

## اثرات استرادیول بر تشنج‌های ایجاد شده به روش کیندلینگ الکتریکی آمیگدال در موش‌های صحرائی نر

مهدی صابری، محمد حسین پور غلامی، معصومه جرجانی

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، بخش فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب

### چکیده

مدل کیندلینگ آمیگدال به استرادیول حساس بوده و استرادیول سرعت کیندلینگ را تشدید می نماید لیکن آثار استروژن بر روند تشنج (تسریع و تاخیر در بروز، مدت زمان تشنج و تخلیه های متعاقب) تاکنون بررسی نشده است. در این تحقیق اثرات تجویز مزمن استرادیول بنزوات بر متغیرهای حملات تشنجی با استفاده از مدل کیندلینگ الکتریکی آمیگدال مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا موشهای صحرائی نر با تحریکات متوالی روزانه آمیگدال، بطور کامل کیندل شدند سپس با دوزهای مختلف استرادیول بنزوات ( $10 \mu\text{g/kg}$ ،  $30$  و  $50$  بصورت داخل صفاقی) هر روز تحت درمان قرار گرفته و متغیرهای کیندلینگ شامل مراحل تشنج (SS)، مدت زمان تخلیه‌های متعاقب (ADD) و مرحله ۵ تشنج (S5D) در زمانهای مختلف (۱۵ و ۱۸۰ دقیقه و هر ۲۴ ساعت تا ۹۶ ساعت) ثبت گردیدند.

استرادیول بنزوات به میزان  $10 \mu\text{g/kg}$  هیچگونه تغییر معنی داری بر متغیرهای کیندلینگ ایجاد نمود در حالیکه با تجویز  $30 \mu\text{g/kg}$  یا  $50 \mu\text{g/kg}$  اثری سه مرحله‌ای بر متغیرها ایجاد کرد. در ابتدا ADD پس از ۱۵ دقیقه به طور معنی‌داری افزایش یافت ولی پس از ۴۸ ساعت همه پارامترها کاهش بسیار معنی‌داری را نشان دادند. سپس افزایش قابل ملاحظه‌ای در S5D پس از ۹۶ ساعت مشاهده گردید.

پیش‌درمانی با تاموکسیفن سترات به میزان  $3 \text{ mg/kg}$  اثرات استرادیول را تا ۷۲ ساعت مهار نمود در حالیکه پیش‌درمانی با میزان  $10 \text{ mg/kg}$  از دارو فقط اثر مهاری استرادیول را بر متغیرهای کیندلینگ پس از ۴۸ ساعت وقفه داد. در عین حال تجویز تاموکسیفن سترات به میزان  $10 \text{ mg/kg}$  به تنهایی اثراتی مشابه مصرف استرادیول ایجاد نمود. این نتایج نشان می‌دهد استرادیول متغیرهای کیندلینگ را به صورت وابسته به دوز و زمان و نیز با اثرات دوگانه (افزایش و کاهش) در موشهای صحرائی نر تغییر می‌دهد. این آثار احتمالاً به دو صورت غیر ژنومیک و ژنومیک بروز می‌نماید. نتایج ناشی از مصرف تاموکسیفن به تنهایی را می‌توان به اثرات آگونیست نسبی آن بر گیرنده‌های استروژنی نسبت داد.

واژه‌های کلیدی: استرادیول بنزوات، تشنج، صرع، آمیگدال، کیندلینگ الکتریکی، تاموکسیفن سترات

### مقدمه

باافتهای مغزی وجود دارد [۲، ۴، ۳۷، ۳۶، ۳۲، ۲۶، ۱۵، ۱۲، ۷، ۶]. افزایش فرکانس و شدت حملات تشنجی که

شواهد زیادی مبنی بر اثرات هورمونهای جنسی بر بافتهای عصبی، بویژه خصوصیات صرع زایی استروژن بر

تخمندان سبب تغییر سطح هورمون‌های دیگر بویژه GnRH و FSH, LH گردیده که هر یک می‌توانند فعالیت‌های تشنجی را تحت تأثیر قرار داده [۲۶, ۲۱] یا به صورت ثانویه اثر استروژن را در تشدید فعالیت‌های سیناپسی افزایش دهد [۲۱]. استفاده از جنس نر نیازی به گنادکتومی نداشته و شرایط فیزیولوژیک ثابت خواهد ماند. از این گذشته استرادیول یکی از متابولیت‌های هورمون اصلی جنس نر یعنی تستوسترون بوده که از طریق آنزیم آروماتاز ایجاد می‌گردد. این آنزیم در مغز نیز بسیار فعال می‌باشد [۱۳, ۱۲]. این نکته مشخص نیست که آیا اثر  $E_2$  بر فعالیت‌های تشنجی به جنس ماده محدود بوده یا در جنس نر نیز چنین آثاری را دارا است. لذا با توجه به موارد فوق، هدف اصلی این مطالعه جواب به این سوال بود که آیا متغیرهای ذکر شده در مدل کیندلینگ، در جنس نر و در شرایط فیزیولوژیک به آثار صرع زایی احتمالی حساس بوده و در صورت تغییر شاخص‌های کیندلینگ، آیا چنین تغییراتی از طریق گیرنده استروژنی، ژنومیک بوده یا غیر ژنومیک می‌باشند.

### مواد و روش‌ها

**جراحی حیوانات:** موش‌های صحرایی نر به وزن تقریبی ۳۲۰-۲۵۰ گرم، تحت بیهوشی با پنتوباریتال سدیم داخل صفاقی (۵۰ mg/kg)، با استفاده از دستگاه استرنوتاکسی جهت نصب الکتروود (استیل زنگ نزن با پوشش تفلن، مدل AM system USA INC) مورد جراحی قرار گرفته. یک الکتروود سه قطبی (دو قطب تحریکی و دیگری جهت ثبت) در هسته قاعده ای جانبی آمیگدال (با مختصات: قدامی ۲/۵mm به سمت عقب، ۴/۸mm به سمت راست نسبت به برگماو ۷/۵mm پایین‌تر از سطح سخت شامه) و دو الکتروود تک قطبی

با مرحله‌ای از دوران قاعدگی در ارتباط است، صرع دوران قاعدگی (Catamenial Epilepsia) نامیده می‌شود [۲۵]. فرکانس و شدت حملات در فاز لوتینیسی کاهش، ولی در فاز قبل از قاعدگی افزایش می‌یابد [۲۹, ۱۹]. این اثر به افزایش سطح استروژن به پروژسترون نسبت داده می‌شود [۳۶, ۲۹, ۱۹, ۱]. همچنین افزایش سطح استروژن در فازهای بدون تخمک‌گذاری نیز با افزایش فرکانس حملات نسبی و جنرالیزه همراه بوده و تزریق استروژن‌های کژوگه سبب القاء فعالیت‌های صرعی در الکتروانسفالوگرام شده است. [۲۱, ۸].

کیندلینگ الکتریکی بعنوان یک مدل حیوانی صرع بطور وسیعی مورد استفاده قرار گرفته و شامل تحریک الکتریکی ناحیه خاصی از مغز نظیر آمیگدال با فواصل زمانی منظم می‌باشد. در ابتدا تحریکات سبب ایجاد تخلیه‌های متعاقب (After discharges) بدون ایجاد تغییرات رفتاری می‌گردد. با ادامه تحریکات حیوان بطور پیش رونده‌ای دچار فعالیت تشنجی حرکتی و الکتریکی شده و در نهایت حملات کلونیک پایداری ایجاد گردیده که با حملات صرع نسبی کمپلکس نوع انسانی شباهت بسیار دارد [۲۸, ۲۷].

گزارش‌های زیادی مبنی بر حساسیت آمیگدال و نیز مدل کیندلینگ آمیگدال به استرادیول ( $E_2$ ) وجود دارد. استرادیول باعث تسریع در اکتساب کیندلینگ [۶] و نیز افزایش پرش‌های عضلانی بعد از اتمام حملات می‌گردد [۷] اما آثار این هورمون بر متغیرهای کیندلینگ نظیر مراحل تشنج (Seizure stages)، مدت زمان تخلیه‌های متعاقب (After discharge duration) و مرحله ۵ تشنج تاکنون بررسی نشده است. بعلاوه مطالعات قبلی در موش‌های صحرایی ماده با برداشت تخمدان انجام شده است [۴۲, ۴۰, ۳۸, ۳۷, ۳۳, ۳۲, ۲۰, ۱۸, ۱۷, ۱۱, ۷, ۶]. برداشت

روی سطح مجسمه نصب گردید.

**روش کیندلینگ:** ۱۰ روز پس از جراحی، با تعیین آستانه تحریک، حیوانات روزانه تحریک گردیدند تا به کیندلینگ کامل برسند. مشخصات تحریک الکتریکی شامل امواج مربعی دو فازی با فرکانس ۱۰۰ هرتز به مدت ۲ ثانیه و زمان هر پالس ۰/۵ میلی ثانیه بود. برای تعیین آستانه، اولین تحریک با حداقل جریان  $25 \mu A$  شروع و در صورت عدم پاسخ دهی، هر ۵ دقیقه  $25 \mu A$  به شدت جریان افزوده تا حداقل ۵ ثانیه تخلیه متعاقب ایجاد و ثبت گردد. مراحل تشنجی در طی اکتساب کیندلینگ براساس مدل تعریف شده توسط Racine (1972) بدین شرح می‌باشند [۲۸]:

مرحله ۰، وقفه رفتاری؛ مرحله ۱، انقباضات کلونیک عضلات صورت و دهان؛ مرحله ۲، تکان دادن سر و انقباضات کلونیک عضلات صورت و دهان؛ مرحله ۳، رفتارهای مراحل ۱ و ۲ و نیز کلونوس اندام قدامی با بلند کردن یک دست؛ مرحله ۴، حیوان دچار کلونوس اندام قدامی گردیده و روی دو پا بلند می‌گردد (Rearing)؛ مرحله ۵، شامل بلند شدن روی دو پا از دست دادن تعادل و افتادن (Rearing and falling) بوده که معمولاً به صورت تشنجهای منتشر بروز می‌نماید.

همه حیوانات قبل از دریافت دارو ۵ بار مرحله ۵ تشنج را با زمانی نسبتاً ثابت نشان می‌دادند که معرف کیندلینگ کامل می‌باشد.

**پروتکل آزمایشها:** جهت بررسی اثر دوزهای مختلف استرادیول بنزوات (EB) بر متغیرهای کیندلینگ، چهارگروه حیوان کیندل شده ( $n=6-8$ )، انتخاب و به ترتیب با  $0.5 \text{ ml/kg}$  روغن کنجد (حلال EB)، یا مقادیر  $50$ ،  $30$ ،  $10 \mu\text{g/kg}$  استرادیول بنزوات به صورت داخل صفاقی هر روز تحت درمان قرار گرفتند. تحریک حیوان

و ثبت پارامترها در روز اول در زمانهای پانزده و ۱۸۰ دقیقه و روزهای بعد، ۱۵ دقیقه پس از تزریق EB و در یک زمان معین تا ۹۶ ساعت انجام می‌گرفت. پارامترهای کیندلینگ شامل مراحل تشنج (SS)، مدت زمان تخلیه‌های متعاقب (ADD) و مرحله ۵ تشنج (SSD)، متعاقب هر تحریک، تعیین و ثبت می‌گردیدند. همچنین همه حیوانات ۲۴ ساعت قبل از تحریک، روغن کنجد دریافت نموده و متغیرهای فوق بعنوان کنترل قبل از دارو ثبت گردیدند.

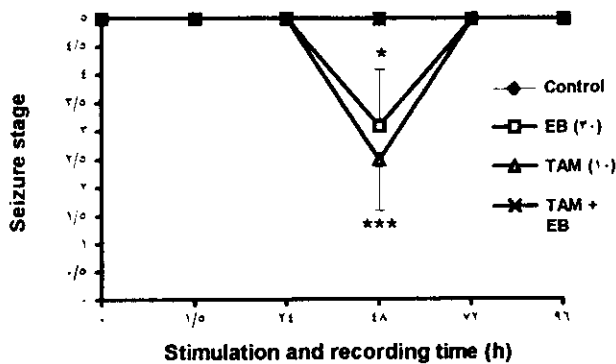
پس از مشاهده تغییرات ایجاد شده با تجویز استرادیول، جهت بررسی اثرات احتمالی ژنومیک این هورمون بر متغیرهای ثبت شده، تاموکسیفن سیترات به عنوان آنتاگونیست گیرنده استروژن مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا برای بررسی اثر تاموکسیفن به تنهایی، ۳ گروه حیوان کیندل شده ( $n=6-8$ ) انتخاب و روزانه ابتدا بترتیب گروه کنترل  $0.5 \text{ mg/kg}$  پروپیلن گلیکول (حلال دارو) و گروههای تست، ۳ یا  $10 \text{ mg/kg}$  تاموکسیفن بصورت داخل صفاقی دریافت می‌نمودند. ۷۵ دقیقه بعد روغن کنجد تزریق شد، تحریک حیوان و ثبت پارامترها در روز اول در زمانهای ۱۵ و ۱۸۰ دقیقه و روزهای بعد، ۱۵ دقیقه پس از تزریق روغن کنجد و در یک زمان معین تا ۹۶ ساعت انجام گرفت. سپس ۲ گروه حیوان کیندل شده انتخاب و مقادیر ۳ یا  $10 \text{ mg/kg}$  تاموکسیفن و به جای روغن کنجد، استرادیول بنزوات به روش فوق دریافت نموده، تحریک و ثبت نیز طبق زمانهای قبل انجام گرفت.

**مطالعات بافت شناسی:** جهت بررسی و اثبات قرار گرفتن دقیق نوک الکتروود در هسته قاعده‌ای - جانبی آمیگدال، پس از اتمام آزمایشها، سر حیوان را جدا و مغز را خارج نموده، برشهای مغزی در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفتند.

**روشهای آماری:** آزمونهای مورد استفاده شامل ANOVA

این میزان از EB بعنوان دوز اپتیمم جهت مطالعات بعدی بکار گرفته شد.

اثرات پیش درمانی با تاموکسیفن سترات: تاموکسیفن به میزان ۳ mg/kg به تنهایی، پس از ۷۲ ساعت ADD و SSD را بطور معنی‌داری کاهش داد (بترتیب  $P=0/030$  و  $P=0/006$ ), در حالیکه با میزان ۱۰ mg/kg آثاری مشابه EB به میزان ۳۰  $\mu\text{g/kg}$  ایجاد نمود (جدول ۳ و ۴).



شکل ۱ - اثر درمان مزمن با استرادیول بنزوات (EB، ۳۰  $\mu\text{g/kg}$ )، تاموکسیفن سترات (TAM، ۱۰ mg/kg) و پیش درمانی با TAM بر مراحل تشنج کیندلینگ (SS) در موش‌های صحرایی نر با کیندلینگ کامل که پس از دریافت EB یا حلال آن (روغن کنجد در گروه کنترل) بصورت داخل صفاقی در فواصل زمانی مختلف تحریک گردیده‌اند. داده‌ها بر حسب میانگین  $\pm$  انحراف معیار ترسیم گردیده‌اند.  $P < 0/05$  \* و  $P < 0/001$  \*\* نسبت به کنترل معنی‌دار است.

پیش درمانی روزانه با تاموکسیفن به میزان ۳ mg/kg سبب مهار اثرات EB بر متغیرهای کیندلینگ و نیز کاهش آنها به حدی پایین‌تر از میزان کاهش تا ۷۲ ساعت گردید. لیکن پس از ۹۶ ساعت SSD بصورت معنی‌دار طولانی

دو طرفه و سپس two tailed Paired t-test برای مقایسه گروه‌های دریافت کننده EB با کنترل قبل از درمان و Unpaired t-test جهت تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل یا بین گروه‌های مختلف درمانی و داده‌های با توزیع نرمال و Wilcoxon یا Mann-Whitney U-test برای داده‌های با توزیع غیر نرمال می‌باشند. مقایسه گروه‌های دریافت کننده EB با تاموکسیفن با استفاده از unpaired t-test یا ANOVA یا Mann-Whitney U-test انجام گرفت.  $P < 0/05$  به عنوان ملاک معنی‌دار بودن اختلافات در نظر گرفته شده است.

## نتایج

اثرات درمان مزمن با استرادیول: همه حیوانات کیندل شده از طریق تحریک مرحله ۵ حملات را نشان دادند. مطالعات بافت شناسی نشان داد نوک الکترودها در بخش قاعده‌ای - جانبی آمیگدال قرار گرفته‌اند.

مصرف دوزهای مختلف EB آثار متفاوتی را نشان داد. EB با میزان ۱۰  $\mu\text{g/kg}$  هیچگونه اثر معنی‌داری بر متغیرهای کیندلینگ نداشت ولی با دوز ۳۰  $\mu\text{g/kg}$  تغییراتی شامل سه مرحله مشاهده گردید. ابتدا افزایش سریع و معنی‌دار ADD پس از ۱۵ دقیقه ( $P=0/009$ ) و سپس SSD پس از ۱۸۰ دقیقه ( $P=0/031$ ) بروز نمود سپس همه پارامترها شامل ADD, SSD (جدول ۱ و ۲) و SS (شکل ۱) پس از ۴۸ ساعت بصورت معنی‌دار کاهش یافتند (بترتیب  $P=0/015$ ,  $P=0/007$  و  $P=0/034$ ). سرانجام افزایش معنی‌دار SSD پس از ۹۶ ساعت مشاهده شد ( $P=0/017$ ).

تجویز EB به میزان ۵۰  $\mu\text{g/kg}$ ، آثار تقریباً مشابهی را لیکن با تأخیر بیشتری ایجاد نمود. حداکثر تغییر در متغیرهای کیندلینگ با دوز ۳۰  $\mu\text{g/kg}$  ایجاد گردید لذا

گردید ( $P=0/017$ ). پیش درمانی با دوز ۱۰ mg/kg از دارو می نمود وقفه داد ( $P=0/035$ ). تنها آثار مهاری EB بر متغیرها را که ۴۸ ساعت بعد بروز

جدول ۱- اثرات درمان مزمن با دوزهای مختلف استرادیول بنزوات بر مدت زمان تخلیه های متعاقب (ADD) در زمانهای مختلف پس از تزریق داخل صفاقی حلال در گروه شاهد (روغن کنجد، ۰/۵ml/kg) یا استرادیول بنزوات در موشهای صحرائی نر با کیندلینگ کامل

مدت زمان تخلیه های متعاقب (ADD) بر حسب ثانیه در فواصل زمانی مختلف (ساعت) بعد از اولین تزریق							دوز استرادیول
۹۶	۷۲	۴۸	۲۴	۳	۰/۲۵	کنترل ۲۴ ساعت قبل از آزمایش	شاهد
۴۴/۱ ± ۴/۸	۴۴/۶ ± ۵/۱	۴۴/۰ ± ۵/۳	۴۳/۰ ± ۶/۰	۴۶/۱ ± ۴/۹	۴۶/۶ ± ۴/۶	۴۶/۶ ± ۵/۸	
۴۸/۲ ± ۹/۱	۴۲/۰ ± ۵/۵	۳۷/۲ ± ۷/۲	۴۱/۰ ± ۶/۶	۴۰/۹ ± ۳/۶	۴۰/۸ ± ۵/۰	۴۳/۶ ± ۴/۸	۱۰ μg/kg
۵۰/۰ ± ۴/۰	۳۸/۳ ± ۴/۲	۲۴/۴ ± ۶/۰*	۵۰/۰ ± ۳/۵	۵۲/۹ ± ۳/۶	۶۴/۸ ± ۸/۰***	۴۵/۸ ± ۴/۲	۳۰ μg/kg
۳۸/۵ ± ۵/۰	۲۷/۷ ± ۴/۰*	۴۱/۷ ± ۶/۶	۴۳/۵ ± ۳/۰	۵۴/۷ ± ۴/۵	۵۴/۲ ± ۳/۰	۴۵/۲ ± ۵/۰	۵۰ μg/kg

داده‌ها بر حسب میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند.  $P < 0/05$  \* و  $P < 0/01$  \*\* نسبت به کنترل ۲۴ ساعت قبل از دریافت دارو و (●) نسبت به شاهد معنی دار است، (n=6)

جدول ۲- اثرات درمان مزمن با دوزهای مختلف استرادیول بنزوات بر مدت زمان ۵ تشنج کیندلینگ (SSD) در زمانهای مختلف پس از تزریق داخل صفاقی حلال در گروه شاهد (روغن کنجد، ۰/۵ml/kg) یا استرادیول بنزوات در موشهای صحرائی نر با کیندلینگ کامل

مدت زمان مرحله ۵ کیندلینگ (SgD) بر حسب ثانیه در فواصل زمانی مختلف (ساعت) بعد از اولین تزریق							دوز استرادیول
۹۶	۷۲	۴۸	۲۴	۳	۰/۲۵	کنترل ۲۴ ساعت قبل از آزمایش	شاهد
۲۲/۰ ± ۳/۰	۱۹/۸ ± ۲/۳	۲۱/۵ ± ۲/۶	۲۰/۰ ± ۲/۷	۱۹/۷ ± ۳/۱	۲۰/۰ ± ۳/۵	۲۰/۰ ± ۳/۴	
۱۸/۰ ± ۱/۳	۲۱/۰ ± ۲/۳	۱۷/۶ ± ۲/۴	۱۷/۴ ± ۲/۴	۲۰/۲ ± ۳/۶	۱۹/۶ ± ۲/۵	۱۹/۶ ± ۲/۳	۱۰ μg/kg
۲۹/۶ ± ۳/۵*	۱۶/۲ ± ۳/۹	۹/۰ ± ۴/۱***	۲۰/۰ ± ۴/۰	۲۶/۹ ± ۲/۱*	۱۹/۶ ± ۳/۶	۲۱/۶ ± ۲/۸	۳۰ μg/kg
۱۴/۸ ± ۳/۰	۱۲/۰ ± ۳/۲*	۱۴/۷ ± ۳/۳	۱۹/۴ ± ۵/۲	۲۳/۱ ± ۴/۳	۱۸/۲ ± ۴/۷	۲۲/۲ ± ۴/۲	۵۰ μg/kg

داده‌ها بر حسب میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند.  $P < 0/05$  \* و  $P < 0/01$  \*\* نسبت به کنترل ۲۴ ساعت قبل از دریافت دارو و (●) نسبت به شاهد معنی دار است، (n=6)

جدول ۳- مقایسه اثرات درمان مزمن با استرادیول بنزوات (EB)، تاموکسیفن سترات (TAM) بر مدت زمان تخلیه های متعاقب (ADD) در موشهای صحرائی نر با کیندلینگ کامل

گروه های درمانی	مدت زمان تخلیه های متعاقب (ADD) بر حسب % کنترل در زمانهای مختلف (ساعت) بعد از اولین تزریق EB یا حلال آن					
	۰/۲۵	۳	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
EB (۳۰ μg/kg)	۱۴۱/۴ ± ۲/۳**	۱۲۷/۲ ± ۱۳/۸	۱۰۹/۱ ± ۸/۸	۵۳/۲ ± ۹/۶*	۸۳/۶ ± ۱۴/۱	۱۰۹/۱ ± ۸/۰
TAM (۳mg/kg) + S.O	۱۰۲/۴ ± ۶/۸	۱۰۱/۷ ± ۵/۱	۹۸/۷ ± ۶/۶	۸۹/۸ ± ۱۱/۴	۶۵/۱ ± ۱۰/۰*	۷۵/۴ ± ۱۴/۳
TAM (۳mg/kg) + EB	۸۴/۳ ± ۷/۳*	۹۴/۱ ± ۲/۰	۹۸/۵ ± ۱۰/۲	۹۹/۱ ± ۹/۹	۱۲۳/۳ ± ۲۸/۴*	۱۰۸/۸ ± ۹/۸
TAM (۱۰mg/kg) + S.O	۱۱۹/۲ ± ۱۰/۶*	۱۰۶/۹ ± ۱۱/۷	۹۷/۳ ± ۱۴/۴	۹۴/۰ ± ۱/۹*	۱۱۶/۶ ± ۷/۵	۱۴۰/۴ ± ۱۸/۱*
TAM (۱۰mg/kg) + EB	۱۱۵/۶ ± ۷/۳*	۱۱۰/۴ ± ۶/۴	۱۱۱/۶ ± ۵/۱	۱۰۶/۵ ± ۸/۳*	۱۱۶/۸ ± ۱۱/۲*	۱۴۰/۳ ± ۱۰/۹*

حیوانات هر روز TAM و EB یا هر دو دارو را بصورت داخل صفاقی دریافت می داشتند. TAM, ۷۵ دقیقه قبل از تزریق EB یا حلال آن (روغن کنجد, S.O) تزریق گردیده و ثبت در زمانهای مختلف روزانه ۱۵ دقیقه پس از تزریق EB یا حلال آن انجام شده است. مقادیر ارائه شده در جدول برحسب درصد ± انحراف معیار در هر گروه می باشد. گروه تست نسبت به کنترل مربوطه, (●) نسبت به گروه دریافت کننده TAM به تنهایی و نسبت به EB \* P < ۰/۰۵ و \*\* P < ۰/۰۱ معنی دار است, (n=۶-۷).

جدول ۴- مقایسه اثرات درمان مزمن با استرادیول بنزوات (EB)، تاموکسیفن سترات (TAM) و پیش درمانی با TAM بر مدت زمان مرحله ۵ تشنج (SSD) در موشهای صحرائی نر با کیندلینگ کامل.

گروه های درمانی	مدت زمان مرحله ۵ تشنج (SSD) بر حسب % کنترل در زمانهای مختلف (ساعت) بعد از اولین تزریق EB یا حلال آن					
	۰/۲۵	۳	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
EB (۳۰ μg/kg)	۹۹/۲ ± ۷/۸	۱۱۹/۴ ± ۷/۲*	۱۰۶/۷ ± ۵/۲	۳۳/۱ ± ۱۰/۸**	۱۱۰/۹ ± ۱۶/۷	۱۴۸/۷ ± ۱۱/۳*
TAM (۳mg/kg) + S.O	۹۸/۵ ± ۷/۳	۸۸/۲ ± ۱۵/۵	۹۹/۷ ± ۸/۴	۶۳/۵ ± ۱۱/۱*	۳۱/۸ ± ۱۱/۶***	۹۱/۲ ± ۱۶/۹
TAM (۳mg/kg) + EB	۸۵/۴ ± ۵/۰*	۹۷/۷ ± ۹/۴	۹۸/۰ ± ۶/۳	۸۶/۴ ± ۲۵/۱	۸۳/۱ ± ۲۱/۹*	۱۲۳/۳ ± ۶/۳*
TAM (۱۰mg/kg) + S.O	۱۴۴/۶ ± ۲۶/۲*	۱۴۹/۶ ± ۱۸/۷*	۱۳۷/۶ ± ۱۴/۲	۸۸/۷ ± ۱۷/۳*	۱۶۰/۰ ± ۲۱/۱**	۱۴۸/۰ ± ۲۳/۴
TAM (۱۰mg/kg) + EB	۱۵۳/۵ ± ۲۰/۸*	۱۵۰/۵ ± ۱۸/۱*	۱۳۵/۱ ± ۱۱/۳**	۱۳۵/۵ ± ۱۸/۳**	۱۳۲/۰ ± ۱۴/۳	۱۴۷/۸ ± ۱۵/۰*

حیوانات هر روز TAM و EB یا هر دو دارو را بصورت داخل صفاقی دریافت می داشتند. TAM, ۷۵ دقیقه قبل از تزریق EB یا حلال آن (روغن کنجد, S.O) تزریق گردیده و ثبت در زمانهای مختلف روزانه ۱۵ دقیقه پس از تزریق EB یا حلال آن انجام شده است. مقادیر موجود در جدول بر حسب درصد کنترل ± انحراف معیار در هر گروه می باشد. گروه تست نسبت به کنترل مربوطه (●) نسبت به گروه دریافت کننده TAM به تنهایی و نسبت به EB با \* P < ۰/۰۵ و \*\* P < ۰/۰۰۱ معنی دار است, (n=۶-۷).

مطالعه, ADD در زمانهای ۲ و ۱۰ روز پس از دریافت E2 ثبت گردید و تغییری مشاهده نشده است [V]. مطالعه حاضر گزارشی درباره اثرات مزمن E2 و در حیوانات نر کیندل شده می باشد. مطالعه در جنس نر دو مزیت عمده را نسبت به جنس ماده دارا است: ۱- بررسی در جنس نر

بحث

بر اساس مطالعات انجام شده E2 اکتساب کیندلینگ را تسریع نموده و آستانه تحریک را در موش های صحرائی ماده کیندل شده به روشهای شیمیایی یا الکتریکی کاهش می دهد [۶, ۱۱]. ولی تنها در یک

وابستگی آثار E2 را به جنس می‌تواند مشخص نماید. ۲- در صورت استفاده از جنس نر، نیازی به گنادکتومی نبوده لذا شرایط به صورت فیزیولوژیک باقی خواهد ماند. مطالعات قبلی در این باره در جنس ماده اوارکتومی شده انجام گردید که گنادکتومی نیز شرایط فیزیولوژیک و لذا فعالیت صرعی یا استعداد بروز حملات را افزایش می‌دهد [۲۶، ۲۱].

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد اثرات درمان مزمن با مقادیر فارماکولوژیک EB در موشهای صحرایی نر در سه مرحله مشاهده می‌شود. در مرحله اول طولانی شدن ADD ۱۵ دقیقه پس از تزریق EB بروز نموده است. این زمان احتمالاً کوتاه‌تر از زمان لازم برای ایجاد اثرات ژنومیک استروئیدها می‌باشد بنابراین استروئید احتمالاً بیشتر با اثر مستقیم در سطح غشاء یا از طریق مکانیسمهای بعد رسپتوری عمل می‌نماید. همچنین تأخیری که در طولانی شدن ADD (سه ساعت) با مصرف دوز بالای EB ( $50 \mu\text{g/kg}$ ) بروز نموده اثرات غشائی را نفی نموده و شاید بیشتر با دوز دارو ارتباط داشته باشد. در حقیقت مطالعات قبلی نشان داده که اثرات E2 بر غشاء و نیز پیامبرهای ثانویه وابسته به دوز و زمان می‌باشد [۳۷، ۳۶، ۱۰]. به عنوان مثال E2 با میزان کم، فعالیت نیتریک اکساید سنتاز نرونها را افزایش داده با این افزایش میزان NO تحریکات عصبی را تشدید می‌نماید، ولی مقادیر زیاد E2 فعالیت آن را می‌کاهد [۱۰]. بعلاوه تجویز سیستمیک مقادیر زیاد E2 ابتدا سبب کاهش گذرای تحریکات زمینه‌ای و هیپرپولاریزاسیون سلولهای پیرامیدال مخچه [۳۴] و نرونها مرکزی آمیگدال ظرف چند دقیقه (و سپس افزایش تحریکات) گردیده است [۳۲، ۱۶].

هر چند اثر EB در افزایش ADD سریعتر از زمان

لازم برای بروز آثار ژنومیک می‌باشد لکن آثار ژنومیک را نمی‌توان نادیده گرفت. پیش‌درمانی با تاموکسیفن ( $3 \text{mg/kg}$ )، یک آنتاگونیست گیرنده E2 با اثر آگونیست نسبی [۳۹] نه تنها سبب مهار اثر این هورمون در طولانی شدن ADD و S5D گردید بلکه این شاخص‌ها را مشابه مصرف این دارو به تنهایی به مقادیر کمتر از کنترل کاهش داد لذا این کاهش احتمالاً از طریق مهار گیرنده E2 نبوده است بعلاوه پیش‌درمانی با میزان زیاد تاموکسیفن یا مصرف آن به تنهایی تقریباً آثاری مشابه EB ایجاد نموده است. تاموکسیفن دارای اثرات مختلفی بر غشاء و دیگر سیستمهای سلولی بوده که شامل توانایی مهار پروتئین کیناز C و cAMP- فسفودی استراز وابسته به کلسیم کالمودولین و حتی اثر آنتی اکسیدان در غشاء می‌باشد [۳۹]. در تأیید اثر اخیر گزارش شده که ویتامین E نیز اثرات دژنراتیو بر نرونها را مهار می‌نماید [۹].

گزارش هائی دال بر افزایش انتقال تحریکات در حدود ۱۰ دقیقه پس از تجویز E2 وجود دارد [۴۰، ۳۶، ۱۶]. تحقیقات بعدی این تغییرات سریع را در آمیگدال و بخش و نرومدیال هیپوتالاموس به تنظیم کانالهای پتاسیم ارتباط داده‌اند [۳۴، ۳۲، ۲۴]. پاسخ دهی نرونها به اسیدهای آمینه تحریکی [۳۷، ۳۶]، نوراپینفرین و استیل کولین را افزایش داده [۲۴، ۱۳] هدایت یونهای نظیر کلسیم و پتاسیم [۳۴، ۳۱، ۱۰] و نیز میزان گابا را تغییر می‌دهد [۳۸، ۱۳] لذا آثار این هورمون وسیعتر از آن بوده که بتوان درباره مکانیسم خاصی در بروز تغییرات حاصله اظهار نظر نمود.

مرحله دوم شامل کاهش معنی‌دار متغیرهای کیندلینگ (SS, ADD, S5D) ۴۸ ساعت پس از تجویز EB بروز نموده است که این اثر احتمالاً ژنومیک می‌باشد زیرا پیش‌درمانی با تاموکسیفن سبب مهار آن گردیده

آگونیستی نسبی آن برگزیده‌های استروژنی باشد. در حضور E2 تاموکسیفن بیشتری به گیرنده اتصال یافته لذا میزان و در نتیجه اثر تحریکی آن احتمالاً از طریق غشاء افزایش یافته است.

با توجه به نتایج حاصله می‌توان حدس زد آثار EB بر فعالیتهای صرعی یا حملات تشنجی در هر دو جنس نر و ماده عمومیت داشته و وابسته به جنس نمی‌باشد. هر چند تفاوت‌های آناتومیک مغزی و نیز هورمونی بین دو جنس موجود می‌باشد. بطور خلاصه، متغیرهای کیندلینگ را سریعاً و شاید بطریق غیر ژنومیک افزایش می‌دهد لکن آثار طولانی مدت آن احتمالاً با مجموعه‌ای از مکانیسمهای ژنومیک و غیر ژنومیک ایجاد می‌گردد بنابراین می‌توان پیشنهاد نمود افزایش اولیه سطح E2 می‌تواند فعالیت صرعی را تشدید نموده یا افزایش دهد ولی در طولانی مدت اثر این هورمون متغییر بوده و شامل وقفه یا مهار فعالیتهای صرعی نیز می‌گردد. در ضمن این آثار در مدل کیندلینگ الکتریکی آمیگدال موشهای صحرایی نر وابسته به دوز و زمان می‌باشد زیرا با دوزهای متفاوت و نیز در زمانهای مختلف تفاوت‌های معنی‌داری مشاهده گردیده است. بدیهی است تحقیقات بعدی در مورد اثرات صرع‌زایی این هورمون و مکانیسمهای احتمالی آن در جنس نر مورد نیاز می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده و بدین وسیله از کلیه مسولان و همکاران محترم حوزه پژوهشی دانشگاه تشکر و قدردانی می‌گردد.

است بعلاوه این نتیجه با بسیاری از گزارشهای قبلی مبنی بر افزایش اتصال به گیرنده‌های گابا-A [33]، افزایش سوخت و ساز و میزان آزاد شدن گابا [20, 13]، یا میزان mRNA آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (آنزیم محدود کننده میزان گابا در نورون های CA1 هیپوکامپ) [38]، 2 روز پس از درمان با E2 موافقت دارد همچنین میزان گیرنده‌های گابا ظرف 12 ساعت پس از تزریق دوز واحد افزایش یافته است [18] لذا این گزارش ها احتمالاً می‌توانند موید این مرحله از آثار مشاهده شده باشد.

در مرحله نهایی افزایش معنی‌دار SSD، نه تنها توسط تاموکسیفن وقفه نیافته بلکه تقویت گردیده است. این اثر ممکن است نتیجه مجموعی از مکانیسم‌های ژنومیک و غیر ژنومیک بر یک یا چند محل اثر E2 به شرح ذیل باشد:

1- آنزیم‌هایی نظیر کاتکول-O-متیل ترانسفراز (COMT) و تیروزین هیدروکسیلاز که ممکن است توسط E2، کاتکول استروژنها [22] و NO سنتاز تحت تأثیر قرار گیرند [10].

2- افزایش در تعداد و نیز تمایل گیرنده‌های اسیدهای آمینه تحریکی از نوع NMDA و Non-NMDA (3, 22, 40)، و تغییر در تعداد گیرنده‌های آلفا و بتا آدرنرژیک [23, 2] و نیز اپیوئیدی [14].

3- اثرات تحریکی E2 در ایجاد و افزایش دندریتهای نورونی [17 و 1] و یا تخریب موادی نظیر بتا-اندورفین [4 و 5].

4- افزایش پاسخ‌دهی به اسیدهای آمینه تحریکی [36]، نوراپینفرین و استیل کولین توسط E2 [24, 13].

افزایش متغیرها توسط تاموکسیفن شاید بدلیل اثر



## منابع

- [1] Backstrom, T., Epileptic seizure in women related to plasma estrogen and progesterone during menstrual cycle, *Acta Neurol. Scand.*, 54 (1976) 321-347.
- [2] Biegon, A., Reches, A. Snyder, L. and McEwen, S., Serotonergic and noradrenergic receptors in the rat brain: Modulation by chronic exposure to ovarian hormones, *Life Sci.*, 32 (1983) 2015-2021.
- [3] Brann, D. W. and Mahesh, V., B., Excitatory amino acids: Function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation, *Front Neuroendocrinol.*, 15 (1994) 3-49.
- [4] Brawer, J., Schipper, H. and Robaire, B., Effects of long-term androgen and estradiol exposure on the hypothalamus, *Endocrinology*, 112 (1983) 194-199.
- [5] Brawer, J. R., Beaudet, a., Desjardins, G.C. and Schipper, H. M., Pathologic effects of estradiol on the hypothalamus, *Biol. Reprod.*, 49 (1993) 647-652.
- [6] Buterbaugh, G. G., Acquisition of amygdala – kindled seizure in female rats: relationship between the effect of estradiol and intra – amygdaloid electrode location, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 28 (1987) 697-713.
- [7] Buterbaugh, G.G., Postictal events in amygdala kindled female rats with and without estradiol replacement, *Exp. Neurol.*, 95 (1987) 697-713.
- [8] Cramer, J. A. and Jones, E.E., Reproductive function in epilepsy, *Epilepsia*, 32 (1991) S19-S26.
- [9] Desjardins, G. C., Beaudet, A., Schpper, H. M. and Brawer, J.R, Vitamin E protects hypothalamic bala – endorphin neurons from estradiol neurotoxicity, *Endocrinology*, 131 (1992) 2482-2484.
- [10] Hayashi, T., Ishikawa, T., Yamada, Kuzuya, M., Natio, M., Hidaka, H. and Iguchi, A., Biphasic effects of estrogen on neural constitutive nitric oxide synthase via  $Ca^{2+}$ -calmodulin dependent mechanism, *Biochem. Biophys.* 203 (1994) 1013-1019.
- [11] Hom, A. C. and Buterbaugh, G. G., Estrogen alters the acquisition of seizures kindled by repeated amygdala stimulation or pentylenetetrazol administration in ovariectomized female rats, *Epilepsia*, 27 (1986) 103-108.
- [12] Jakab, R. L., Harad, N. and Naftalin, F., Aromatase-(estrogen synthase) immunoreactive neurons in the rat septal area. A light and electron microscopical study, *Brain Res.*, 664 (1994) 85-93.
- [13] Jarry, H., Elger, W., Duker, E. and Wuttke, W., Pituitary-dependent effects of estradiol-17- $\beta$  hydroxylase on catecholamine turnover rates, gamma amino butyric acid and glutamate concentration in various hypothalamic and limbic brain structures, *Acta Endocrinol.*, 118 (1988) 538-543.
- [14] Kelly, M. G., Loose, M. D. and Ronneklevi, O. K., Estrogen suppresses  $\mu$ -opioid and GABA<sub>B</sub> mediated hyperpolarization of hypothalamus arcuate neurons, *J. Neurosci*, 12 (1992) 2747-2750.
- [15] Li, C. S., Kaba, H., Satio, H. and Seto, K., Excitatory influence of the accessory olfactory bulb on tuberoinfundibular arcuate neurons of female mice and its modulation by estrogen, *Neurosciences*, 29 (1989) 201-208.
- [16] Li, C. S., Kaba, H., Satio, H. and Seto, K., Oestrogen infusions into the amygdala potentiate excitatory transmission from the accessory olfactory bulb to tuberoinfundibular arcuate neurons in the mouse, *Neurosci. Lett.*, 143 (1992) 48-50.
- [17] Lorenzo, A., Diaz, H., Carrer, H. and Caceres, A., Amygdala neurons in vitro: neurite growth and effects of estradiol, *J. Neurosci. Res.*, 38 (1992) 418-435.
- [18] Maggi, A. and Perez, J., Progesterone and estrogens in rat brain: Modulation of GABA receptor activity, *Eur. J. Pharmacol.*, 103 (1992) 165-168.
- [19] Maggi, A. and Perez, J., Role of female gonadal hormones in the C.N.S.: clinical and experimental aspects, *Life Sciences*, 37 (1985) 893-906.
- [20] Mansky, T., Mestres, V.P. and Wuttke, W., Involvement of GABA in the feedback action of estradiol on gonadotropin and prolactin release: hypothalamic GABA and catecholamine turnover rates, *Brain Res.*, 231 (1982) 353-364.
- [21] Matson, R. H. and Cramer, J. A., Epilepsy, sex hormones and antiepileptic drugs, *Epilepsia*, 26 (1985) 540-551.
- [22] McEwen, B.S., Neuroendocrine interactions.

- In: Blomm, F. E. and Kupfer, J. *Psychopharmacology*, Ltd, New York, Raven Press, (1995) 705-717.
- [23] McEwen, B. S., Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity, *Trends Pharmacol. Sci.*, 12 (1991) 141-147.
- [24] Mingkowsky, L. and Pfaff, D. W., Estrogen effects on neuronal responsiveness to electrical and neurotransmitter stimulation: an in-vitro study on the ventromedial nucleus of the hypothalamus, *Brain Res.*, 347 (1985) 1-10.
- [25] Newmark, M. E. and Penry, J. K., Catamenial epilepsy, *Epilepsia*, 21 (1980) 282-300.
- [26] Pfaff, D. W. and McEwen, B. S., Action of estrogens and progestins on nerve cells, *Science*, 219 (1983) 808-814.
- [27] Pourgholami, M. H., Mirnajafi-zadeh, J. and Behzadi J., Effect of intraperitoneal and intrahippocampal (CA1) 2-chloroadenosine in amygdaloid kindled rats, *Brain Res.*, 751 (1997) 259-264.
- [28] Racine, R. J., Modification of seizure activity by electrical stimulation II. Motor seizure, *Electroencephal. Clin. Neurophysiol.*, 32 (1972) 281-294.
- [29] Rosciszewska, D., Buntner, B., Guz, I. And Zawisza, L., Ovarian hormones, anti-convulsant drugs, and seizure during the menstrual cycle in women with epilepsy *J. Neurol. Neurosurg and Psychiatry*, 49 (1986) 47-51.
- [30] Sandra, L., Stitt, M. S. and Kinnard, W. J., The effects of certain Progestins and estrogens on the threshold of electrically induced seizure patterns, *Neurology*, 18 (1968) 213-216.
- [31] Schachter, S. C., Neuroendocrine aspects of epilepsy, *Neurologic Clinics*, 12 (1994) 31-40.
- [32] Schiess, M. C., Joles, M. and Gallagher, P. S., Estrogen priming affects active membrane properties of medial amygdala neurons, *Brain Res.*, 440 (1988) 380-385.
- [33] Schumacher, M., Coirini, H. and McEwen, B.S., Regulation of high-affinity GABA<sub>A</sub> receptors in the dorsal hippocampus by estradiol and progesterone, *Brain Res.*, 487 (1989) 178-183.
- [34] Schumacher, M., Rapid membrane effects of steroid hormones; an emerging concept in neuroendocrinology, *Trends Neurosci.*, 13 (1990) 359-361.
- [35] Shughrue, P. J. and Dorsa, D. M., Estrogen and androgen differently modulate the growth associated protein GAP-43 (neuromoduline) messenger ribonucleic acid in postnatal rat brain, *Endocrinology*, 134 (1994) 1321-1328.
- [36] Smith, S. S., Estrogen administration increases neuronal responses to excitatory amino acids as a long-term effect, *Brain Res.*, 503 (1989) 354-357.
- [37] Weiland, N. G., Estradiol selectively regulates agonist binding sites on the N-Methyl-D-Aspartate receptor complex in the CA1 region of hippocampus, *Endocrinology*, 131 (1992) 662-668.
- [38] Weiland, N. G., Glutamic acid decarboxylase messenger ribonucleic acid is regulated by estradiol and progesterone in the hippocampus, *Endocrinology*, 131 (1992) 2697-2701.
- [39] Wiseman, H., Tamoxifen: new membrane mediated mechanisms of action and therapeutic advances, *Trends Pharmacol. Sci.*, 15 (1994) 83-89.
- [40] Wong, M and Moss, R. L., Long term and short term electrophysiological effects of estrogen on the synaptic properties of hippocampal CA1 neurons, *J. Neurosci.*, 12 (1992) 3217-3225.
- [41] Wooley, C. S. and McEwen, B. S., Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat, *J. Neurosci.*, 12 (1992) 2549-2554.
- [42] Woolley, D. E. and Timiras, P.S., The gonadal-brain relationship: effects of female sex hormones on electroshock convulsions in the rat, *Endocrinology*, 70 (1962) 296-209.