Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۵ (۲)، ۱۹۰ – ۲۰۰
تابستان ۱۳۹۰

مواجهه موشهای صحرایی حامله با استرس شکارچی در دوران بارداری باعث تشدید تشنج القاء شده با پیلوکارپین در فرزندان آنها می شود

شیوا روشن میلانی[۱]، احسان صبوری[۱*]، رامین احمد زاده[۲]، علی اصغر پیله وریان[۲]
۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان

دریافت: ۱ تیر ۸۹ پذیرش: ۱۸ اسفند ۸۹

چکیده

مقدمه: استرس های دوران بارداری ممکن است با تغییر در تکامل مغزی جنین زمینه را برای تشدید و ایجاد صرع فراهم نمایند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات استرس شکارچی در دوران پره ناتال بر رفتارهای صرعی فرزندان در رتها بوده است.

روش ها: رتهای ماده نژاد ویستار (۲۰g±۲۰۰) به دو گروه تقسیم شدند: ۱. رتهای حامله دست نخورده (گروه کنترل) ۲. رتهای حامله تحت استرس (گروه استرس). در گروه استرس در روز ۱۵ حاملگی به مدت یک ساعت و برای ۳ روز متوالی قفس موشهای باردار در مجاورت قفس گربه قرار گرفت. در روز ۲۵ بعد از زایمان به فرزندان هر دو گروه پیلوکارپین (۱۵۰mg/kg.s,c) تزریق شد. سپس رفتار صرعی توله ها مشاهده و ثبت شد. همچنین سطح خونی هورمون کرتیکوسترون در گروههای مختلف مادران و فرزندان اندازه گیری شد.

یافته ها: میانگین مدت زمان تا شروع اولین رفتار صرعی در فرزندان گروه استرس (۰/۲۴± ۳/۱۸ دقیقه) نسبت به گروه کنترل (۰/۵۷±۵/۳۵) کاهش معنی دار و میانگین طول مدت حملات تونیک–کلونیک جنرال از ۰/۱ ± ۰/۵ دقیقه در گروه کنترل به ۳/۸ ± ۱۶ دقیقه در گروه استرس افزایش معنی داری یافت. از طرف دیگر، یک افزایش معنی دار در میزان مرگ و میر ۲۴ ساعته در گروه استرس و میزان سطح خونی کرتیکوسترون در مادران و فرزندان این گروه نسبت به کنترل وجود داشت.

نتیجه گیری: استرس دوران پره ناتال در رتها آستانه شروع حملات صرعی را کاهش و طول مدت حملات تونیک–کلونیک را افزایش میدهد ولی کشف مکانیسم مسئول این تشدید حملات بررسی بیشتری را می طلبد.

واژه‌های کلیدی: استرس شکارچی، تشنج، پیلوکارپین، پره ناتال، موش صحرایی

مقدمه

صرع به عنوان یک اختلال مهم نورولوژیک آمار ابتلای بالائی به میزان ۵ نفر در هر هزار نفر را به خود اختصاص داده است. صرع یک اختلال در فعالیت نورونها به شکل موقت و قابل برگشت است که در رفتار به شکل حملات تشنجی و در نوار مغزی به شکل موجهای تیز نیزه شکل یا Spike دیده می شود. اصطلاح صرع در بر گیرنده تعدادی سندرم مختلف است که جنبه ی اساسی تمامی آنها تمایل به تشنجات راجعه ای بدون اعمال محرک است [۱, ۷, ۹] و می تواند عوارض متعددی از جمله اختلالات یادگیری را بدنبال داشته باشد [۱۰, ۲۴]. گزارشات گذشته حکایت از آن دارند که ناهنجاریهای روحی– روانی از جمله استرس و وقایع مشتق از آن نظیر ترس،

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: saboory@umsu.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

www.SID.ir

Archive of SID

نگرانی و بی حوصلگی می توانند وقوع تشنج را تحت تاثیر قرار دهند. در مورد اثر استرس بر صرع هم اثرات تشدید کننده و هم مهار کننده (هر دو) بسته به نوع استرس و مدل تشنج گزارش شده است. تعدادی از مطالعات استرس را به عنوان عامل مستعد کننده تشنج معرفی کرده و اظهار می دارند که استرسهای هیجانی حتی در کسانی که هیچ سابقه ای از صرع ندارند ممکن است ایجاد تشنج حاد کند [۸] و یا حساسیت به درمان داروئی را در بیماران کاهش دهد [۱۷].

مطالعات پیشنهاد می کنند که روشهای تقلیل دهنده استرس و یا افزاینده سازگاری می توانند در کنترل تشنج در بیماران صرعی مفید باشند [۲۸, ۴۰]. از سوی دیگر گزارشات متناقضی مبنی بر اثر مهار کننده استرس بر صرع وجود دارد. در این راستا نشان داده شده است که استرسهای تجربی نظیر استرس شنا کردن در حیوانات اثرات ضد صرعی دارد [۳۱،۳۰]. مطالعات دیگر روی برشهای زنده مغزی در موشهای صحرایی و سوری نشان داده که استرس باعث تضعیف فعالیتهای تشنجی شده است. در این مورد ذکر شده که استرس دوران بارداری باعث کاهش تعداد حملات ایکتال و کاهش مدت زمان هر فعالیت بر روی برشهای هیپوکامپ و قشر انتورینال شده است [۱۶]. اگر چه ماهیت، علت و مکانیسم دقیق این اثرات متضاد به روشنی معلوم نیست و همچنین مکانسیم دخیل در ارتباط بین استرس و صرع نیز در هاله ای از ابهام قرار دارد [۱۱] اما این یافته ها حداقل گویای آن است که هیجانات و استرسهای روانی می توانند صرع و دیگر سندرمهای تشنجی را تحت تاثیر قرار دهند. بر اساس این اطلاعات ما فرض می کنیم که استرس مادر حامله می تواند یک فاکتور خطر موثر برای آسیبهای مغزی پری ناتال و تغییر حساسیت به صرع در فرزندان باشد. برای آزمایش این فرضیه، در مطالعه حاضر موشهای حامله در معرض استرس شکارچی (Predator Stress) قرار گرفتند و سپس، بعد از زایمان حساسیت به صرع و رفتارهای صرعی توله های آنها مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این تحقیق از ۵۶ راس موش صحرایی ماده با سن ده هفته استفاده شد. دو هفته بعد از رسیدن حیوانات به آزمایشگاه، هر یک از ماده ها با یک نر که قبلا تجربه جنسی داشت جفت شدند. در یک قفس مجزا در ساعت ۹ صبح موشها ی نر و ماده جفت شده و در ساعت ۳ بعد از ظهر موش ماده از نظر وجود پلاگ جفت گیری کنترل شد. بعد از مشاهده شدن پلاگ جفت گیری، ماده ها از نرها جدا شده، و در قفس های ۸ تایی با دوره شبانه روزی ۱۲ ساعته در دمای ۲۲-۲۴ درجه سانتی گراد با آب و غذای کافی نگهداری شدند. سپس موشها بطور تصادفی به دو گروه کنترل n= ۲۸ و گروه استرس n=۲۸ تقسیم شدند. زیر گروهها در موشهای گروه کنترل و استرس به ترتیب زیر بود: E18, P2, P6, P25.

گروه E18 شامل مادرانی بود که در روز ۱۸ بارداری برای سنجش میزان هورمون کرتیکوسترون (COS) از آنها نمونه خون گرفته شد. موشهای گروه P2, P6 شامل مادران و نوزادانی بودند که در روز ۶ و ۲ (به ترتیب) برای سنجش میزان هورمون COS از آنها نمونه خون گرفته شد. گروه P25 شامل موشهای مادر و فرزندان بود که در روز ۲۵ بعد از زایمان فقط فرزندان مشمول آزمایش با پیلوکارپین شدند. گروه کنترل بدون هیچ مداخله ای نگهداری شد. اما گروه استرس در شروع آخرین هفته بارداری (روز ۱۵ حاملگی) به ترتیب زیر تحت استرس قرار گرفت:

برای القاء استرس شکارچی موش های باردار در روز ۱۵ حاملگی، طی یک جلسه دو ساعته بین ساعت ۸ تا ۱۲ صبح، برای سه روز متوالی در مقابل قفس گربه قرار گرفتند. موش های حامله در مقابل قفس گربه طوری قرار گرفتند که هم موش و هم گربه در قفس های جدا گانه ای به فاصله ۳۰ سانتی متری از یکدیگر قرار داشتند.

به منظور القاء تشنج، در روز ۲۵ بعد از تولد به هر کدام از توله ها در گروه P25 (کنترل و استرس) داروی پیلوکارپین (Pilocarpine) به مقدار mg/kg ۱۵۰ به روش زیر جلدی تزریق شد. پیلوکارپین (Ingelheim Boehringer) از شرکت سینا دارو خریداری شد. به دنبال تزریق، رفتار هر یک از موش ها توسط دوربین دیجیتالی و دو نفر مشاهده گر ثبت شد و درجه حملات صرعی به ترتیب زیر مورد ارزیابی قرار گرفت.

رفتار صرعی در این مطالعه به صورت زیر طبقه بندی گردید [۳۴]:

www.SID.ir

Archive of SID

مرحله ۱: بی حرکتی
مرحله ۲: دراز کردن دستهای جلویی و یا دم
مرحله ۳: حرکات مکـرر، بـالا و پـایین رفـتن سـر (head bobbing)
مرحله ۴: قرار گرفتن روی دو پا و افتادن
مرحله ۵: مدام بلند شدن و افتادن
مرحله ۶: حملات تونیک وکلونیک شدید

پارامتر های دیگری نیز مثل مدت زمان تا بروز اولین تغییـر رفتار و طول مدت رسیدن به حداکثر تشنج مـورد ارزیـابی قـرار گرفت. همچنین حیوانات به مدت ۲۴ ساعت برای اثرات مرگبار پیلوکارپین مورد مشاهده قرار گرفتند.

بـرای انجـام آزمایشـات هورمـونی، در روز ۱۸ بـارداری در ساعت ۸ تا ۱۰ صبح تعداد ۷ راس از موش های حامله در گروه E18 (کنترل و استرس) گردن زده شدند و خـون تنـه آنهـا در لوله هـای میکـرو سـانتریفوژ بـا پوشـش EDTA جمـع آوری گردید. نمونه های خون جمع آوری شده در یخ نگه داری شدند وسپس به مدت ۲۰ دقیقه بـا سـرعت rpm ۹۰۰۰ در دمـای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردیدند. پلاسما بطور کامل به لوله های میکروسانتریفوژی انتقال یافت، و نمونـه هـای پلاسـمای بدست آمده در فریزر در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد برای تعیین میزان هورمون COS نگهداری شد. به همـین ترتیـب و با روش مشابه، در روز های دوم و ششم بعد زایمان سـاعت ۸– ۱۰ صبح، در هر کدام از گروههـای P2 و P6 تعـداد ۷ راس از موش های مادر به همراه نوزادان گردن زده شـده و خـون تنـه آنها نیز جمع آوری گردید. در ادامـه تمـامی خـون هـای جمـع آوری شده به منظور سنجش میزان هورمون COS آنالیز شدند. برای اندازه گیری COS از کیت رایوایمیونو اسـی ($COS\ I^{125}$ Rat RIA kit, Budapest, Hungry) استفاده شد.

نشانه های بروز تشنج (مراحـل شـش گانـه ذکـر شـده در قسمت بالا)، زمان نهفته برای شـروع حمـلات صـرعی، زمـان لازم برای بروز حداکثر واکـنش و مـرگ و میـر موشـها تـا ۲۴ ساعت بعد از تزریق پیلوکارپین در دو گروه کنترل و اسـترس از طریق آزمون non parametric ، Mann-Whitney test بـا هم مقایسه شدند. عـلاوه بـر ایـن غلظـت هورمـون COS در گروههای مختلف و در روزهای آزمـایش از طریـق ANOVA یک طرفه مقایسه شد. تمـام نتـایج بصـورت خطـای معیـار ± میانگین نشان داده شده و $p<0.05$ معنی دار تلقی شده است.

یافته ها

۳ الی ۶ دقیقه بعد از تزریـق داروی پیلوکـارپین درجـاتی از پیدایش و شکل گیری رفتارهای صرعی در هر دو گروه کنتـرل و استرس دیده شد که در ادامه علی رغم تشـابهاتی در کلیـات، ماهیت و روند تشدید یافتن علائم، از نقطه نظر توالی پیـدایش رفتارها، طول مدت هر رفتار و تعـداد دفعـات تکـرار تفاوتهـای قابل ملاحظه ای نشان دادنـد کـه نتـایج حاصـله در جـدول ۱ نشان داده شده است.

یکی از مهمترین تفاوتها بین دو گـروه کنتـرل و اسـترس، مدت زمان لازم از لحظه تزریق پیلوکارپین تا شروع اولین رفتار صرعی (موسوم به زمان نهفته) بود. میانگین این زمان در گروه کنترل ۰/۵۷ ± ۵/۳۵ دقیقه بود که در گروه تحت اسـترس بـه ۰/۲۴± ۳/۱۸ دقیقه کاهش یافت (شکل ۱– A). آنالیز آمـاری یک اختلاف معنی دار بین دو گروه مطالعه را نشان داد (0.005 =P).

بی حرکتی مطابق با مطالعات قبلی [۳۴] بـه عنـوان اولـین رفتار صرعی مشاهده شده در حیوانات، مورد ارزیابی قرار گرفت. در بررسی های به عمل آمده میانگین طـول مـدت زمـان بـی حرکتی و همچنین دفعات تکرار آن در گروه استرس بـه شـکل چشمگیری نسبت بـه گـروه کنتـرل کـاهش یافـت، بطوریکـه میانگین طول مدت بی حرکتی در گروه کنتـرل ۱۲/۶±۳۵/۵۷ دقیقه و در گروه تحت استرس ۰/۳± ۳/۸ دقیقه بـود کـه ایـن کاهش از نظر آماری معنی دار بود (P< 0.02). خلاصـه نتـایج مربوط به فاز بی حرکتی در هر دو گروه در جدول ۱ نشان داده شده است.

بدنبال فاز بی حرکتـی اکثـر حیوانـات هـر دو گـروه انـواع متفاوتی از سایر رفتارهای صرعی مثل حرکات تکرار شونده سر، روی دو پا ایستادن و افتادن، دراز کردن دم و غیـره را نشـان دادند که اطلاعـات مربـوط بـه ایـن رفتارهـا نیـز در جـدول ۱ خلاصه و با یکدیگر مقایسه شده است.

بدنبال بـروز رفتارهـای صـرعی فـوق، درجـاتی از تشـدید حملات صرعی به شکل حملات موضـعی و حمـلات عمـومی تونیک– کلونیک در حیوانات هر دو گروه ظـاهر شـد. میـانگین

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- نتایج رفتارهای صرعی بعد از تزریق زیرجلدی پیلوکارپین در موشهای صحرایی ۲۵ روزه

non parametric test Mann-Whitney	Stressed group(n=14)	Control group(n=14)	Epileptic Behavior
* *P=0.005*	3.2 ±0.24	5.35 ±۰/75	**Time to onset (min)**
* *P=0.04*	2.33 ±0.45	3.45 ±0.5	**Number of immobility**
* *P=0.02*	3.8 ±0.3	35.57±12.6	**Duration of immobility (min)**
	8.64 ±1.78	5.25 ±1	**Number of head bobs**
* *P=0.04*	1.26 ±0.2	0.68 ±0.08	**Duration of head bobing (min)**
	6.6 ±1.44	3.2±0.5	**Number of tail extension**
	1.04 ±0.16	0.76 ±0.14	**Duration of tail extension (min)**
* *P=0.037*	22.4 ±3.7	41.25 ±8.1	**Latency to tonic-clonic seizure (min)**
	5.6 ±1.5	4.6 ±1.1	**Number of focal seizures**
	1.36 ±0.3	1 ±0.35	**Duration of focal seizures (min)**
	5.15 ±0.6	5 ±1.2	**Number of tonic-clonic seizures**
* *P=0.001*	16 ±3.8	0.53 ±0.1	**Duration of tonic-clonic seizures (min)**

مقایسه پارامترهای مربوط به مراحل ششگانه رفتارهای صرعی پس از تزریق پیلوکارپین(۱۵۰ mg/kg.s,c) بین توله های موشهای صحرایی گروه کنترل(n=۱۴) و گروه استرس(n=۱۴) . گروه کنترل توله های مربوط به مادران دست نخورده بودند ولی گروه استرس توله های مادرانی بودند که در دوران حاملگی به مدت سه روز استرس شکارچی را تجربه کرده بودند

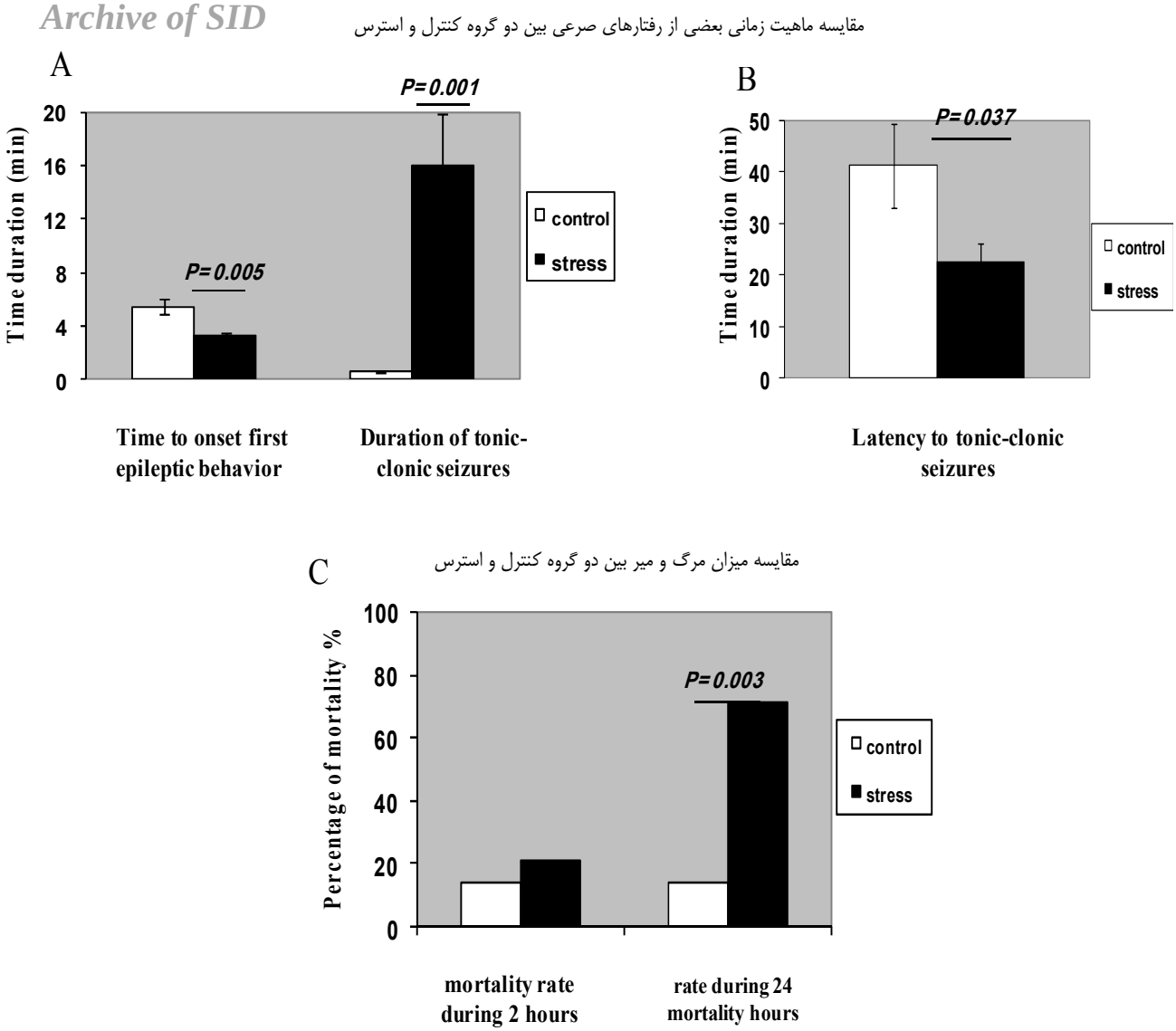
مدت زمان لازم تا تشنج حداکثر در حیوانات گروه کنترل ۸/۱± ۴۱/۲۵ دقیقه بود که میانگین این زمان در گروه تحت استرس به ۳/۷±۲۲/۴ کاهش یافت و بررسی آماری اختلاف معنی داری را بین دو گروه نشان داد (P=0.037 ، شکل ۱-A).

در حملات موضعی، علی رغم افزایشی که در تعداد و در طول مدت حملات بین دو گروه مشاهده شد (جدول ۱)، بررسی آماری اختلاف معنی داری را در هیچکدام از این دو پارامتر نشان نداد. در حملات تونیک کلونیک نیز، اختلاف معنی داری در تعداد دفعات این حملات بین دو گروه دیده نشد، اما میانگین طول مدت زمان حملات تونیک کلونیک در گروه کنترل از ۰/۱±۰/۵۳ دقیقه به ۳/۸± ۱۶ دقیقه در گروه استرس افزایش یافت که حاکی از یک اختلاف بارز و معنی دار بین دو گروه بود (P=0.001 ، شکل ۱- A).

در بررسی شاخص مهم میزان مرگ و میر، در طول ۲ ساعت اول پس از تزریق پیلوکارپین در گروه کنترل ۲ مورد از ۱۴ مورد دچار مرگ شدند که معادل ۱۴/۳ درصد حیوانات بود. در گروه استرس، ۳ مورد از کل ۱۴ مورد حیوان معادل ۲۱/۴۲ درصد دچار مرگ و میر در این مدت زمان شدند که البته این اختلاف ذکر شده بین دو گروه از نظر آماری معنی دار نبود (شکل ۱- C، P=0.5، Fisher exact test). علی رغم عدم وجود اختلاف معنی دار، مقایسه خطر نسبی (risk relative) RR=1.63 نشانگر آن است که استرس شکارچی خطر مرگ را ۱/۶۳ برابر افزایش داده است (حدود اطمینان ۹۵٪، ۱۱/۷- ۰/۲۳). اما در طول مدت ۲۴ ساعت پس از تزریق پیلوکارپین، هیچکدام از حیوانات باقیمانده گروه کنترل از بین نرفتند و این در حالی بود که ۷ راس از ۱۱ حیوان باقیمانده از گروه استرس، در مجموع ۱۰ از کل ۱۴ حیوان معادل ۷۱/۴٪ ، در این مدت دچار مرگ شدند که حکایت از یک اختلاف معنی دار بین دو گروه کنترل و استرس داشت (شکل ۱- C، P=0.003 ,test Fisher exact). مقایسه خطر نسبی RR=۱۵ گویای آن است

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- مقایسه ماهیت رفتارهای صرعی بین دو گروه کنترل و استرس بعد از تزریق زیرجلدی ۱۵۰ میلی گرم پیلوکارپین. مدت زمان نهفته تا شروع اولین رفتار صرعی (A) و همچنین طول مدت زمان لازم تا به حداکثر رسیدن حملات (B) در گروه استرس نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت. همچنین طول مدت حملات تونیک کلونیک در گروه استرس به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود (الف). مقایسه میزان مرگ و میر در طول دو و ۲۴ ساعت پایش بین دو گروه (C)، نشان دهنده افزایش بارز درصد مرگ و میر در گروه استرس نسبت به گروه کنترل می باشد(Fisher exact test, p= 0.003) .

که استرس شکارچی خطر مرگ را در ۲۴ ساعت بعد از تزریق پیلوکارپین ۱۵ برابر افزایش داده است.

در بررسی و مقایسه انجام شده بر روی میانگین غلظت خونی هورمون کرتیکوسترون در دوران بارداری و بعد از زایمان در مادر و نوزادان (دو روزه و شش روزه)، تغییرات معنی داری بین موشهای گروه کنترل و استرس مشاهده شد که نتایج حاصله در جدول ۲ ارائه شده است. این نتایج و آنالیز آماری آنها نشان داد که استرس دوران بارداری میزان هورمون کرتیکوسترون در دوره قبل و بعد از زایمان در موشهای صحرایی مادر را افزایش می دهد.

طبق این نتایج، میانگین غلظت هورمون کرتیکوسترون (ng/ml) در روز ۱۸ بارداری در گروه کنترل ۴/۱۸±۰/۵۴ و در گروه استرس ۱۳/۴۷±۱/۶۴ بود که یک افزایش حدوداً ۳/۲۲ برابری را نشان داد ($p<0.001$). همچنین یک اختلاف معنی دار بین میانگین غلظت هورمون کرتیکوسترون در روز دوم و ششم پس از زایمان در موشهای صحرایی مادر گروه استرس نسبت به گروه کنترل وجود داشت ($p<0.001$، جدول ۲). به همین ترتیب غلظت هورمون کرتیکوسترون در نوزادان دو روزه

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- نتایج سنجش و مقایسه سطح خونی کرتیکوسترون به روش رادیوایمیونواسی در موشهای صحرایی مادر و نوزادان دو گروه کنترل و استرس.

Experiment stage	group	mean±SEM	ANOVA test
E18	Control dams	4.18 ± 0.54	P< 0.001 For all groups
	Stressed dams	13.47 ± 1.64	
P2	Control dams	3.55 ± 0.47	
	Stressed dams	9.6 ± 0.77	
	Control pups	0.2 ± 0.59	
	Stressed pups	5.05 ± 0.13	
P6	Control dams	1.26 ± 0.2	
	Stressed dams	7.72 ± 0.63	
	Control pups	0.68 ± 0.32	
	Stressed pups	3.08 ± 0.11	

میانگین غلظت هورمون کرتیکواسترون در دوره بارداری در مادر، و بعد بارداری در مادر و نوزادان. روز ۱۸ بارداری(E18)، روز دوم پس از زایمان(P2)، روز ششم پس از زایمان (P6). همانطور که در جدول مشهود است استرس دوران بارداری میزان هورمون COS را در دوره قبل و بعد از زایمان در مادر و در دوره های مختلف نوزادی نسبت به گروه کنترل افزایش داده است.

و شش روزه گروه استرس نسبت به گروه کنترل مقایسه شد که نتایج آماری بار دیگر افزایش معنی داری را در گروه استرس نشان داد ($p<0.001$). نتایج حاصل از این بررسی ها در جدول ۲ خلاصه شده است.

بحث

در این مطالعه موشهای صحرایی حامله تحت استرس شکارچی قرار گرفتند. پس از زایمان به فرزندان ۲۵ روزه آنها پیلوکارپین تزریق شد و رفتارهای صرعی ایجاد شده مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین سطح خونی COS در مادران و نوزادان اندازه گیری شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استرس شکارچی دوران بارداری در موش های صحرایی می تواند رفتارهای صرعی ناشی از تزریق پیلوکارپین را در فرزندان آنها تشدید نماید که این یافته با یک افزایش قابل توجه و معنی دار در غلظت پلاسمائی کرتیکوسترون همراه است. پیلوکارپین، به عنوان آگونیست غیر اختصاصی گیرنده های کولینرژیک موسکارینی با ایجاد بیش تحریکی در نرونهای هیپوکامپ و کورتکس مغز بطور وسیعی در مطالعات صرعی مدلهای آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفته است [۳۴]. مشخصات رفتارهای صرعی ناشی از پیلوکاربین روی موشهای بالغ به تفصیل در مطالعه ای که توسط Lian Wang و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام یافته، توضیح داده شده است. در مطالعه یاد شده، مدت زمان لازم تا شروع رفتارهای صرعی اولیه نظیر حرکات تکرار شونده سر، روی دو پا ایستادن و افتادن، ۲۰ دقیقه بعد از تزریق گزارش شده است که با زمان برآورد شده در مطالعه ما مطابقت دارد. همچنین در این مطالعه مدت زمان به حداکثر رسیدن علائم یا بروز حملات تونیک کلونیک با میانگین ۳۵ دقیقه برآورد شده است که مجددا مشابه زمان مربوطه در مطالعه ما یعنی ۴۱ دقیقه می باشد. اختلافات جزئی موجود به علت تفاوت در نوع، گونه و سن حیوانات تحت آزمایش در دو مطالعه قابل توجیه است [۳۷].

Samland و همکاران (۲۰۰۳) در تحقیق مشابهی گزارش کرده اند که تزریق mg/kg ۲۰۰ پیلوکاربین در موشهای ۶۰ روزه علائم صرعی متوسط شامل حرکات تکرار شونده و تکانهای سر بدون بروز حملات تونیک کلونیک و مرگ و میر نشان میدهد. هرچند که دوز مصرفی پیلوکاربین در این تحقیق کمی بیشتر از دوز مصرفی مطالعه ما بوده است اما تفاوت در نوع و سن حیوان تحت آزمایش و شرایط آزمایشگاهی می تواند این تفاوتها را توجیه نماید [۳۴].

www.SID.ir

Archive of SID

اصلی ترین یافته این تحقیق، تشدید رفتارهای صرعی در موشهای گروه استرس در مقایسه با گروه کنترل است. در مطالعات مختلف از جمله مطالعات رفتاری از مدلهای آزمایشگاهی متنوعی برای ایجاد استرس و بررسی تاثیر آن روی حیوانات آزمایشگاهی استفاده شده است که در این خصوص می توان به استرس بی حرکتی [۶, ۱۶]، استرس شنای اجباری [۱۸, ۲۱] و جدایی از مادر [۱۹] اشاره کرد. استرس شکارچی به دلیل سادگی، اعتبار بالا و روایی زیاد آن مورد استفاده دانشمندان در مطالعات الکتروفیزیولوژی، سلولی-مولکولی و رفتاری قرار گرفته است. در مطالعه حاضر رفتارهای صرعی توله های هر دو گروه (کنترل و استرس) بدنبال تزریق پیلوکارپین از نظر زمان نهفته تا شروع اولین رفتار، تعداد، فرکانس و طول مدت هر رفتار و مرگ و میر مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است. در اکثر رفتارهای مورد مطالعه، طول مدت هر رفتار و دفعات تکرار آن در گروه استرس نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. از طرف دیگر، طول مدت زمان نهفته تا بروز رفتارها و طول مدت به حداکثر رسیدن علائم در گروه تحت استرس در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است که این یافته ها همگی بیانگر تشدید رفتارهای صرعی و بروز سریع تر آنها در گروه تحت استرس می باشند. در تایید این ادعا، شاخص مرگ و میر به عنوان وخیم ترین نتیجه رفتارهای صرعی در گروه استرس به شکل چشمگیری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است که حکایت از یک پیش آگهی بد، ناشی از تاثیر استرس بر صرع دارد.

در مدلهای مختلف صرع تجربی انواع مختلف استرسها می توانند میزان پاسخدهی حیوان به داروهای ضد صرعی را تحت تاثیر قرار دهد [۲۵, ۳۲]. در تایید این گزارشات آمده است که قرار گرفتن در معرض انواع مختلف استرسورهای حاد مثل محرکهای دردناک آستانه ایجاد تشنجهای القایی در موشهای صحرایی تیمار شده با لیتیوم-پیلوکارپین را پائین می آورد [۲۶]. قرار گرفتن در معرض شرایط پر استرس می تواند به تغییرات عمیق در خصوصیات الکتریکی نرونها منجر شود که به نوبه خود می تواند باعث افزایش حساسیت نرونی برای القاء فعالیتهای صرعی و تغییر آسیب پذیری نرونهای هیپوکامپ در بسیاری از شرایط نروپاتولوژیک باشد [۱۲, ۱۳]. بر خلاف مطالعات ذکر شده بالا که متمرکز به بررسی تاثیر استرس روی صرع در حیوانات تحت استرس بودند، در مطالعه حاضر تاثیر استرس غیر مستقیم دوران بارداری در پارامترهای رفتار های صرعی نوزادان آنها مد نظر قرار گرفته که در نوع خود مطالعه بدیع و منحصر به فردی است. گزارشات قبلی نشان داده اند که استرس دوران بارداری می تواند به عنوان یک فاکتور بالقوه در ایجاد یا مستعد کردن شرایط برای بعضی از بیماریهای نرولوژیک مطرح باشد [۲۸, ۲۹, ۳۰]. اثر طولانی مدت استرس میتواند به تغییر فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال مربوط باشد [۳۶, ۳۸] یا باعث تغییر در تکامل مغزی شود که منجر به ارتباطات نرونی غیرمعمول شده و اختلال عملکردی پایدار مغزی را ایجاد نماید [۲۹]. در تایید این احتمالات مطرح شده، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استرس دوران بارداری آستانه بروز رفتارهای صرعی در فرزندان متولد شده از مادران تحت استرس را پایین می آورد، آنها را تحریک پذیرتر می نماید، رفتارهای صرعی آنها را تشدید میکند و بالاخره میزان مرگ ومیر آنها را قویا افزایش می دهد.

طبق مطالعات قبلی، قرار گرفتن موشها در مقابل گربه دفاع فوری را در آنها القا می کند [۵]. از آنجا که گربه ها شکارچی های بالقوه برای موشها هستند این چنین قرارگیری در معرض گربه ممکن است یک تحریک تهدید آمیز را تداعی نماید، بنابراین از این استرسور در مدل حیوانی به عنوان اختلال استرس پس ار سانحه (PTSD)[1] یاد شده است [۲, ۵, ۳۵]. در مطالعه حاضر، موشهای که در معرض استرس شکارچی قرار داشتند، طیف وسیعی از واکنشهای مختلف از بی حرکتی کامل گرفته تا نمایش واکنشهای دفاعی، پناه بردن به دورترین ناحیه از قفس و بی قراری شدید را نشان دادند (نتایج ارائه نشده است) که در تایید مطالعات دیگر می باشد. نشان داده شده است که مواجهه موش صحرایی تنها با پارچه تلقیح شده با بوی خز گربه، هم واکنش فوری به حضور رایحه را القاء می کند و هم باعث افزایش بی حرکتی، کاهش کلی فعالیت و ترس طولانی مدت می شود [۱۴, ۲۲].

همچنین مطالعات آزمایشگاهی گذشته نشان داده اند که قرار گرفتن در معرض بوی گربه باعث افزایش میزان سطح

1. Post traumatic stress disorder

www.SID.ir

Archive of SID

خونی کرتیکوسترون پلاسما در موشها شده است. بر اساس این مطالعات یکی از مهمترین مسیرهای اجرای اثرات استرس می تواند مربوط به محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال باشد [۱۳, ۲۶] که یا منجر به تغییرات پلاستیسیتی نرونی در هر کدام از هسته های موجود در این محور می شود [۴, ۲۳] و یا تماس طولانی مدت تر با استرسها می تواند باعث تغیرات پاتولوژیک در مدارهای نرونی مربوطه و نهایتا فعالیت شدید و طولانی مدت این محور گردد. نتایج حاصل از این مطالعه یک افزایش معنی دار در غلظت هورمون کرتیکوسترون بدنبال استرس شکارچی در دوران بارداری را در مادران و نوزادان نسبت به گروه بدون استرس نشان داد که با شواهد ذکر شده در بالا مطابقت دارد. با در نظر گرفتن مجموع این اطلاعات می توان نتیجه گیری کرد که استرس شکارچی در موشهای مادر باردار می تواند فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال را تحت تاثیر قرار دهد [۳۶, ۳۸] که علاوه بر اینکه منجر به فعالیت شدید و طولانی مدت این محور گردد بلکه فعالیت این محور را در نوزادان آنها به طور مستقیم یا غیر مستقیم تحت تاثیر قرار دهد. انحراف فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال در چندین حالت بالینی شدید از جمله صرع گزارش شده است [۳, ۱۲ ,۱۳, ۲۰, ۳۹]. لازم به ذکر است که در مطالعه اثر استرس بر تشنج جنیست حیوان یک عامل تعیین کننده است و مطالعات بیانگر حساستر بودن جنس نر در مقایسه با جنس ماده در برابر استرس می باشد [۱۵, ۲۷, ۳۳]. در مطالعه حاضر به دلیل محدودیتهای موجود عامل جنسیت لحاظ نشد ولی بطور یقین این محدودیت باعث مخدوش شدن داده ها نشده است.

مطالعات مقایسه ای دقیق با استفاده از تیمیدین اتورادیوگرافی، نشان داده که تکامل ساختمانهای مغزی در رتها، بویژه در مراحل اولیه جنینی، مشابه انسان است [۳۸]. اگر این چنین باشد، با شاهد گرفتن نتایج تحقیق حاضر و تحقیقات مشابه احتمال دارد استرسهای دوران بارداری در انسانها نیز بتواند در پاتولوژی بیماریهای نورولوژیک از جمله بروز رفتارهای صرعی در فرزندان آنها دخالت داشته باشد. بدیهی است از یک سو تعمیم اثرات دیده شده در این مطالعه به دوران بارداری در انسان و از سوی دیگر کشف جزئیات مدارهای نورونی مسئول در این پروسه و یا سایر مکانیسمهای احتمالی درگیر که بتواند ارتباط استرس بارداری و صرع را توجیه نماید، تحقیقات بیشتری را در این زمینه می طلبد. از آنجائیکه صرع به خاطر ماهیت غیر قابل پیش بینی و مخربش یک بیماری جدی و تهدید کننده حیات بشمار میرود تمام تدابیر پیش گیری کننده یا تخفیف دهنده علائم آن می تواند مهم و مفید باشد و تحقیق حاضر می تواند رهگشا و پایه ای برای مطالعات آینده برای نیل به این هدف باشد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه بخاطر حمایت از این مطالعه تقدیر و تشکر می شود.

References

[1] Abd Ellatif F, and El Garawany H. Risk factors of febrile seizures among preschool children in Alexandria. ***J Egypt Public Health Assoc*** 77(2002) 159-172.

[2] Adamec RE, Blundell J, and Burton P. Relationship of the predatory attack experience to neural plasticity, pCREB expression and neuroendocrine response. ***Neurosci Biobehav Rev*** 30(2006) 356-375.

[3] Andre VM, Flores-Hernandez J, Cepeda C, Starling AJ, Nguyen S, Lobo MK, Vinters HV, Levine MS, and Mathern GW. NMDA receptor alterations in neurons from pediatric cortical dysplasia tissue. ***Cereb Cortex*** 14(2004) 634-646.

[4] Bocti C, Robitaille Y, Diadori P, Lortie A, Mercier C, Bouthillier A, and Carmant L. The pathological basis of temporal lobe epilepsy in childhood. ***Neurology*** 60(2003) 191-195.

[5] Carvalho-Netto EF, Martinez RC, Baldo MV, and Canteras NS. Evidence for the thalamic targets of the medial hypothalamic defensive system mediating emotional memory to predatory threats. ***Neurobiol Learn Mem*** 93(2010) 479-486.

[6] Chadda R, and Devaud LL. Differential effects of mild repeated restraint stress on behaviors and GABAA receptors in male and female rats. ***Pharmacology,***

www.SID.ir

Archive of SID

Biochemistry and Behavior 81 (2005) 854 – 863.

[7] Chang BS, and Lowenstein DH. Epilepsy. ***N Engl J Med*** 349(2003) 1257-1266.

[8] Christensen J, Li J, Vestergaard M, and Olsen J. Stress and epilepsy: a population-based cohort study of epilepsy in parents who lost a child. ***Epilepsy Behav*** 11(2007) 324-328.

[9] Fathollahi Y, Motamedi F, Semnanian S, and Zardoshti M. Repeated administration of pentylenetetrazol alters susceptibility of rat hippocampus to primed-burst stimulation: evidence from in vitro study on CA1 of hippocampal slices. ***Brain Res*** 738(1996) 138-141.

[10] Feddersen B, Vercueil L, Noachtar S, David O, Depaulis A, and Deransart C. Controlling seizures is not controlling epilepsy: A parametric study of deep brain stimulation for epilepsy. ***Neurobiol Dis*** 2007).

[11] Galic M, Fournier N, and Martin L. Alpha2-adrenergic inhibition prevents the accompanied anticonvulsant effect of swim stress on behavioral convulsions induced by lithium and pilocarpine. ***Pharmacol Biochem Behav Brain Res*** 279(2004) 309–316.

[12] Galic MA. Elevated nociceptive thresholds in rats with multifocal brain damage induced with single subcutaneous injections of lithium and pilocarpine. ***Percept Mot Skills*** 98(2004) 825-826.

[13] Galic MA, Fournier NM, and Martin LJ. Alpha2-adrenergic inhibition prevents the accompanied anticonvulsant effect of swim stress on behavioral convulsions induced by lithium and pilocarpine. ***Pharmacol Biochem Behav*** 79(2004) 309-316.

[14] Grant I. The social environment and neurological disease. ***Adv Psychosom Med*** 13(1985) 26-48.

[15] Guedes RC, de Oliveira JA, Amancio-Dos-Santos A, and Garcia-Cairasco N. Sexual differentiation of cortical spreading depression propagation after acute and kindled audiogenic seizures in the Wistar audiogenic rat (WAR). ***Epilepsy Res*** 83(2009) 207-214.

[16] Heshmatian B, Roshan-Milani S, and Saboory E. Prenatal acute stress attenuated epileptiform activities in neonate mice. ***Yakhteh medical journal*** 12(2010).

[17] Iancu I, Rosen Y, and Moshe K. Antiepileptic drugs in posttraumatic stress disorder. ***Clin Neuropharmacol*** 25(2002) 225-229.

[18] Koh S, Magid R, Chung H, Stine CD, and Wilson DN. Depressive behavior and selective downregulation of serotonin receptor expression after early-life seizures: Reversal by environmental enrichment. ***Epilepsy Behav*** 10(2007) 26-31.

[19] Lai MC, Holmes GL, Lee KH, Yang SN, Wang CA, Wu CL, Tiao MM, Hsieh CS, Lee CH, and Huang LT. Effect of neonatal isolation on outcome following neonatal seizures in rats--the role of corticosterone. ***Epilepsy Res*** 68(2006) 123-136.

[20] Lee MC, Shim JJ, Kim JH, Kim MK, Woo YJ, Chung WK, Suh JJ, Nam SC, Lee JS, Kim YS, Kim JH, and Kim HI. Upregulation of glutamate receptors in rat cerebral cortex with neuronal migration disorders. ***J Korean Med Sci*** 19(2004) 419-425.

[21] Mazarati A, Shin D, Auvin S, Caplan R, and Sankar R. Kindling epileptogenesis in immature rats leads to persistent depressive behavior. ***Epilepsy Behav*** 10(2007) 377-383.

[22] Merali Z, Kent P, Michaud D, McIntyre D, and Anisman H. Differential impact of predator or immobilization stressors on central corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides in Fast and Slow seizing rat. ***Brain Res*** 906(2001) 60-73.

[23] Mercier S, Frédéric, Canini, Buguet A, Cespuglio R, Martin S, and Bourdon L. Behavioural changes after an acute stress: stressor and test types influences. ***Behav Brain Res*** 139(2003) 167-175.

[24] Morimoto K, Fahnestock M, and Racine RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. ***Prog Neurobiol*** 73(2004) 1-60.

[25] Onozuka M, Imai S, and Ozono S. The 70-kDa epileptic cortical protein elicits bursting activity accompanied by a reduction of outward current in Euhadra neurons which is inhibited by an antibody against this protein. ***Brain Res*** 531(1990) 276-279.

[26] Persinger MA, Stewart LS, Richards PM, Harrigan T, O'Connor RP, and Bureau YR. Seizure onset times for rats receiving systemic lithium and pilocarpine: sources of variability. ***Pharmacol Biochem Behav*** 71(2002) 7-17.

[27] Peternel S, Pilipovic K, and Zupan G. Seizure susceptibility and the brain regional sensitivity to oxidative stress in male and female rats in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. ***Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*** 33(2009) 456-462.

www.SID.ir

Archive of SID

[28] Puskarich CA, Whitman S, Dell J, Hughes JR, Rosen AJ, and Hermann BP. Controlled examination of effects of progressive relaxation training on seizure reduction. ***Epilepsia*** 33(1992) 675-680.

[29] Rangon C, Fortes S, Lelièvre V, Leroux P, Plaisant F, Joubert C, Lanfumey L, Cohen-Salmon C, and Gressens P. Chronic mild stress during gestation worsens neonatal brain lesions in mice. ***J Neurosci*** 27(2007) 7532-7540.

[30] Reddy DS. The clinical potentials of endogenous neurosteroids. ***Drugs Today (Barc)*** 38(2002) 465-485.

[31] Reddy DS, and Rogawski MA. Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA(A) receptor function and seizure susceptibility. ***J Neurosci*** 22(2002) 3795-3805.

[32] Rutecki PA, Lebeda FJ, and Johnston D. Epileptiform activity in the hippocampus produced by tetraethylammonium. ***J Neurophysiol*** 64(1990) 1077-1088.

[33] Sadaghiani MM, and Saboory E. Prenatal stress potentiates pilocarpine-induced epileptic behaviors in infant rats both time and sex dependently. ***Epilepsy Behav*** 18(2010) 166-170.

[34] Samland H, Huitron-Resendiz S, Masliah E, Criado J, Henriksen SJ, and Campbell IL. Profound increase in sensitivity to glutamatergic- but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6. ***J Neurosci Res*** 73(2003) 176-187.

[35] Smith SD, Abou-Khalil B, and Zald DH. Posttraumatic stress disorder in a patient with no left amygdala. ***J Abnorm Psychol*** 117(2008) 479-484.

[36] Van den Bergh BR, Mulder EJ, Mennes M, and Glover V. Antenatal maternal anxiety and stress and the neurobehavioural development of the fetus and child: links and possible mechanisms. A review. ***Neurosci Biobehav Rev*** 29(2005) 237-258.

[37] Wang L, Liu YH, Huang YG, and Chen LW. Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining. ***Brain Res*** 1241(2008) 157-167.

[38] Weinstock m. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring ***Progress in Neurobiology*** 65 (2001) 427–451.

[39] Wenzel HJ, Patel LS, Robbins CA, Emmi A, Yeung RS, and Schwartzkroin PA. Morphology of cerebral lesions in the Eker rat model of tuberous sclerosis. ***Acta Neuropathol (Berl)*** 108(2004) 97-108.

[40] Wiener P. Neuroactive steroids, relaxation, and seizure control. ***Int J Neurosci*** 113(2003) 631-639.

www.SID.ir