

## اثر تزریق داخل صفاقی پروژسترون در موش‌های تازه متولد شده بر روی روند ایجاد کیندلینگ شیمیایی پس از بلوغ

دکتر محمدرضا پالیزوان\*، اکرم اسماعیلی\*\*، هاجر رجیبیان\*\*، یحیی ژند\*\*، الهه میرزازاده\*\*

نویسنده‌ی مسئول: دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه فیزیولوژی palizvan@yahoo.com

دریافت: ۸۴/۱۲/۲ پذیرش: ۸۵/۱۰/۴

### چکیده

**زمینه و هدف:** در افراد مستعد به صرع، کاهش مهار وابسته به گابا می‌تواند یکی از مکانیسم‌های ایجاد حملات تشنجی باشد. نورواستروئیدهای درونی همانند پروژسترون با اثر بر روی گیرنده‌های گابا A و افزایش هدایت یون کلر سبب مهار تشنج می‌گردند. با توجه به شیوع و عوارض حملات صرعی و اهمیت مهار آن‌ها، تحقیق حاضر به منظور بررسی تأثیر تزریق داخل صفاقی پروژسترون به موش‌های تازه متولد شده بر روی استعداد آن‌ها برای ایجاد کیندلینگ با پنتیلن تترازول انجام گرفت.

**روش بررسی:** این تحقیق تجربی بر روی ۳۲ موش نر و ماده‌ی تازه متولد شده‌ی نژاد ویستار (Wistar) انجام گرفت. در این تحقیق موش‌ها به شکل تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند که عبارت بودند از: موش‌های ماده با تزریق پروژسترون، موش‌های نر با تزریق پروژسترون، موش‌های ماده با تزریق سزاموئید و موش‌های نر با تزریق سزاموئید. پروژسترون با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان به موش‌های تازه متولد شده تزریق شد و ۶۰ روز پس از تزریق میزان استعداد آن‌ها برای کیندلینگ شیمیایی با تزریق پنتیلن تترازول مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تزریق پروژسترون به موش‌های نر و ماده پس از تولد می‌تواند در دراز مدت استعداد ابتلا به کیندلینگ در موش‌های ماده را به شکل معنی‌داری افزایش دهد در حالی که بر روی استعداد ابتلا به کیندلینگ در موش‌های نر تأثیری ندارد. **نتیجه‌گیری:** تزریق پروژسترون در دراز مدت می‌تواند استعداد ابتلا به کیندلینگ را در موش‌های ماده افزایش دهد که این اثر بر خلاف اثرات کوتاه مدت آن است.

**واژگان کلیدی:** کیندلینگ شیمیایی، پنتیلن تترازول، پروژسترون

### مقدمه

مکانیسم‌هایی برای جلوگیری از تخلیه‌ی نورونی غیرطبیعی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به گیرنده‌های گابا اشاره کرد (۲). اتصال میانجی عصبی گابا به این گیرنده‌ها سبب

صرع یکی از اختلالات عصبی مزمن در انسان است که در مجموع به وسیله‌ی حملات متناوب حسی، حرکتی، روانی و یا اتونومیک مشخص می‌گردد (۱). در دستگاه عصبی مرکزی

\*دکترای تخصصی فیزیولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اراک

\*\*دانشجوی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک

نوزاد یک روزه‌ی موش انجام گرفت. موش‌ها به شکل تصادفی ساده به چهار گروه تقسیم بندی شدند که عبارت بودند از: موش‌های ماده با تزریق پروژسترون، موش‌های نر با تزریق پروژسترون، موش‌های ماده با تزریق سزاموئید و موش‌های نر با تزریق سزاموئید. در این مطالعه پروژسترون در سزاموئید (روغن کنجد) حل شده و با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان به موش‌های تازه متولد شده تزریق شد (۱۰). ۶۰ روز پس از تزریق پروژسترون، به منظور بررسی استعداد حیوان برای ابتلا به کیندلینگ شیمیایی، داروی پنتیلن تترازول با غلظت ۴۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان به شکل داخل صفاقی هر ۴۸ ساعت یک بار به آن‌ها تزریق شد (۱۱). پس از تزریق دارو رفتارهای حیوان برای مدت ۲۰ دقیقه زیر نظر گرفته شد و پاسخ‌های تشنجی حیوان بر اساس تحقیقات قبلی (۱۲) به شکل زیر طبقه بندی شد. مرحله‌ی صفر: عدم پاسخ؛ مرحله‌ی اول: انقباض عضلات صورت و گوش‌ها؛ مرحله‌ی دوم: موج انقباضی بدن؛ مرحله‌ی سوم: پرش‌های میوکلونیک و ایستادن روی دو پا؛ مرحله‌ی چهارم: افتادن به پهلو و مرحله‌ی پنجم: افتادن به پشت و حملات عمومی تونیک و کلونیک. با ادامه‌ی تزریقات به تدریج مرحله‌ی حمله در موش‌ها افزایش پیدا کرده و در نهایت موش‌ها به مرحله‌ی پنج تشنج می‌رسیدند. پس از این‌که موش‌ها ۳ بار پی‌درپی مرحله‌ی پنج تشنج را از خود نشان دادند، کیندل شده به حساب آمده و تزریق پنتیلن تترازول در آن‌ها پایان می‌یافت. متغیرهای مهم مورد بررسی در این تحقیق عبارت بودند از: مدت زمانی که طول می‌کشد تا حیوان مرحله‌ی دوم تشنج را از خود نشان دهد، مدت زمانی که طول می‌کشد تا حیوان به مرحله‌ی پنج تشنج برسد، مدت زمانی که حیوان در مرحله‌ی پنج تشنج به‌سر می‌برد و مرحله‌ی حمله‌ای که حیوان پس از هر بار تزریق پنتیلن تترازول از خود نشان می‌دهد. به دلیل این‌که در برخی از حیوانات تشنج از مرحله‌ی اول و یا دوم بیشتر نمی‌شد و در این صورت

بازشدن کانال‌های کلری و در نتیجه هیپرپلاریزه شدن غشا و جلوگیری از ایجاد تخلیه‌های غیرطبیعی می‌گردد (۳). عقیده بر این است که در افراد مستعد به صرع، کاهش مهار وابسته به گابا می‌تواند یکی از مکانیسم‌های ایجاد حملات تشنجی باشد (۴). نورواستروئیدها، استروئیدهایی هستند که به شکل موضعی در مغز ساخته شده و به سرعت بر روی تحریک‌پذیری نورون‌ها اثر می‌کنند. نورواستروئیدهای درونی همانند پروژسترون با اثر بر روی گیرنده‌های گابا A و افزایش هدایت یون کلر سبب مهار تشنج می‌گردند (۵). در همین زمینه گزارش شده است که فرکانس تشنج‌های صرعی در خانم‌های مبتلا به صرع در انتهای سیکل قاعدگی که پروژسترون در کم‌ترین مقدار خود است، بیشتر است. از طرف دیگر در اواسط سیکل قاعدگی که غلظت پروژسترون بالا است تعداد تشنج‌های صرعی در این افراد کاهش می‌یابد (۶). اثر ضد صرعی پروژسترون در مدل‌های مختلف صرعی نیز گزارش شده است (۷-۹). تحقیقات پیشین نشان داده که اثر نورواستروئیدها بر روی مغز اثرات ماندگاری است که می‌تواند تا آخر عمر نیز باقی‌بماند (۱). با این حال اثر تزریق پروژسترون بلافاصله پس از تولد بر روی تحریک‌پذیری سیستم اعصاب مرکزی پس از بلوغ تاکنون مورد تحقیق قرار نگرفته است. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر تزریق داخل صفاقی پروژسترون به موش‌های تازه متولد شده‌ی نر و ماده بر روی استعداد ایجاد تشنج با پنتیلن تترازول پس از بلوغ است.

### روش بررسی

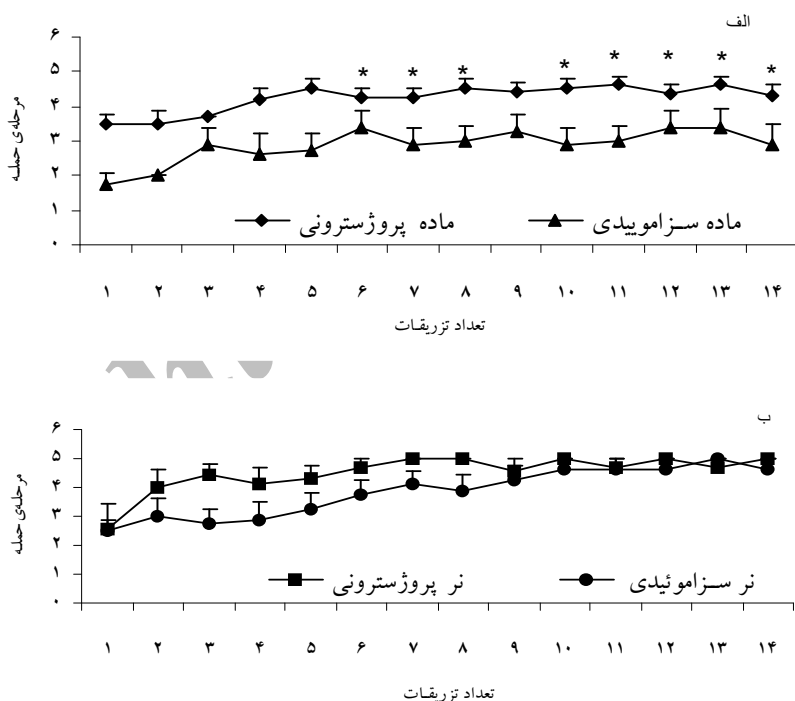
در این مطالعه‌ی تجربی از موش‌های صحرایی نر و ماده‌ی نژاد ویستار (Wistar) استفاده شده است. حیوانات در اتاقی با حرارت ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و آب و غذا به طور آزاد در اختیار آن‌ها قرار داشت. این تحقیق بر روی ۳۲

معکوس مدت زمانی که حیوان در مرحله‌ی پنجم تشنج به سر می‌برد، نیست (نمودارهای ۴-۱). مقایسه‌ی پارامترهای تشنجی در موش‌های ماده‌ای که پروژسترون را دریافت کرده بودند نشان داد که پروژسترون به شکل معنی‌داری بر روی متغیرهای تشنجی تأثیر داشته و سبب تسهیل ایجاد کیندلینگ در آن‌ها می‌گردد (نمودارهای ۲-۱). تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که بین موش‌های ماده‌ای که پروژسترون دریافت می‌کردند و موش‌های ماده‌ای که حلال پروژسترون یعنی سزاموید را دریافت کرده بودند در مرحله‌ی حمله اختلاف معنی‌داری وجود داشت به شکلی که موش‌های پروژسترونی در طی روند ایجاد کیندلینگ مرحله‌ی حمله‌ی بالاتری را نشان می‌دادند ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۱).

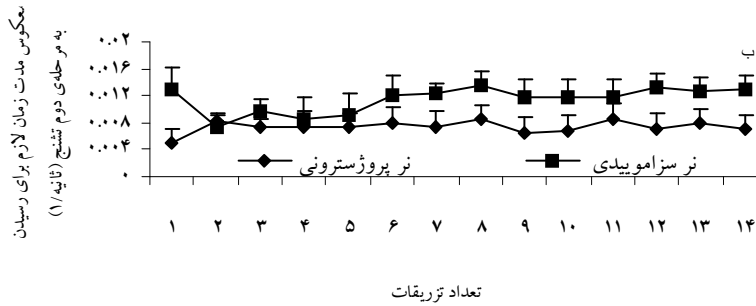
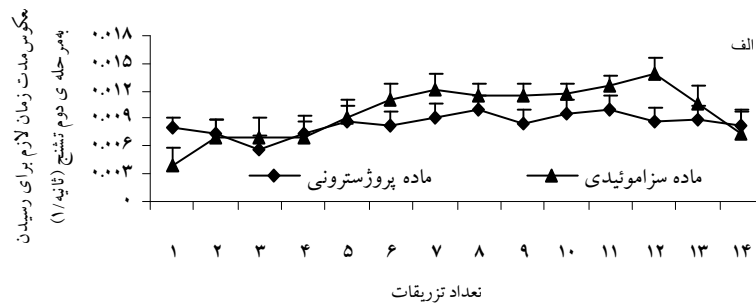
اندازه‌ی پارامترهایی مثل مدت زمانی که طول می‌کشد تا حیوان مرحله‌ی پنجم تشنج را از خود نشان دهد بی‌نهایت می‌شد برای تجزیه و تحلیل آماری از معکوس این متغیرها استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی انجام گرفت.

## یافته‌ها

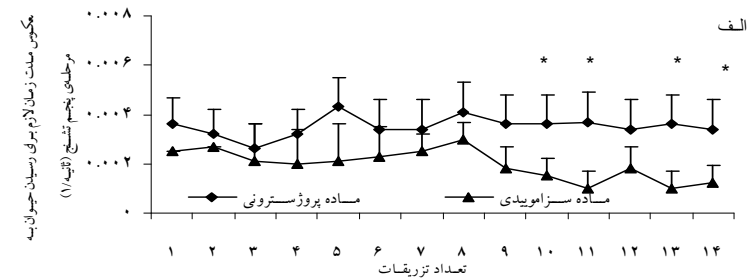
نتایج حاصل از تزریق پروژسترون به موش‌های نر نشان داد که در این موش‌ها، پروژسترون قادر به اثر بر روی مرحله‌ی حمله و یا پارامترهای دیگر تشنجی از قبیل معکوس مدت زمانی که طول می‌کشد تا حیوان مرحله‌ی دوم تشنج را از خود نشان دهد و یا معکوس مدت زمانی که طول می‌کشد تا حیوان مرحله‌ی پنجم تشنج را از خود نشان بدهد و یا



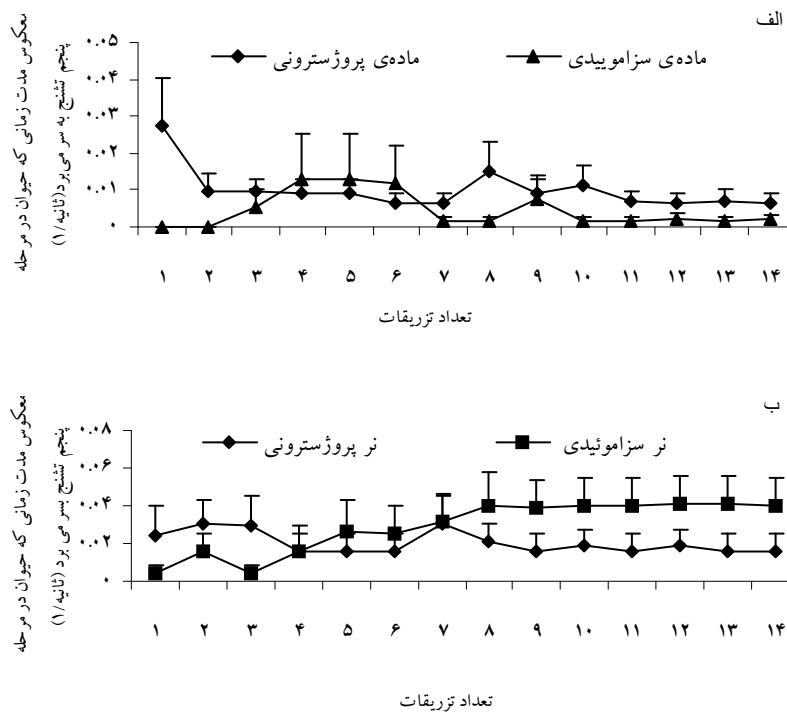
نمودار ۱: مقایسه‌ی پیشرفت مرحله‌ی حمله در موش‌های نر و ماده‌ی پروژسترونی و سزامویدی. مقادیر به صورت میانگین  $\pm SEM$  ارائه شده‌اند ( $*P < 0.05$ ). موش‌های پروژسترونی در طی روند ایجاد کیندلینگ مرحله‌ی حمله‌ی بالاتری را نشان می‌دهند.



نمودار ۲: مقایسه‌ی معکوس مدت زمان لازم برای رسیدن حیوان به مرحله‌ی دوم تشنج در موش‌های نر و ماده‌ی پروژسترونی و سزاموئیدی. مقادیر به صورت میانگین  $\pm SEM$  ارائه شده‌اند. مقایسه‌ی پارامترهای تشنجی مثل معکوس مدت زمانی که طول می‌کشد تا حیوان مرحله‌ی دوم تشنج را از خود نشان دهد، نشان داد که بین موش‌های ماده پروژسترونی و سزاموئیدی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.



نمودار ۳: مقایسه‌ی معکوس مدت زمان لازم برای رسیدن حیوان به مرحله‌ی پنجم تشنج در موش‌های نر و ماده‌ی پروژسترونی و سزاموئیدی. مقادیر به صورت میانگین  $\pm SEM$  ارائه شده‌اند. مقایسه‌ی معکوس مدت زمانی که طول می‌کشد تا حیوان ماده مرحله‌ی پنجم تشنج را از خود نشان دهد نشان داد که این زمان در موش‌هایی که پروژسترون دریافت کرده‌اند از موش‌های سزاموئیدی بیشتر است ( $P < 0.05$ ).



نمودار ۴: مقایسه‌ی معکوس مدت زمانی که حیوان در مرحله‌ی پنجم تشنج به سر می‌برد در موش‌های نر و ماده‌ی پروژسترونی و سزاموئیدی. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  SEM ارائه شده‌اند. مقایسه‌ی معکوس مدت زمانی که حیوان در مرحله‌ی پنجم تشنج به سر می‌برد نیز نشان داد که در بین دو گروه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

کیندلینگ در آن‌ها می‌گردد (۱۳). در مطالعه‌ی دیگری نیز ادوارد و همکارانش نشان داده‌اند که پروژسترون سبب افزایش آستانه‌ی ابتلا به صرع می‌گردد در حالی که استروژن این آستانه را کاهش می‌دهد (۱۴). به نظر می‌رسد که اختلاف زیادی در مورد اثر حاد و مزمن عوامل مؤثر بر روی گیرنده‌های گابا A وجود دارد. در حالی که به کار بردن حاد این عوامل اثر مثبت بر روی گیرنده‌های گابا A دارد (۱۵). اثر مزمن این عوامل بر روی این گیرنده‌ها اثرات معکوسی ایجاد می‌کند (۱۶). بر این اساس می‌توان گفت که عوامل درونی مؤثر بر روی گیرنده‌های گابا A مانند متابولیت‌های پروژسترون نیز دارای اثرات متفاوت حاد و مزمن هستند.

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که تزریق پروژسترون به موش‌های تازه متولد شده‌ی نر اثری بر روی استعداد آن‌ها برای ایجاد کیندلینگ شیمیایی با پتیلین ترازول ندارد، در حالی که تزریق پروژسترون به موش‌های ماده سبب تسهیل ایجاد کیندلینگ شیمیایی در آن‌ها می‌گردد.

## بحث

در مورد اثر هورمون‌های جنسی بر روی کیندلینگ تحقیقات زیادی صورت گرفته است. به عنوان مثال، ادوارد و همکارانش نشان داده‌اند که تجویز حاد پروژسترون به موش‌های نر گنادکتومی شده موجب تأخیر در شروع

داده‌اند که قرارگیری مداوم جنس ماده در معرض نورواستروئیدها سبب تنظیم بیان ژن نوروپپتیدها در آمیگدال می‌گردد (۲۰). بنابراین بیان ژن نورواستروئیدها در آمیگدال که از حساس‌ترین مناطق مغزی دخیل در ایجاد صرع در موش است می‌تواند توجه‌کننده‌ی تفاوت پاسخ موش‌های نر و ماده نسبت به اثرات مزمن پروژسترون باشد. با این حال چندین عامل دیگر نیز ممکن است در ایجاد تفاوت پاسخ موش‌های نر و ماده به اثرات مزمن پروژسترون مؤثر باشند. از این عوامل می‌توان هورمون‌های استروئیدی دیگر به جز پروژسترون مثل آندروژن‌ها و یا استروژن را نام برد.

### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که قرارگیری طولانی مدت در معرض پروژسترون سبب افزایش حساسیت موش‌های ماده نسبت به کیندلینگ شیمیایی با پنتیلن تترازول می‌گردد. این اثر در موش‌های نر دیده نمی‌شود که می‌تواند نشان‌دهنده‌ی تفاوت دو جنس در پاسخ‌گویی به اثرات درازمدت پروژسترون باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد، بنابراین نگارندگان مقاله مراتب تشکر خود را اعلام می‌دارند.

بنابراین تنظیم بیان گیرنده‌های گابا A و چگونگی عمل نورواستروئیدها بر روی آن‌ها برای درک اثر استروئیدهای همانند پروژسترون بر روی مهار و یا تحریک تشنج ضروری است. به این ترتیب به نظر می‌رسد که علی‌رغم اثرات مهاری تزریق حاد پروژسترون بر روی کیندلینگ شیمیایی و تشنج (۷-۱۰) تزریق مزمن پروژسترون با کاهش تعداد گیرنده‌های گابا A سبب افزایش حساسیت حیوان برای ایجاد تشنج می‌گردد (۱۷). هم‌چنین به نظر می‌رسد قرارگیری مداوم در معرض پروژسترون با تغییر زیربخش‌های گیرنده‌ی گابا سبب تغییر حساسیت این گیرنده نسبت به نورواستروئیدها و از آن جمله پروژسترون می‌گردد. در تأیید این نظریه ردی و کول کارینی نشان داده‌اند که تجویز مزمن متابولیت پروژسترون یعنی سولفات پرگنولون (Pregnenolone Sulfate) به موش‌های سوری بالغ سبب تسهیل ایجاد کیندلینگ شیمیایی با پنتیلن تترازول در آن‌ها می‌گردد (۱۷). به این ترتیب به نظر می‌رسد مدت زمان اثرات درازمدت پروژسترون که در تحقیقات قبلی چند ساعت ذکر شده (۱۸) تا دو ماه پس از تزریق پروژسترون نیز باقی می‌ماند.

در مورد تفاوت اثر پروژسترون در جنس نر و ماده، تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که موش‌های ماده نسبت به اثرات پروژسترون حساسیت بیشتری دارند (۱۹) که با نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر همسو می‌باشد. این موضوع می‌تواند تأییدی بر این یافته باشد که پاسخ موش‌های نر و ماده نسبت به اثرات استروئیدها متفاوت است. شواهد اخیر نیز نشان

### منابع

- 1- Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S. Learning and memory. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell T.M, editors. *Principles of neural science*. 4th ed, New York: McGraw-Hill; 2000; 1227- 46.
- 2- Bowery NG, Smart TG. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol*. 2006; 147: S109-19.
- 3- Dng J, Kerr DI. Clinical potential of GABA B receptor modulators. *CNS Drug Rev*. 2005; 11: 317- 34.

- 4-Belelli D, Herd MB, Mitchell EA, et al. Neuroactive steroids and inhibitory neurotransmission: mechanisms of action and physiological relevance. *Neuroscience*. 2006; 138: 821- 9.
- 5- Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peter JA. Neurosteroid modulation of GABA A receptors. *Prog Neurobiol*. 2003; 71: 67- 80.
- 6- Maguire JL, Stell BM, Rafizadeh M, Mody I. Ovarian cycle- linked changes in GABA (A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci*. 2005; 8: 697- 9.
- 7- lonsdale D, Burnham WM. Anticonvulsant effect of progesterone and 5-  $\alpha$ -dihydro progesterone on amygdale-kindled seizure in rats. *Epilepsia*. 2003; 44: 1494- 9.
- 8- Edwards HF, Burnham WM. Limbic seizures after reproductive function in the female rat. *Epilepsia*. 1999; 40: 1370- 7.
- 9- Reddy DS, Castaneda DC, OMalley BW, Rogawski MA. Anticonvulsant activity of progesterone and neurosteroids in progesterone receptor knockout mice. *J Pharmacol Expri Ther*. 2004; 310: 230- 39.
- 10- Kokate TG, Banks MK, Magee T, Yamaguchi S, Rogawski MA. Finasteride, a 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, blocks the anticonvulsant activity of progesterone in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 288: 679- 84.
- 11- Palizvan MR, Fathollahi Y, Semnianian S, Hajezadeh S, Mirnajafizadh J. 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 Res*. 2001; 898: 82- 90.
- 12-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- 8.
- 13- Edwards HE, Mo V, Burnham WM, MacLusky NG. Gonadectomy unmasks an inhibitory effect of progesterone amygdale-kindling in male rat. *Brain Res*. 2001; 889: 260- 3.
- 14- Edwards HE, Burnham WM. Steroid hormones effect limbic after discharge thresholds and kindling rats in adults female rats. *Brain Res*. 1999; 838: 136- 50.
- 15- Guidotti A, Dong E, Matsumoto K, Pinna G, Rasmusson AM, Costa E. The socially- isolated mouse: a model to study the putative role of allopregnanollone and 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone in psychiatric disorders. *Brain Res Rev*. 2001; 37: 110- 15.
- 16- Gulinello M, Gong QH, Li X, Smith SS. Short-term exposure to a neuroactive steroid increased anxiety in female rat. *Brain Res*. 2002; 910: 55- 66.
- 17- Reddy DS, Kulkarni SK. Proconvulsant effects of neurosteroids pregnenolone sulfate and dehydroepiandrosterone in mice. *Eur J Pharmacol*. 1998; 345: 55- 9.
- 18- Smith S, Gong Q, Hsu F, Markowitz R, French-Mullen J, Li X. GABA (A) receptor  $\alpha$ 4 subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature*. 1998; 392: 926- 30.

19- Riazi K, Honar H, Homayoun H, et al. Sex and steruse cycle differences in the modulatory effects of morphine on seizure susceptibility in mice. *Epilepsia*. 2004; 45: 1035- 42.

20- Ferrara G, Serra M, Zammaretti F, et al. Increased expression of the neuropeptid Y receptor Y(1) gene in the medial amygdala of transgenic mice induced by long-term treatment with progesterone or allopregnanolone. *J Neurochem*. 2001; 79: 417- 25.

Archive of SID