چرب پلاسما و اسیدهای چرب موجود در رژیم غذایی مقاومت می‌کند، در حالی که مغز نوزادان به سرعت اسیدهای چرب را از گردش خون می‌گیرد(۳۷). به این ترتیب به نظر می‌رسد اگر چه مطالعات in vitro و تحقیقات بر روی نوزادان نشان دهنده نقش اسیدهای چرب بر روی توانایی مغز برای بروز تشنج می‌باشد، ولی در مورد توانایی این مواد برای گذشتن از سد خونی مغزی، به نوعی تردید وجود دارد(۳۸). از این رو به نظر می‌رسد که علی رغم نقش تغذیه‌ای مفید اسیدهای چرب بر روی تشنج و یا تکامل مغز نوزادان به دلیل کامل شدن سد خونی مغز در بالغین، احتمالاً این مواد از سد خونی عبور نکرده و قادر به اثر بر روی پارامتر های تشنجی نخواهند بود.

منابع

1. Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S. Learning and memory. In: Kandel E R, Schwartz J H, and Jessell T M,edirors . Principles of neural science. USA: McGrohill; 2000.p. 1227-46.

2. Barat SA and Abdel-Rahman MS. Cocaine and lidocaine in combination are synergistic convulsants. Brain Res 1996; 742: 157-162.

1 - Fraser.
2 - Sotirios.
3 - Xiao

4 - Dell.
5 - AA.

3. Ebert U, Rundfeldt C, Losher W. Development and pharmacological suppression of secondry after discharges in the hippocampus of amygdala-kindled rats. Eur J Neurosci 1995; 17: 732-741.
4. Alasvand- Zarasvand M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y. Anticonvulsant effect of bilateral injection of N6-cyclohexyladenosine into the CA1 region of the hippocampus in amygdala-kindled rats. Epilepsy Res 2001; 47: 141-49.
5. Kurlak L, Stephenson T. Plausible explanation for effects of LC-PUFAs on neonates. Arch Dis Child 1999;80: F148-F154,
6. Innis SM. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain . Dev Neurosci 2000;22: 474-80.
7. Uauy R, Mena P. Lipids and neurodevelopment .Nutr Rev 2001;59: S34-S58.
8. Gibson R. LC-PUFAs and infant development. Lanct 1999;354:1919-1920.
9. Neuringer M, Anderson G, Cornno W. The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain . Ann Rev Nutr 1988; 8:517-541.
10. Carlson SE, Werkman SH. A randomized trail of visual attention of preterminfantsfed DHA until nine months . Lipids 1996;31:91-97
11. Enslen M, Milon H, Malone A. Effect of low intake of n-3 fatty acids during development on brain phospholipid fatty acid composition and exploratory behavior in rats. Lipids 1991;26: 203-8.
12. Carrie I, Clement I. Learning deficits in first generation OF1 mice deficient in n-3 PUFAs do not result from visual alteration . Neurosci Lett 1999; 266: 69-72.
13. Mc Gahon B, Martin DSD. Age-related changes in synaptic function : analysis of the effect of dietary supplementation with ω -3 fatty acids . Neurosci 1999;94: 305-114.
14. Yehuda S, Rabinovitz S, Mostofsky DI. EFAs are mediators of brain biochemistry and cognitive functions. J Neurosci Res 1999; 56;565-70.
15. Takeuchi T, Fukomuto Y, Harada E. Influence of dietary n-3 fatty acids deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. Behav Brain Res 2002;131:193-203.
16. Vreugdenhill M, Bruehl C, Voskuyl RA, et al. PUFAs modulate sodium and calcium currents in CA1 neurons . Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:12559- 63.
17. Poling J, Vicini S. DHA block of neuronal voltage- gated k^+ channels : subunit selective antagonism by zinc . Neuropharmacology 1996;35: 969-82 .
18. Sortirios K, McBain C. Arachidonic acid inhibits transient potassium currents and broadens action potentials during electrographic seizures in hippocampal pyramidal and inhibitory interneurons . J Neurosci 1997; 17:3476-87.
19.Horimoto N, Nabekura J, Ogawa T. Arachidonic acid activation of potassium chanells in rat visual cortex neurons. Neuroscience 1997;77: 661-71.
20. Giron MD, Lara A. The short term effect of dietary fats on the brain faty- acid composition in rats. Arch Physiol Biochem 1995;103: 123-26.
21. United states department of agriculture and nutrition information service. Agricultural hand book No. 8-4. USA: Washington D.C. 1979.
22.Yonekawa WD, Kupferberg HJ, Woodbury DM. Relationship between PTZ-induced seizures and brain PTZ levels in mice . J Pharmacol Exp Ther 1980; 214: 589-93.
23.Palizvan MR, Fathollahi Y, Semnanian S, et al. Differential effects of pentylenetetrazol-kindling on long-term potentiation of population excitatory postsynaptic potentials and population spikes in the CA1 region of rat

hippocampus . Brain Research 2001;898: 82-90.
24. Zhao D, Leung LS, Boon F, Cain DP. Persistent physiological effects caused by a single Pentylenetetrazol induced seizure in neonatal rats. Brain Res Dev Brain Res 1994;80:190-98.
25. Rho JM, Sanker R. The pharmacologic basis of antiepileptic drug action .Epilepsia 1999; 40:1471-83.
26. Fraser DD, Hoehn K, Weiss S, et al. AA inhibits sodium currents and synaptic transmission in cultured striatal neurons . Neuron 1993,11:633-44.
27. Young C, Gean PW, et al. DHA inhibits synaptic transmission and epileptiform activity in the rat hippocampus. Synapse 2000;37: 90-94.
28. Sovik O, Mansson JE, et al. Generalized peroxisomal disorder in male twins :fatty acid composition of serum lipids and response to n-3 fatty acids .J Inherit Metab Dis 1998;1:662- 70.
29. Sortirios K, Mc Bain C. Arachidonic acid inhibits transient potassium currents and broadens action potentials during electrographic seizures in hippocampal pyramidal and inhibitory interneurons . J Neurosci 1997;17:3476-87
30. Xiao Y , Li X. PUFA modify mouse Hippocampal neuroexitability during exitotoxic or convulsant stimulation. Brain Res 1999;30:112-21.
31.Crawford M. The role of EFAs in neural development : implications for prenatal nutrition. AJCN 1993;57(Suppl); S 703- S 710.
32.Raiten D, Talbot D, Waters J. Assessment of nutrient requirements for infant formulas. AJCN 1998; 115;2089-10.
33.Lucas, A, Stafford M. Efficacy and safety of LC-PUFA supplementation of infant-formula milk: a randomised trail. Lancet 1999;354:1948-54.
34. Mostofsky DI, abinovitz S, Yehuda S. The use of fatty acid supplementation for seizure management. Neurobiol Lipids 2004;17-25.
35.Cornford EM, Olendorf WH. Epilepsy and blood brain brain barrier . Adv Neurol 1986; 44:787-812,
36.Dell CA, Likhodii SS, Musa K , et al. Lipids and fatty acid profiles in rat consuming different high-fat ketogenic diets. Lipids 2001;36: 373-78.
37.Cunnane S, Musa K, Ryan M. Potential role of PUFA in seizure protection achieved with ketogenic diet. Prostaglandins, Leukotrienes, Essential fatty acids 2002;67:131-35.
38.Fraser DD, Whiting S. Elevated PUFA in blood serum obtained from children on the ketogenic diet . Neuorology 2003 ; 60: 1026-29.