

مقاله پژوهشی

اثر پروژسترون بر تشنج های حاد ناشی از مدل لیتيوم- پیلوکارپین در موش ماده اواریکتومی شده: بررسی رفتاری، بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز

عفت باران، محموداله دادی سلمانی*، ایران گودرزی، تقی لشکرلوکی

دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

پذیرش: ۱۶ آذر ۱۳۹۸

دریافت: ۲۷ مهر ۱۳۹۸

چکیده

زمینه و هدف: تشنج های صرعی دوره ماهیانه، عمدتاً به دنبال کاهش سطح پروژسترون اتفاق می افتد. از طرفی، آستروسیت ها بر تحریک پذیری مغزی اثرگذارند. لذا، اثرات محافظتی پروژسترون بر رفتار تشنجی، میزان گلوتامات و گابا و دخالت آستروسیت ها (فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز) بررسی شده است.

روش ها: موش های ماده صحرایی ویستار (۱۲۰ سر) در این مطالعه تجربی در شش گروه آزمایشی شامل کنترل سالم، کنترل اوارکتومی، پیلوکارپین، سه گروه درمانی پروژسترون (دوزهای ۰/۲، ۲ و ۲۰ میلی گرم/کیلوگرم) قرار گرفتند. مدل لیتيوم- پیلوکارپین برای القای تشنج استفاده شد و رفتار حیوانات به مدت یک ساعت ارزیابی گردید. پروژسترون، به صورت روزانه طی پنج روز برای درمان تشنج تزریق گردید. در گروهی از حیوانات پس از ۵ روز و در گروهی دیگر پس از ۳۰ روز، مغز خارج شد و سپس محتوی کلی گلوتامات و گابای هیپوکامپ، و فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز اندازه گیری شد.

یافته ها: زمان نهفته تشنج، فقط در گروه پروژسترون با دوز بالا، ۱۸۴٪ کاهش و مدت زمان تشنج در گروه های دوز پایین، متوسط و بالای پروژسترون (۱۰۵، ۵۹ و ۲۶۵٪) کاهش یافت. در گروه های ۵ روزه، میزان فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز، در گروه تیمار با دوز بالا کاهش (۱۶۴٪) نشان داد. در گروه های ۳۰ روزه، محتوی گابای گروه پیلوکارپین، افزایش (۱۷۶٪) و محتوی گابا در گروه های دوز پایین، متوسط و بالای پروژسترون (۱۰۶، ۷۰ و ۶۴٪) کاهش نشان دادند.

نتیجه گیری: تجویز پروژسترون خواص ضد تشنجی وابسته به غلظت دارد و همزمان میزان گلوتامات و گابا و فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز آستروسیتی را تغییر می دهد.

واژه های کلیدی: پروژسترون، صرع، گلوتامات و گابا، گلوتامین سنتتاز، هیپوکامپ

مقدمه

در شرایط طبیعی، بین گلوتامات و گابا، یعنی بین تحریک و مهار در مغز تعادل وجود دارد. برهم خوردن این تعادل، می تواند سبب تحریک پذیری بیش از حد و تشنج گردد [۴]. در واقع سیستم گلوتاماترژیک در مکانیسم های درگیر در شروع و گسترش حملات صرعی نقش کلیدی را بازی می کند. رهايش بیش از حد گلوتامات، نقش مهمی در صرع زایی و آسیب مغزی به صورت رهاشدن گلوتامات از سیناپس و اثر بر گیرنده های متابوتروپیک و یونوتروپیک دارد [۵].

آستروسیت ها از طریق ارتباط با پوشش عروقی یا ارتباط

صرع اختلال عصبی است که حدود یک درصد جمعیت جهان را در بر می گیرد [۱]. بیماران صرعی، افزایش زیادی در سطوح گلوتامات خارج سلولی نشان می دهند [۲]. غلظت های نوروتوکسیک گلوتامات در هیپوکامپ قبل حمله، آغاز حمله، در طول تشنج و ادامه آن گزارش شده است و باعث تحریک پذیری شدید می گردد. این تحریک پذیری ممکن است مربوط به کاهش جریان رو به داخل گلوتامات گلیایی و فعالیت گلوتامین سنتتاز^۱ باشد [۳].

¹ Glutamine synthetase (GS)

معنی‌داری به دنبال تکرار (عود) تشنج‌ها افزایش داد. این نتایج حاکی از این است که ناقل گلوتامات ۲ و ناقل گابا ۱ درگیر در پاتولوژی صرع بوده و تحت تاثیر پروژسترون قرار می‌گیرند [۱۴].

بنابراین به نظر می‌رسد که پروژسترون از طریق نورون‌های مهارى و نیز آستروسیت‌ها در جذب و تعدیل گلوتامات آزاد و حذف سریع از طریق اتصالات شکافدار نقش به‌سزایی داشته باشد. حضور پروژسترون از طریق اثر بر مسیرهای گلوتاماتی و کنترل بیان ژن در آستروسیت‌ها و همچنین اثر بر فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز و در نتیجه کاهش تشنج و تحریک‌پذیری بسیار مهم است. بر این اساس هدف این مطالعه بررسی نقش ضدتشنجی پروژسترون در مدل لیتیم-پیلوکارپین و بررسی تغییرات میزان گلوتامات و گابای هیپوکامپی و نقش احتمالی آستروسیت‌ها از طریق سنجش فعالیت گلوتامین سنتتاز است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه ۱۲۰ سر موش صحرایی ماده باکره نژاد ویستار^۷ با وزن تقریبی ۱۸۰-۲۴۰ گرم به تعداد ۴ سر در هر قفس مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات در شرایط مناسب ۱۲ ساعت روشنائی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای °C ۲۵-۲۰ نگهداری شده و دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. کلیه آزمایش‌ها و کار با حیوانات این تحقیق بر اساس قوانین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه دامغان انجام شده است.

داروها

داروی پیلوکارپین (P6503، شرکت سیگما)^۸ با دوز ۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، از طریق صفاقی^۹ تجویز شد. داروی پروژسترون از بازار داخلی (شرکت داروسازی ابوریحان) تهیه گردید و با سه دوز ۰/۲، ۲ و ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم تجویز گردید. داروی لیتیم کلراید (۳ میلی‌اکی‌والان/کیلوگرم، شرکت سیگما) در آب مقطر حل و به صورت داخل صفاقی تزریق

ساختاری با هزاران سیناپس، فعالیت نورونی را از طریق بازجذب یا آزادسازی نوروترنسمیترها تنظیم می‌کنند و نقش کلیدی در فعالیت‌های مغز، برای مثال، یادگیری و حافظه، کنترل خواب و تنفس بازی می‌کنند [۶]. آستروسیت‌ها مسئول جذب و تبدیل گلوتامات آزاد در طول فعالیت سیناپسی هستند که با استفاده از انتقال‌دهنده‌های گلوتاماتی در غشای آستروسیت‌ها انجام می‌شود. سپس گلوتامات با کمک آنزیم گلوتامین سنتتاز به گلوتامین تبدیل می‌شود. این آنزیم منحصراً در آستروسیت‌ها بیان می‌شود. ازطرفی، اختلال در واسطه‌های متابولیسمی گلوتامات در آستروسیت، می‌تواند منجر به تشنج شود. برای مثال، یک کاهش در سنتز گلوتامین در صرع ژنتیکی با اسکروز هیپوکامپی در بیماران با صرع لوب گیجگاهی^۲ مشاهده شده است [۶].

احتمال وقوع صرع و تشنج در زنان کمتر است. این تفاوت معمولاً به این دلیل است که مردان بیشتر از زنان در معرض آسیب برای ایجاد صرع و تشنج‌های حاد قرار می‌گیرند. همچنین، وقوع مرگ‌ومیر، Status Epilepticus و مرگ ناگهانی غیرمنتظره در مردان دارای صرع بیشتر است [۷]. این وضعیت شاید به علت تاثیر یا تغییرات سطوح هورمون‌های جنسی زنانه روی تشنج‌ها و صرع و همچنین تغییرات در سیستم اندوکروینی باشد [۸]. البته، تغییر فعالیت‌های طبیعی عصبی نیز می‌تواند در تنظیم و ترشح هورمون‌ها تاثیر بگذارد [۹]. پس هورمون‌ها می‌توانند در آستانه تشنج، نوسانات و شدت تشنج تغییر ایجاد کنند و صرع و داروهای ضدصرع نیز به نوبه خود بر هورمون‌های تولیدمثلی و عملکرد جنسی در زنان و مردان تاثیرگذار خواهند بود [۱۰]. پروژسترون یکی از هورمون‌های جنسی زنانه دارای اثری مهارى بر تشنج است [۱۱]. در مدل‌های حیوانی ماده بالغ، پروژسترون باعث مهار شلیک نورونی، کاهش تشنج خودبه‌خودی و باعث مهار تخلیه صرعی^۳ می‌شود و وقوع تشنج را کاهش می‌دهد [۱۲]. از طرفی، کاهش یا فقدان پروژسترون طی دوره ماهیانه (صرع قاعدگی)^۴ باعث تشدید تشنجات در زنان دارای بیماری صرع می‌شود [۱۳]. در مطالعه‌ای، تزریق عضلانی پروژسترون، سطوح بیان ناقل گلوتامات^۵ و ناقل گابا^۱ را به طور

^۶ GAT1

^۷ Wistar

^۸ Sigma-Aldrich

^۹ Intraperitoneal

^۲ mTLE

^۳ Epileptic Discharge

^۴ Catamenial Epilepsy

^۵ EAAT2

(روز صفر قبل جراحی)، قبل از تزریق دارو با بی‌حسی موضعی (۷ روز بعد جراحی) و قبل از استخراج مغز حیوان (۳۷ روز بعد جراحی) انجام شد. دو مرحله اول از ورید سافنوس^{۱۱} و مرحله سوم مستقیماً از قلب خونگیری انجام می‌شد. در تمامی مراحل، خون مخلوط شده با سدیم سیترات سدیم، سانتریفیوژ گردید و سرم به دست آمده در فریزر نگهداری شد. برای سنجش میزان پروژسترون پلاسمایی، کیت پروژسترون Monobind (ELISA) مورد استفاده قرار گرفت.

روش ایجاد تشنج در حیوان

به منظور ایجاد الگوی پیلوکارپین در حیوانات، ابتدا داروی لیتیم کلرید (۳ میلی‌اکی‌والان/کیلوگرم) تزریق گردید. پس از گذشت ۱۸ ساعت، داروی پیلوکارپین (۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به حیوان تزریق شد. نیم ساعت قبل از تزریق داروی پیلوکارپین، داروی هیوسین (یک میلی‌گرم/کیلوگرم) به منظور کاهش عوارض جانبی محیطی پیلوکارپین، به حیوان تزریق و رفتار تشنجی حیوان به مدت یک ساعت ثبت گردید. پس از مشاهده تشنج و گذشت زمان یک ساعت، داروی دیازپام (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به منظور توقف تشنجه‌ها تجویز گردید.

مطالعه بیوشیمیایی

پس از خروج نمونه‌ها از فریزر، هموژن انجام شد. غلظت پروتئین درون هیپوکامپ به روش بردفورد^{۱۲} انجام شد و جذب نمونه‌های حاصل از هیپوکامپ در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. سنجش گلوتامات^{۱۳} بر اساس مصرف NADH در اثر آنزیم گلوتامات دهیدروژناز و خواندن جذب نوری در ۳۴۰ نانومتر انجام شد. سنجش گابا^{۱۴} بر اساس تولید یک ماده فلوئورسانس از واکنش گابا و نانهیدرین در pH قلیایی در حضور گلوتامات و خواندن جذب در ۳۴۰ نانومتر انجام شد. سنجش آنزیم گلوتامین سنتتاز (به عنوان شاخص فعالیت آستروسیت‌ها) نیز بر اساس تولید ماده گاما-گلوتامیل هیدروکسامیک اسید و خواندن در طول موج ۵۳۰ نانومتر به انجام رسید.

گردید. داروی هیوسین (یک میلی‌گرم/کیلوگرم، داخل صفاقی) و دیازپام (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، داخل صفاقی) از بازار داخلی (دیازپام از شرکت داروسازی کاسپین-تامین و هیوسین از شرکت داروسازی اکسیر) تهیه شد. داروهای کنامین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، داخل صفاقی، شرکت سیگما) و زایلین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، داخل صفاقی، شرکت سیگما) جهت انجام بیهوشی استفاده شدند.

روش انجام تحقیق

این تحقیق در شش گروه آزمایشی شامل کنترل سالم، کنترل اوارکتومی، پیلوکارپین، گروه‌های درمانی شامل پیلوکارپین دوز پایین (۰/۲ میلی‌گرم/کیلوگرم)، دوز متوسط (۲ میلی‌گرم/کیلوگرم) و دوز بالا (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) پروژسترون انجام شد. گروه کنترل سالم برای مقایسه نتایج بیوشیمیایی و گروه کنترل اوارکتومی برای مقایسه نتایج رفتاری است. در همه گروه‌ها (بجز کنترل سالم) ابتدا جراحی برداشتن تخمدان‌ها^{۱۵} تحت بیهوشی و در مرحله دی‌استروس انجام گردید. پس از یک هفته استراحت، تشنج با استفاده از مدل لیتیم-پیلوکارپین در حیوانات القا شد. تظاهرات رفتاری تشنج شامل زمان نهفته ۱ (از زمان تزریق پیلوکارپین تا ظهور اولین نشانه‌های تشنج؛ Latency 1)، زمان نهفته ۲ (از زمان بروز اولین نشانه‌های تشنج تا شروع تشنجات تونیک-کلونیک؛ Latency 2)، مدت تشنج (Duration) و میزان مرگ و میر (Mortality) مشاهده و ثبت گردید. در گروه‌های درمان با پروژسترون، از ۴۸ ساعت قبل از القای تشنج پیلوکارپینی تا ۴۸ ساعت بعد از آن، به صورت روزانه، پروژسترون به صورت زیرجلدی تجویز می‌گردید که مجموع پنج تزریق در پنج روز بود. این تزریق در روز القای تشنج، یک ساعت قبل از تجویز پیلوکارپین انجام می‌شد. هیپوکامپ حیوانات در دو زمان ۵ و ۳۰ روز پس از القای تشنج (بازه زمانی کوتاه‌مدت و طولانی‌مدت) برای بررسی تغییرات مولکولی شامل میزان گلوتامات، گابا و فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز، استخراج و تا زمان سنجش مولکولی در فریزر منهای ۷۰ °C نگهداری گردید (شکل ۱).

برای سنجش میزان پروژسترون پلاسمای خونگیری از حیوانات در سه مرحله شامل پس از بیهوشی جهت اوارکتومی

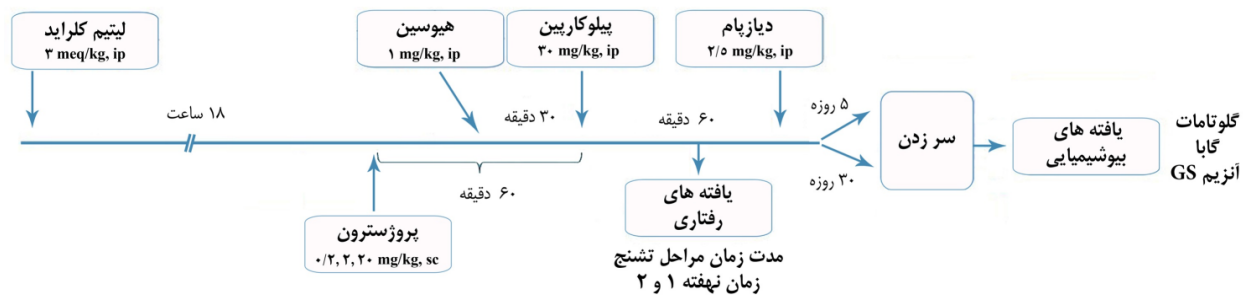
¹⁰ Ovariectomy (OVX)

¹¹ Saphenous

¹² Bradford

¹³ Glutamate

¹⁴ GABA



شکل ۱- مدل مفهومی فرآیند (زمانبندی) گروه های مورد مطالعه.

تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۵ صورت گرفت. برای مقایسه چند گروه با یک متغیر از آنالیز واریانس یک طرفه و برای مقایسه چند گروه با دو متغیر از آنالیز واریانس دوطرفه و به دنبال آن جهت مقایسه میانگین گروه ها، از آزمون توکی^{۱۵} استفاده شد. در همه محاسبات آماری، $p < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی داری در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار EXCEL رسم شدند.

یافته ها

کاهش پروژسترون پلاسمایی پس از جراحی نشان دهنده صحت انجام اوارکتومی است

آنالیز آماری به روش واریانس یک طرفه، تفاوت معنی داری در میزان پروژسترون در مراحل مختلف خونگیری در گروه های مورد مطالعه نشان داد ($F_{2,33} = 33.37$, $p = 0.0005$). آزمون تکمیلی نیز نشان داد که میزان پروژسترون در گروه های ۷ روز بعد از اوارکتومی ($n = 12$, $p < 0.001$) و ۳۷ روز بعد از اوارکتومی ($n = 12$, $p < 0.001$) نسبت به گروه قبل از اوارکتومی (Pre OVX) کاهش معنی داری یافته است.

تاثیر پروژسترون بر مدت زمان نهفته

مقایسه آماری اختلاف معنی داری در زمان نهفته ۱ مقایسه آماری اختلاف معنی داری در زمان نهفته ۲ ($F_{3,76} = 1/60$, $p = 0.19$) نشان نداد، ولی اختلاف معنی داری در زمان نهفته ۲ ($F_{3,73} = 11/431$, $p = 0.0005$) نشان داد. بررسی با آزمون توکی، بیانگر کاهش معنی داری در مدت زمان

¹⁵ Tukey

نهفته ۲ در گروه پیلوکارپین + دوز بالای پروژسترون ($n = 20$, $p < 0.01$) نسبت به گروه پیلوکارپین می باشد. این بدین معنی است که پروژسترون در دوز بالا توانسته باعث آغاز زودتر تشنج ها شود (نمودار ۱ الف).

بررسی تاثیر پروژسترون بر مدت زمان تشنجی

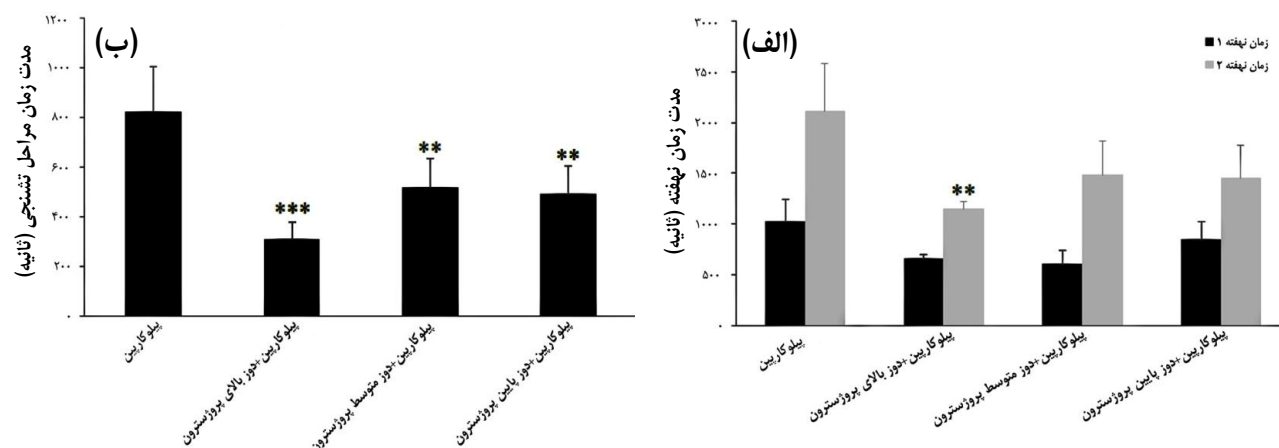
آنالیز آماری اختلاف معنی داری ($p = 0.0005$) در گروه ها نشان داد. بررسی با آزمون توکی، بیان کننده کاهش معنی داری در مدت زمان تشنج در گروه های پیلوکارپین + دوز بالای پروژسترون ($n = 20$, $p < 0.001$) و پیلوکارپین + دوز متوسط یا پایین پروژسترون ($n = 20$, $p < 0.01$) نسبت به گروه پیلوکارپین است (نمودار ۱ ب).

تاثیر پروژسترون بر میزان مرگ و میر و تعداد تشنجهای

تجویز پروژسترون توانست میزان مرگ و میر ناشی از تشنجهای ایجادشده را در گروه پیلوکارپین + دوز بالای پروژسترون به میزان ۳۱٪، در گروه پیلوکارپین + دوز متوسط پروژسترون به میزان ۲۸٪ و در گروه پیلوکارپین + دوز پایین پروژسترون به میزان ۲۲٪ کاهش دهد. همچنین تعداد تشنجهای را از ۴/۷ در گروه پیلوکارپین و بدنبال تجویز پروژسترون به ترتیب به ۴/۱۷، ۳/۶۶ و ۳/۲ در گروه های دوز بالا، متوسط و پایین کاهش داد (جدول ۱).

تاثیر پروژسترون بر گلوتامات هیپوکامپ

اختلاف معنی داری در محتوی گلوتامات هیپوکامپ در بین گروه های مورد مطالعه ۵ روزه ($F_{5,24} = 1/54$, $p = 0.21$) و ۳۰ روزه ($F_{5,24} = 0/13$, $p = 0.51$) مشاهده نشد (نمودار ۲).



نمودار ۱- اثر پروژسترون بر رفتارهای تشنجی. الف: مدت زمان نهفته ۲ در گروه پیلوکارپین + دوز بالای پروژسترون کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد. ب: مدت زمان تشنج‌ها در تمام دوزها نسبت به گروه پیلوکارپین، به طور معنی‌داری کاهش یافته است. $p < 0.01$ در مقایسه با گروه پیلوکارپین.

تاثیر پروژسترون بر فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز هیپوکامپ

آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری در گروه‌های مورد مطالعه ۳۰ روزه نشان نداد ($F_{5,24} = 0.864$, $p = 0.51$). اما تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز بین گروه‌های آزمایشی ۵ روزه مشاهده شد ($F_{5,24} = 4.524$, $p = 0.005$). آزمون توکی نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز در گروه پیلوکارپین + دوز بالای پروژسترون نسبت به گروه کنترل اوارکتومی ($p < 0.05$, $n = 5$) است (نمودار ۴).

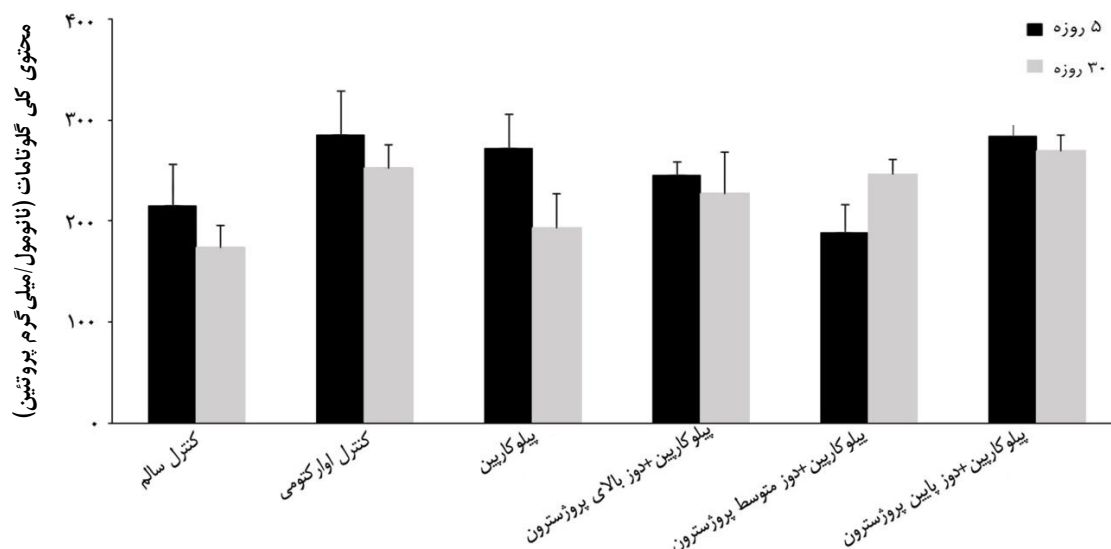
تاثیر پروژسترون بر محتوی گابای هیپوکامپ

اختلاف معنی‌داری در محتوی گابای هیپوکامپی بین گروه‌های مورد مطالعه، ۵ روز پس از القای صرع مشاهده نشد ($F_{5,24} = 0.057$, $p = 0.99$). درحالی‌که، محتوی گابای هیپوکامپ گروه‌های مورد مطالعه، ۳۰ روز پس از القای صرع پیلوکارپینی تفاوت معنی‌دار داشت ($p = 0.0005$). آزمون توکی نیز نشان داد که محتوی گابای هیپوکامپی در گروه پیلوکارپین ($n = 5$, $p < 0.01$) نسبت به گروه کنترل اوارکتومی افزایش معنی‌داری یافته است. همچنین این آزمون بیانگر کاهش معنی‌داری در گروه پیلوکارپین + دوز بالای پروژسترون ($n = 5$, $p < 0.01$)، گروه پیلوکارپین + دوز متوسط یا پایین پروژسترون ($n = 5$, $p < 0.001$) نسبت به گروه پیلوکارپین می‌باشد (نمودار ۳).

جدول ۱- میزان مرگ‌ومیر و تعداد تشنج در گروه‌های دریافت‌کننده پروژسترون و پیلوکارپین

گروه‌ها	تعداد کل	تعداد موش‌های مرده	درصد مرگ و میر	تعداد تشنج‌ها
پیلوکارپین	۳۶	۱۶	۴۴	۱۷۰
پیلوکارپین + دوز بالای پروژسترون	۲۳	۳	۱۳	۹۶
پیلوکارپین + دوز متوسط پروژسترون	۲۴	۴	۱۶	۸۸
پیلوکارپین + دوز پایین پروژسترون	۲۵	۵	۲۰	۸۰

حیوانات گروه کنترل و کنترل اوارکتومی (مجموعاً ۴۰ سر) در جدول نمایش داده نشده‌اند.

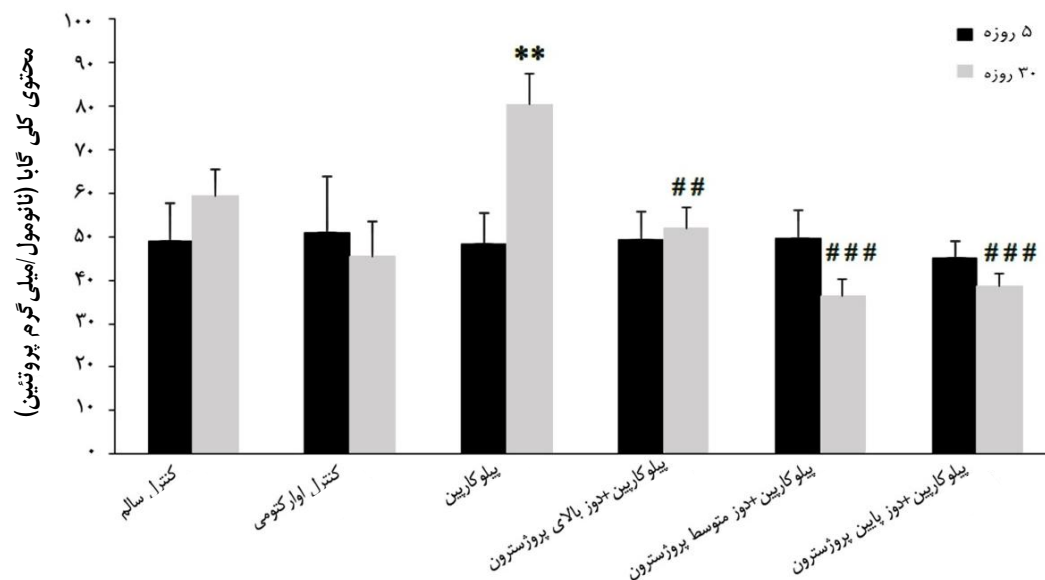


نمودار ۲- مقایسه محتوی کلی گلوتامات هیپوکامپ به دنبال درمان با پروژسترون. در مقایسه گروه‌های مورد مطالعه ۵ و ۳۰ روزه. اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های ۵ روزه گلوتامات و نیز بین گروه‌های مورد مطالعه ۳۰ روزه مشاهده نشد.

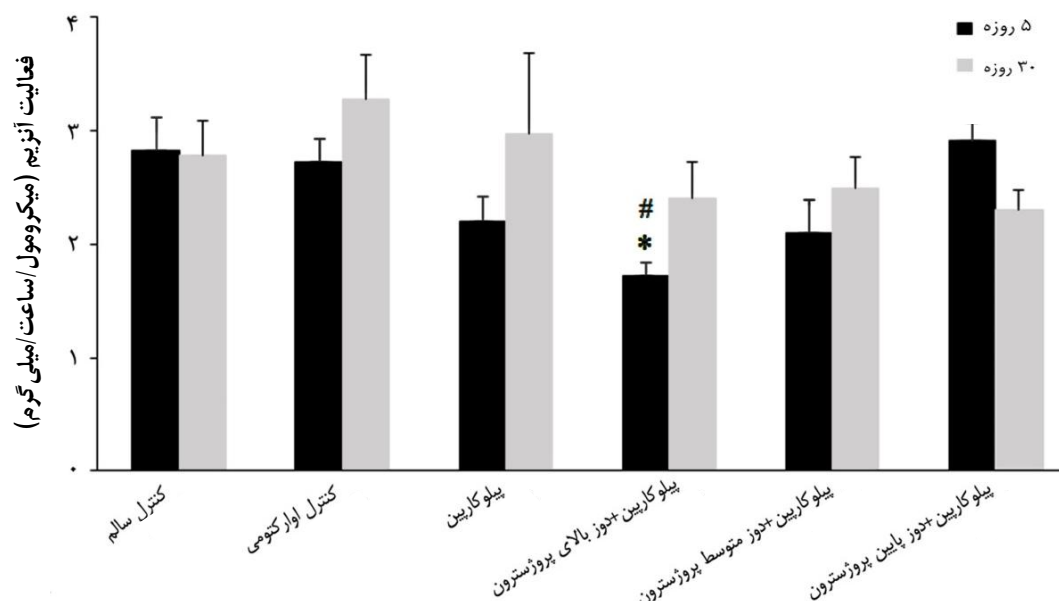
بحث

پروژسترون باعث کاهش معنی‌داری در محتوی گابای هیپوکامپی ۳۰ روزه گردید، اما تغییری در محتوی گلوتامات هیپوکامپی و فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز ایجاد نکرد. دوز بالای پروژسترون فعالیت گلوتامین سنتتاز را در گروه ۵ روزه کاهش داد. اگرچه پروژسترون هورمون استروئیدی تخمدانی است، اما

در این مطالعه به تاثیر دوزهای مختلف پروژسترون بر تشنج‌های ایجادشده بوسیله پیلوکارپین، بر اساس تغییر در محتوی گلوتامات، گابا و فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز پرداخته شده است. تزریق هر سه دوز پروژسترون شدت و تکرار تشنج‌ها و نیز مرگ و میر را کاهش داد. تزریق هر سه دوز



نمودار ۳- اثر پروژسترون بر محتوی کلی گابای هیپوکامپ. در مقایسه گروه‌های مورد مطالعه ۵ روزه، اختلاف معنی‌داری در محتوی گابای هیپوکامپی دیده نشد. در مقایسه گروه‌های مورد مطالعه ۳۰ روزه، وقوع تشنج در گروه پیلوکارپین باعث افزایش معنی‌دار در محتوی گابای هیپوکامپی نسبت به گروه کنترل اوارکتومی شده است. تمام دوزهای پروژسترون محتوی کلی گابای هیپوکامپ را بطور معنی‌دار کاهش داده اند. *: $p < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل اوارکتومی، #: $p < 0.01$ و ###: $p < 0.001$ در مقایسه با گروه پیلوکارپین.



نمودار ۴- تاثیر پروژسترون بر فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز هیپوکامپ. در مقایسه گروه‌های مورد مطالعه ۵ روزه، گروه پیلوکارپین + دوز بالای پروژسترون نسبت به گروه پیلوکارپین و گروه کنترل اوارکتومی کاهش معنی‌داری نشان داد. در گروه‌های مورد مطالعه ۳۰ روزه، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها دیده نشد. #؛ $p < 0.05$ در مقایسه با گروه پیلوکارپین، *؛ $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل اوارکتومی.

تشنجات را نشان داد. مهار گیرنده پروژسترون و تجویز همزمان پروژسترون توانست بخشی از افزایش استعداد تشنجی را کاهش دهد ولی نتوانست همه موارد تشنج را مهار نماید که نشانگر اثرگذاری ضد تشنجی پروژسترون از مسیرهایی غیر از گیرنده خودش می‌باشد [۱۶]. به نظر می‌رسد که کاهش آستانه تشنج ناشی از دوز بالای پروژسترون در این مطالعه نیز احتمالاً از طریق مسیر گیرنده‌ای پروژسترون اتفاق افتاده باشد.

یک مطالعه نشان داد که دوز آرام بخش و بالای پروژسترون می‌تواند فعالیت ضد تشنجی در موش‌های نر را با فعال کردن کمپلکس رسپتور گابا نشان دهد [۱۷]. برخلاف این مطالعه، بررسی دیگری به همین صورت ولی در دوزهای پایین پروژسترون انجام شده که هیچ تغییری در پارامترهای تشنج ایجاد نکرد [۱۸]. استفاده از دوزهای مختلف پروژسترون در این بررسی نشان داد که هر سه دوز می‌توانند اثرات ضد تشنجی در مدل پیلوکارپینی موش ماده داشته باشند. البته کاهش بیشتری در مدت زمان تشنج و تعداد تشنج‌ها در دوز بالای پروژسترون نسبت به دوز متوسط و پایین دیده شد که می‌تواند از این فرضیه حمایت کند که با افزایش دوز پروژسترون اثرگذاری آن بر سیستم عصبی بیشتر می‌شود که به معنای اثرگذاری وابسته به دوز می‌باشد.

مطالعات نشان داده‌اند که تغییر در میزان نوروترانسمیترهای

عملکردش تنها به ارگان‌های تولید مثلی محدود نمی‌شود. این هورمون تاثیرات متنوعی بر سیستم‌های مختلف مثل سیستم عصبی می‌گذارد. در سه دهه قبل، باور بر این بود که این هورمون در کنار هورمون استروژن فعال کننده‌های نورونی هستند. در سال‌های اخیر، شواهد کلینیکی، حاکی از اثرات محافظت عصبی این هورمون و اثرات رشددهنده عصبی برای استروژن و پروژسترون است. [۱۵].

در مدل‌های حیوانی ماده بالغ، پروژسترون باعث مهار شلیک نورونی، کاهش تشنج خودبه‌خودی و باعث مهار تخلیه صرعی می‌شود و وقوع تشنج را کاهش می‌دهد [۱۲]. گابا به نوبه خود می‌تواند سمیت تحریکی ناشی از آسیب را در صدمات مغزی کاهش دهد. حضور پروژسترون و اثر بر گیرنده گابا می‌تواند این امر را تسهیل کند. نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز دوزهای مختلف پروژسترون باعث کاهش شدت و مدت زمان تشنج‌ها می‌گردد. کاهش میزان مرگ و میر در گروه‌های درمان، نشان‌دهنده اثرات محافظتی پروژسترون در برابر تشنج‌ها می‌باشد. از طرفی، تجویز دوز بالای پروژسترون باعث کاهش زمان نهفته ۲ شد که این خود البته به نفع تشنج می‌باشد و کاهش آستانه تشنج در اثر دوز بالای پروژسترون به حساب می‌آید. در مطالعه‌ای، اثر قطع مصرف پروژسترون بر تشنج‌های ناشی از پیلوکارپین بررسی شد و نتایج، افزایش

گلوتامات و گابا می‌تواند بر شدت و مدت تشنجات تاثیرگذار باشد. در این راستا صرفی و همکاران نشان دادند که تجویز استرادیول احتمالاً از طریق تغییر در میزان گلوتامات و گابا بر کاهش تشنجات تاثیرگذار است [۱۹]. نتایج مطالعه فوق نشان داد که تزریق هر سه دوز پروژسترون باعث کاهش معنی‌داری در محتوی گابای هیپوکامپی می‌گردد، اما تغییری در محتوی گلوتامات هیپوکامپی ایجاد نمی‌کند. در مقابل، تزریق پیلوکارپین به افزایش میزان گابا منجر شده است که در راستای اثرات ضد تشنجی مورد انتظار پروژسترون است، در حالی که اثرات مشاهده شده معکوس این انتظار بوده و ناشی از پیلوکارپین می‌باشد. مشاهده افزایش گابا در اثر پیلوکارپین، احتمالاً نشان از نوعی واکنش هومئوستاتیک بدن در برقراری مجدد شرایط پایدار قبل تشنج است، که نشانگر نوعی محدودیت در تحقیق حاضر است و بایستی در تحقیقات بعدی به صورت بررسی تغییرات مولکولی طی زمان پژوهیده شود. لذا، با توجه به دینامیک سریع تغییرات نوروترانسمیتری، به نظر می‌رسد که زمان اندازه‌گیری گلوتامات و گابا در این مطالعه بایستی در ۷۲-۴۸ ساعت اولیه پس از تشنج انتخاب می‌شد. صرفنظر از جهت تغییرات ناشی از پروژسترون بر تغییرات گابا و گلوتامات، مطلق تغییرات نشاندهنده‌ی اثرگذاری پروژسترون بر تغییرات ناشی از پیلوکارپین است. اثرات ضد تشنجی مشاهده شده در هر سه دوز پروژسترون متفاوت است. لذا احتمالاً مکانیسم‌های اثرگذاری نیز متفاوت باشد. صرفی و همکاران نشان دادند که اثر دوزهای بالا و پایین استروژن از مسیرهای متفاوت آستروسیتی و نورونی می‌تواند عمل کنند [۱۹]. در اینجا نیز با توجه به اثر قویتر غلظت‌های پایین پروژسترون در کاهش میزان گابای هیپوکامپی، احتمال دخالت سیستم نورونی مطرح است، که البته برای اثبات این فرضیه نیاز به مطالعات تکمیلی بر روی ترانسپورترها و آنزیم‌های تولید گابا می‌باشد. در این پژوهش، دوزهای مختلف پروژسترون اثری بر محتوی گلوتامات نشان نداده است، این به معنی است که دوزهای مختلف پروژسترون بر گلوتامات تاثیری نداشته و از مسیر دیگری و احتمالاً با تاثیر بر نوروترانسمیتر گابا اثرات خود را اعمال می‌کند. در این راستا و در مطالعه‌ای، رت‌ها بعد از القای تشنج با استنشاق فلوروتیل، تحت درمان عضلانی با پروژسترون قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سطوح انتقال دهنده

نوع ۲ گابا^{۱۶} و بیان پروتئین انتقال دهنده نوع ۲ گلوتامات^{۱۷} بعد از وقوع تشنج در قشر و هیپوکامپ افزایش داشتند. بعد از درمان با پروژسترون میزان بیان پروتئین انتقال دهنده نوع ۲ گلوتامات باز هم افزایش یافت، درحالی‌که سطوح انتقال دهنده نوع ۲ گابا کاهش یافت. این نتایج نشان می‌دهند که پروژسترون باعث حفظ توازن بین سیستم تحریک و مهار در راستای جمع‌آوری گلوتامات و کمک به تجمع گابا شده و از پیشرفت تشنجهای مکرر پیشگیری می‌کند [۱۴]. بنابراین تاثیر پروژسترون باعث کاهش تحریک‌پذیری عصبی می‌گردد و بدین ترتیب به کاهش رفتارهای تشنجی کمک می‌کند.

آستروسیت‌ها به عنوان سلول‌های پشتیبان نورونی، هم در تغذیه و هم در فعالیت سیناپسی نقش بازی می‌کنند. این سلول‌ها با بافر کردن گلوتامات از طریق ورود به داخل آستروسیت (توسط ناقل‌هایی از جمله GLT1) و تبدیل گلوتامات در داخل آستروسیت به گلوتامین (توسط آنزیم گلوتامین سنتتاز) می‌توانند از تحریک‌پذیری بیش از حد سیناپسی در شرایطی مانند تشنج جلوگیری نمایند [۲۰]. نتایج این مطالعه حاکی از عدم تغییر گلوتامین سنتتاز بدنال تجویز پیلوکارپین و کاهش این آنزیم متعاقب درمان با پروژسترون می‌باشد. اگر چه در اینجا نیز اثر افزایشی فعالیت گلوتامین سنتتاز برای تبدیل گلوتامات به گلوتامین در جهت کنترل تشنجهای مورد انتظار بود، اما به نظر می‌رسد که پاسخ جبرانی هومئوستاتیک مغز توانسته است از طریق تغییرات احتمالی بعد از بروز تشنج در فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز، عمل کرده و طی مرحله نهفته مدل پیلوکارپین، مقدار گابا در گروه ۳۰ روزه را افزایش دهد. درحالی‌که فعالیت گلوتامین سنتتاز که در اثر پروژسترون در بازه ۵ روزه کاهش یافته بود، نتوانسته در دوره نهفته تغییر نشان دهد و میزان گابا نه تنها افزایش نیافته که کاهش نیز یافته است. این کاهش فعالیت آنزیم می‌تواند ناشی از اثر مستعدکننده تشنج پروژسترون از طریق گیرنده خودش باشد [۱۶] و به نوبه خود، توجیه مناسبی برای اثر مستعدکننده تشنج پروژسترون دوز بالا بر زمان نهفته ۲ نیز محسوب شود. به صورتی که این کاهش فعالیت آنزیم از کاهش گلوتامات سیناپسی می‌کاهد و باعث فعالیت بیشتر سیناپسی می‌گردد.

¹⁶ GABA transporter 2

¹⁷ Glutamate transporter 2

نتیجه گیری

نتایج ما نشان داد که پروژسترون اثرات ضد تشنجی قابل توجهی به صورت وابسته به دوز نشان داده است. عدم تغییر گلوتامات هیپوکامپی و افزایش میزان گابا و اثر پروژسترون بر کاهش فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز نشانگر احتمالی تغییرات وابسته به زمان است و به نظر می رسد ناشی از فرایندهای هومئوستاتیک مغز باشد که با درمان تداخل می کند. در عین حال انجام مطالعات تکمیلی در آینده می تواند در پیدا کردن مکانیسم های احتمالی راهگشا باشد.

سیاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد است که با حمایت مالی دانشگاه دامغان انجام شده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ع.ب: انجام آزمایش ها؛ م.ا.س: طراحی تحقیق و نوشتن مقاله و تحلیل نتایج؛ ا.گ: تحلیل نتایج رفتاری؛ ت.ل: تحلیل نتایج مولکولی.

فهرست منابع

- [1] Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon CS, Dykeman J, Pringsheim T, Lorenzetti DL, Jette N, Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology* 88 (2017) 296-303.
- [2] Ferrie CD, Bird S, Tilling K, Maisey MN, Chapman AG, Robinson RO, Plasma amino acids in childhood epileptic encephalopathies. *Epilepsy Res* 34 (1999) 221-229.
- [3] Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti Mda G, Scerni DA, Calderazzo L, Cavalheiro EA, The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An Acad Bras Cienc* 81 (2009) 345-365.
- [4] Rainesalo S, *GABA and glutamate in human epilepsies: studies on the platelet model* [dissertation]. Tampere Univ., 2004.
- [5] Chapman AG, Glutamate and epilepsy. *J Nutr* 130 (2000) 1043S-1045S.
- [6] Coulter DA, Steinhäuser C, Role of astrocytes in epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5 (2015) a022434.
- [7] Luef G, Tauboll E, Gender issues in epilepsy--Difference in management of epilepsy. *Seizure* 28 (2015) 1-2.
- [8] Tatum WO, Liporace J, Benbadis SR, Kaplan PW, Updates on the treatment of epilepsy in women. *Arch Intern Med* 164 (2004) 137-145.
- [9] Veliskova J, Desantis KA, Sex and hormonal influences on seizures and epilepsy. *Horm Behav* 63 (2013) 267-277.
- [10] Zimmerman AW, Hormones and epilepsy. *Neurol Clin* 4 (1986) 853-861.
- [11] Morrell MJ, Epilepsy in women. *Am Fam Physician* 66 (2002) 1489-1494.
- [12] Herzog AG, Catamenial epilepsy: definition, prevalence pathophysiology and treatment. *Seizure* 17 (2008) 151-159.
- [13] Reddy DS, The role of neurosteroids in the pathophysiology and treatment of catamenial epilepsy. *Epilepsy Res* 85 (2009) 1-30.
- [14] Liu L, Mao D, Liu L, Huang Y, Bo T, Effects of progesterone on glutamate transporter 2 and gamma-aminobutyric acid transporter 1 expression in the developing rat brain after recurrent seizures. *Neural Regen Res* 7 (2012) 2036-2042.
- [15] Morrell MJ, Epilepsy in women: the science of why it is special. *Neurology* 53 (1999) S42-S48.
- [16] Shiono S, Williamson J, Kapur J, Joshi S, Progesterone receptor activation regulates seizure susceptibility. *Ann Clin Transl Neurol* 6 (2019) 1302-1310.
- [17] Mohammad S, Abolhassan A, Pourgholami MH, Evaluation of the anticonvulsant profile of progesterone in male amygdala-kindled rats. *Epilepsy Res* 30 (1998) 195-202.
- [18] Sayyah M, Pourgholami MH, Lack of anticonvulsant activity of intracerebroventricular progesterone and allopregnanolone in male amygdala-kindled rats. *Med J Iran* 12 (1999) 373-380.
- [19] Sarfi M, Elahdadi Salmani M, Goudarzi I, Lashkar Boluki T, Abrari K, Evaluating the role of astrocytes on beta-estradiol effect on seizures of Pilocarpine epileptic model. *Eur J Pharmacol* 797 (2017) 32-38.
- [20] Eid T, Behar K, Dhaheer R, Bumanglag AV, Lee TS, Roles of glutamine synthetase inhibition in epilepsy. *Neurochem Res* 37 (2012) 2339-2350.

Research paper

The effect of progesterone on the seizures of the lithium-pilocarpine model in the female ovariectomized rat: an investigation on behavioral, biochemical and the activity of glutamine synthetase enzyme

Efat Baran, Mahmoud Elahdadi Salmani*, Iran Goudarzi, Taghi Lashkarbolouki

School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran

Received: 19 October 2019

Accepted: 7 December 2019

Abstract

Background and aims: Epileptic seizures, during menstrual cycle, are mostly due to low level of progesterone. Furthermore, astrocytes influence brain excitability. Therefore, this study investigates the anticonvulsive effect of progesterone on convulsions, glutamate and GABA content and the involvement of the astrocytes through glutamine synthetase (GS) enzyme.

Methods: Female Wistar rats (n = 120) were assigned in six experimental groups including; naïve control, ovariectomized control, pilocarpine, progesterone treatment groups (0.2, 2, and 20 mg/kg). Lithium-Pilocarpine model was used to induce convulsions and the behavior was evaluated during one hour after pilocarpine injection. Progesterone, with low, medium and high doses was daily administered for five days. Following five or thirty days, the brains were dissected and the hippocampal glutamate, GABA and the activity of glutamine synthetase were measured.

Results: Latency to convulsions decreased (184%), only in high-dose (HD) progesterone group, while the duration of seizures decreased in low, medium and high (105, 59, and 265%) doses of progesterone. In the five-day sacrificed animals, the GC activity decreased (164%) in HD progesterone treated group. In the thirty-day groups, GABA increased (176%) due to pilocarpine and decreased following the progesterone treatment in the low, medium and high (106, 70, and 64%) doses.

Conclusion: It is concluded that progesterone administration has anticonvulsive (concentration dependent) effects, and changes the glutamate and GABA content and astrocytic GS activity.

Keywords: Progesterone, Epilepsy, Glutamate and GABA, Glutamine synthetase, Hippocampus

Please cite this article as follows:

Baran E, Elahdadi Salmani M, Goudarzi I, Lashkarbolouki T, The effect of progesterone on the seizures of the lithium-pilocarpine model in the female ovariectomized rat: an investigation on behavioral, biochemical and the activity of glutamine synthetase enzyme. *Iran J Physiol Pharmacol* 3 (2019) 132-141.

*Corresponding author: elahdadi@du.ac.ir (ORCID ID: 0000-0001-5237-3958)