

## اثرات مرکزی فوئکسین و موسیمول بر تشنجات ناشی از پنتیلین تترازول در مراحل مختلف چرخه فعلی در موش صحرائی

علی اکبر آزادی<sup>۱</sup>، مرتضی زنده دل<sup>۲</sup>، جهانگیر کبوتری<sup>۳</sup>، نگار پناهی<sup>۴</sup>، احمد اصغری<sup>۵</sup>

۱-دکتری تخصصی گروه علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲-استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران. نویسنده مسئول: zendedel@ut.ac.ir

۳-دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۴-استادیار گروه علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۵-دانشیار گروه علوم درمانگاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** صرع کاتامینال یا قاعدگی، شکلی خاص از صرع در زنان است که طی آن با بروز چرخه قاعدگی تشدید تشنج رخ می دهد و ممکن است تا ۷۰ درصد از زنان دچار صرع را درگیر نماید. بر پایه مطالعات پیشین، نقش نوروپپتید فوئکسین در سیستم تولیدمثلی جنس ماده مشاهده شده و اثرات ضد تشنجی آن نیز اخیراً به اثبات رسیده است. همچنین به نظر می رسد که سیستم گابائریک نقش مهمی در مهار تشنج ایفا کند. از این رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات مرکزی فوئکسین و موسیمول (آگونیست گیرنده گابا A) بر تشنجات ناشی از پنتیلین تترازول در مراحل مختلف چرخه فعلی در موش صحرائی انجام شد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تعداد ۱۲۰ سر موش صحرائی ماده در ۵ گروه آزمایشی به ترتیب تزریق درون بطن مغزی سرم فیزیولوژی، فوئکسین (۵ میکروگرم)، فوئکسین (۱۰ میکروگرم)، فوئکسین (۵ میکروگرم) + موسیمول (۰/۱ میکروگرم) و فوئکسین (۱۰ میکروگرم) + موسیمول (۰/۱ میکروگرم) را طی مراحل مختلف چرخه فعلی (پرواستروس، استروس، متاستروس و دی استروس) دریافت کردند. پس از تزریق درون بطن مغزی، به منظور القا تشنج، تزریق درون صفاقی پنتیلین تترازول با دوز ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش صحرائی در تمامی گروه ها انجام شد و زمان آغاز تشنجات میوکلونیک و تونیک-کلونیک (ثانیه) به مدت ۳۰ دقیقه ارزیابی و ثبت شد.

**نتایج:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تزریق فوئکسین به تنهایی در دوزهای ۵ و ۱۰ میکروگرم بصورت وابسته به دوز موجب افزایش معنی دار زمان شروع تشنجات میوکلونیک و تونیک-کلونیک (ثانیه) در تمامی فازهای فعلی نسبت به گروه کنترل شد ( $p < 0/05$ ). همچنین تزریق توأمان فوئکسین با موسیمول نیز بطور معنی داری تشدید اثر فوئکسین بر زمان شروع تشنجات میوکلونیک و تونیک-کلونیک (ثانیه) را در تمامی فازهای فعلی در پی داشت ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که اثرات ضد تشنجی فوئکسین احتمالاً توسط گیرنده های گابا A میانجی گری شود.

**کلمات کلیدی:** چرخه فعلی، پنتیلین تترازول، فوئکسین، موسیمول، موش صحرائی

## مقدمه

اثرات ضد تشنجی پروژسترون در مدل‌های حیوانی و انسان بوده است (۱۰،۱۱). همچنین رابطه متقابلی بین نسبت استرادیول به پروژسترون سرم و بروز تشنج در چرخه‌های تخمک گذاری وجود دارد، بطوریکه کمترین فعالیت تشنجی با سطوح بالای پروژسترون در مقایسه با سطوح استرادیول مشاهده شده است (۱۲،۱۳). در موش‌های صحرایی، چرخه فحلی (استروس) شامل یک چرخه ۴ روزه است: پرواستروس با افزایش سریع غلظت استرادیول و به دنبال آن افزایش پروژسترون در بعد از ظهر و عصر آغاز می‌شود، که در طول تخمک‌گذاری به اوج رسیده و سپس به سرعت کاهش می‌یابد. در روز دوم فحلی، در حالی که پروژسترون در حال افزایش است، غلظت استرادیول همچنان بالا می‌ماند. در روز سوم، متاستروس با افزایش مختصر و خفیف پروژسترون در اواسط روز آغاز می‌گردد. دی‌استروس، آخرین روز چرخه فحلی است که طی آن سطح سرمی استرادیول و پروژسترون در ابتدا پایین است و متعاقباً سطح استرادیول به آرامی افزایش می‌یابد (۱۴). القای تشنج یکی از مراحل مهم در مطالعات مرتبط با صرع محسوب می‌شود. یکی از داروهایی که معمولاً با این هدف مورد استفاده قرار می‌گیرد، پنتیلن تترازول (PTZ)<sup>۳</sup> است که از طریق اتصال با گیرنده‌های گابا A اثرات مهارتی سیستم گابائوترژیک<sup>۴</sup> در CNS را کاهش داده یا از بین می‌برد (۱۵،۱۶). علاوه بر مکانیسم عملکرد PTZ، شواهد دیگری نیز بیانگر نقش سیستم گابائوترژیک در بروز تشنج می‌باشند. به نظر می‌رسد عواملی که سطح گابا در مغز را کاهش می‌دهند یا گیرنده‌های گابا پس سیناپسی را مسدود می‌کنند، حساسیت به تشنج را افزایش داده (۱۷،۱۸)، در حالیکه داروهایی که اثرات گابا را تقویت می‌کنند، دارای

صرع به عنوان یکی از قدیمی‌ترین اختلالات مرتبط با سیستم عصبی مرکزی (CNS)<sup>۱</sup> شناخته می‌شود (۱). تاکنون نتایج چندین مطالعه ارتباط نزدیک میان هورمون‌های جنسی و صرع را نشان داده است (۲). در این ارتباط میتوان به صرع کاتامنیال<sup>۲</sup> که نوعی تشنج مرتبط با دوره قاعدگی است و در برخی از زنان مبتلا به صرع در طول چرخه قاعدگی اتفاق می‌افتد، اشاره نمود. این عارضه در بین زنان مبتلا به صرع کانونی یا عمومی شایع‌تر است و ممکن است تا ۷۰ درصد از زنان دچار صرع را درگیر نماید (۳). تغییر در غلظت داروهای ضد صرع، عدم تعادل آب و الکترولیت و تغییرات فیزیولوژیکی در غلظت هورمون‌های تخمدان از محتمل‌ترین علل بروز صرع قاعدگی هستند (۴). همچنین بر اساس مستندات زنان مبتلا به تشنج‌هایی که از لوب‌های گیجگاهی مغز آغاز می‌گردند، بیشتر از زنان عادی دچار اختلالات تولید مثلی مانند تخمدان‌های پلی کیستیک، یائسگی زودرس و تخمک‌گذاری نامنظم می‌شوند (۵). باید توجه داشت که ارتباط نزدیکی بین لوب‌های گیجگاهی و مناطقی از مغز (هیپوتالاموس و غده هیپوفیز) که ترشح هورمون‌های جنسی را تنظیم می‌کنند، وجود دارد، بنابراین تولید طبیعی هورمون‌ها ممکن است با بروز تشنج تغییر کند (۶). تاکنون یافته‌های فراوانی نقش هورمون‌های جنسی مردانه و زنانه را بر میزان حساسیت نسبت به صرع نشان داده‌اند (۷). در این رابطه به خوبی ثابت شده است که هورمون‌های جنسی آستانه، فراوانی و همچنین علائم تشنج را تغییر می‌دهند (۸). شواهدی وجود دارد که استروژن‌ها منجر به افزایش تحریک پذیری عصبی می‌گردند (۹)، در حالی که نتایج مطالعات دیگر بیانگر

<sup>۳</sup> Pentylenetetrazol  
<sup>۴</sup> GABAergic system

<sup>۱</sup> Central nervous system  
<sup>۲</sup> Catamenial epilepsy

PTZ در مراحل مختلف چرخه فعلی در موش صحرایی انجام شد.

### مواد و روش ها

#### شرایط نگهداری حیوانات

حیوانات مورد استفاده در این پژوهش موش‌های صحرایی ماده بالغ بودند که به تعداد ۱۲۰ سر با وزن تقریبی ۱۸۰-۲۰۰ گرم از بخش تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تهران فراهم شدند. موش‌های صحرایی با رعایت اصول راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (موسسه ملی سلامت ایالات متحده آمریکا) و همچنین مطابق با قوانین مصوب توسط کمیته اخلاق حیوانات آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی (با کد اخلاق IAUSRB:2020.06.18)، در شرایط کنترل شده و دقیق از جمله تهویه مناسب، دوره‌های روشنایی و تاریکی متناوب (هر ۱۲ ساعت)، درجه حرارت ۲۳-۲۱ درجه سانتی‌گراد، رطوبتی نسبی ۵۵ تا ۵۶ درصد و اقدامات بهداشتی لازم قرار گرفتند و دسترسی آزاد به آب و غذا (پلت) داشتند. در ابتدا، بلوغ جنسی و مرحله چرخه فعلی به وسیله گسترش‌های واژنی براساس نوع سلول غالب دیده شده، مشخص گردید و موش‌های صحرایی با دست کم دو چرخه فعلی طبیعی برگزیده و به شکل تصادفی در هر گروه به ۴ زیرگروه (n=۶) تقسیم گردیدند.

#### همزمان سازی چرخه فعلی

یک هفته پس از سازگاری موش‌های صحرایی، همزمان سازی چرخه فعلی به روش طبیعی انجام گرفت. به این منظور پوشال‌های آغشته به ادرار موش‌های نر، به قفس موش‌های ماده انتقال داده شدند و به مدت ۵ روز در کف قفس‌ها باقی ماندند. پس از این مدت نمونه گیری از ناحیه

خواص ضد تشنجی هستند (۱۹،۲۰). نوروپتید فوئکسین (PNX)<sup>۱</sup> که اخیراً شناسایی شده، دارای دو ایزوform ۱۴ (PNX-14) و ۲۰ (PNX-20) اسید آمینه‌ای است (۲۱). این نوروپتید می‌تواند یک اثر تعدیل کننده روی سیستم عصبی و سیستم تولید مثلی زنان ایجاد کند (۲۲). حضور این نوروپتید در برخی مناطق مغزی از جمله تعدادی از هسته‌های هیپوتالاموس، هسته دسته‌جات منزوی (NTS)<sup>۲</sup> و هیپوفیز قدامی به اثبات رسیده است (۲۳). PNX-14 در پنج گونه از جمله موش سوری، موش صحرایی، سگ، خوک و انسان به طور یکسان شناسایی شده است و تنها یک اسید آمینه در PNX-20 در میان مناطق کدکننده توالی‌های انسان، سگ و خوک متفاوت است (۲۴). همان طور که پیش‌تر ذکر شد، PNX در هیپوتالاموس به فراوانی بیان می‌شود و می‌تواند نقش مهمی در تحریک عملکردهای تولید مثلی از طریق عمل بر روی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز - گناده (HPG)<sup>۳</sup> ایفا کند (۲۵). همچنین مطالعات نشان داده است که تجویز داخل بطنی مغزی (ICV)<sup>۴</sup> فوئکسین سبب افزایش وابسته به دوز سطوح پلاسمایی هورمون لوتئینه کننده (LH)<sup>۵</sup> می‌گردد (۲۶). با توجه به عملکرد فیزیولوژیکی فوئکسین در سیستم تولید مثلی و نقش هورمون‌های جنسی و سیستم گاباژریک در بروز صرع قاعدگی و با توجه به این امر که تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی تداخل اثر فوئکسین و آگونیست گیرنده گابا A در صرع قاعدگی نپرداخته است، این مطالعه با هدف بررسی اثرات مرکزی فوئکسین و موسیمول (Musc)<sup>۶</sup> (آگونیست گیرنده گابا A) بر صرع ناشی از

<sup>۱</sup> Phoenixin

<sup>۲</sup> Nucleus of the solitary tract

<sup>۳</sup> Hypothalamic-pituitary-gonadal

<sup>۴</sup> Intracerebroventricular

<sup>۵</sup> Luteinizing hormone

<sup>۶</sup> Muscimol

در زمان انجام تزریق ICV به وسیله سرنگ هامیلتون، مفتول سیمی خارج شده و تزریق انجام می‌شد (۲۹). داروهای فونکسین و موسیمول از شرکت سیگما-آلدریج کشور آمریکا خریداری شدند.

### گروه‌های آزمایش

در این مطالعه موش‌های صحرایی در پنج گروه تقسیم شدند. تزریق ICV سرم فیزیولوژی در گروه اول (کنترل)، فونکسین (۵ میکروگرم) در گروه دوم، فونکسین (۱۰ میکروگرم) در گروه سوم، فونکسین (۵ میکروگرم) + موسیمول (۰/۱ میکروگرم) در گروه چهارم و فونکسین (۱۰ میکروگرم) + موسیمول (۰/۱ میکروگرم) در گروه پنجم، طی مراحل مختلف چرخه فعلی (پرواستروس، استروس، مت‌استروس و دی‌استروس) انجام شد (جدول ۱). لازم به ذکر است به منظور کاهش اثر احتمالی ریتم شبانه-روزی به کمترین میزان ممکن، تمامی آزمایشات در ساعت ۹-۱۲ صبح انجام گرفت (۳، ۱۶، ۲۸). گزینش دوز تمامی داروها نیز بر اساس پژوهش‌های پیشین شکل گرفته است (۲۹، ۳۰).

واژن انجام گرفت و بر اساس نوع سلول غالب دیده شده، مرحله چرخه فعلی شناسائی گردید (۳، ۲۷، ۲۸).

### روش جراحی استریوتاکی برای کانول گذاری

به منظور کانول‌گذاری در بطن جانبی راست، ابتدا موش‌های صحرایی با داروی کتامین (۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) (شرکت آلفاسان، هلند) و زایلازین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) (شرکت آلفاسان، هلند) به شکل درون صفاقی (IP) بیهوش شدند. سپس سر موش‌ها در دستگاه استریوتاکس (شرکت استولیتینگ، آمریکا) ثابت شده و پس از برش روی خط میانی سر به طول یک سانتی متر و کنار زدن بافت همبند، کانول راهنما بر اساس اطلس واتسون و پاکسینوس (mm)  $Ap = 0.8 \text{ mm}$ ،  $DV = 3.3 \text{ mm}$ ،  $ML = 1.6$  در بطن جانبی راست مغز کاشته شد. کانول راهنما از جنس استیل و به طول ۱۲ میلی متر بود. همچنین برای جلوگیری از بسته شدن کانول راهنما در زمان ریکاوری و تا پیش از انجام تزریق‌ها یک عدد مفتول سیمی از جنس استیل ضد زنگ و به طول ۱۲/۵ میلی متر در داخل کانول راهنما قرار گرفت و

جدول ۱- پروتکل درمانی مورد مطالعه. تزریق دوم ۳۰ دقیقه بعد از تزریق اول انجام شد. تعداد موش‌ها در هر گروه = ۶

گروه‌های آزمایشی	تزریق اول (ICV)	تزریق دوم* (IP)
کنترل	سرم فیزیولوژی	پنتیلین تترازول (۸۰ mg/kg)
فونکسین (۵ میکروگرم)	فونکسین (۵ میکروگرم)	پنتیلین تترازول (۸۰ mg/kg)
فونکسین (۱۰ میکروگرم)	فونکسین (۱۰ میکروگرم)	پنتیلین تترازول (۸۰ mg/kg)
فونکسین (۵ میکروگرم) + موسیمول (۰/۱ میکروگرم)	فونکسین (۵ میکروگرم) + موسیمول (۰/۱ میکروگرم)	پنتیلین تترازول (۸۰ mg/kg)
فونکسین (۱۰ میکروگرم) + موسیمول (۰/۱ میکروگرم)	فونکسین (۱۰ میکروگرم) + موسیمول (۰/۱ میکروگرم)	پنتیلین تترازول (۸۰ mg/kg)

تزریق دوم ۳۰ دقیقه بعد از تزریق اول انجام شد. تعداد موش‌ها در هر گروه = ۶

## القاء تشنج

پس از تزریق ICV، در تمامی گروه‌ها به منظور القاء تشنج، مقدار ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش صحرایی PTZ به صورت IP تزریق شد. سپس میانگین زمانی برای رسیدن به گام‌های گوناگون تشنج<sup>۱</sup> در مدت ۳۰ دقیقه پس از تزریق مورد ارزیابی و ثبت قرار گرفت. گام‌های گوناگون امتیاز تشنجی و ویژگی رفتاری موش‌ها به شکل زیر مورد بررسی قرار می‌گرفت:

مرحله صفر: رفتارهای معمولی حیوان

مرحله ۱: تشنج‌های منفرد میوکلونیک سر (تیک سر)

مرحله ۲: تشنج‌های پایبی سر همراه با تکان‌های ناگهانی اندام حرکتی جلویی و سرازیر شدن بزاق دهانی

مرحله ۳: تشنج کل بدن و اندام حرکتی جلویی، به طور معمول پاها از هم باز شده و حیوان بر روی پاها بلند می‌شود.

مرحله ۴: تشنج‌های تونیک-کلونیک عمومی بدن

مرحله ۵: چرخش و پرش پیوسته حیوان و افتادن به پهلو

مرحله ۶: مرگ

باتوجه به شمار زیاد داده‌ها در این پژوهش و با توجه به پژوهش‌های پیشین، برای نشان دادن و بیان آسان تر مطالب، مراحل ۱ تا ۳ به عنوان تشنج‌های میوکلونیک و مراحل ۴ و ۵ به عنوان تشنج‌های تونیک-کلونیک در نظر گرفته می‌شد (۳، ۱۶، ۲۸).

## بررسی صحت کانول گذاری

به منظور ایجاد اطمینان از صحت کانول گذاری و تزریق، در پایان آزمایشات مقدار یک میکرولیتر ماده‌ی رنگی بلودومتیلن از طریق کانول راهنما تزریق شد و پس از جدا کردن سر حیوان مغز آنها خارج گردید و از مغز موش‌ها مقاطع بافتی تهیه و فقط نتایج حاصل از حیواناتی که

کانول راهنما در داخل بطن جانبی مغز قرار داشت، مورد استفاده قرار گرفت.

## روش ارزیابی آماری

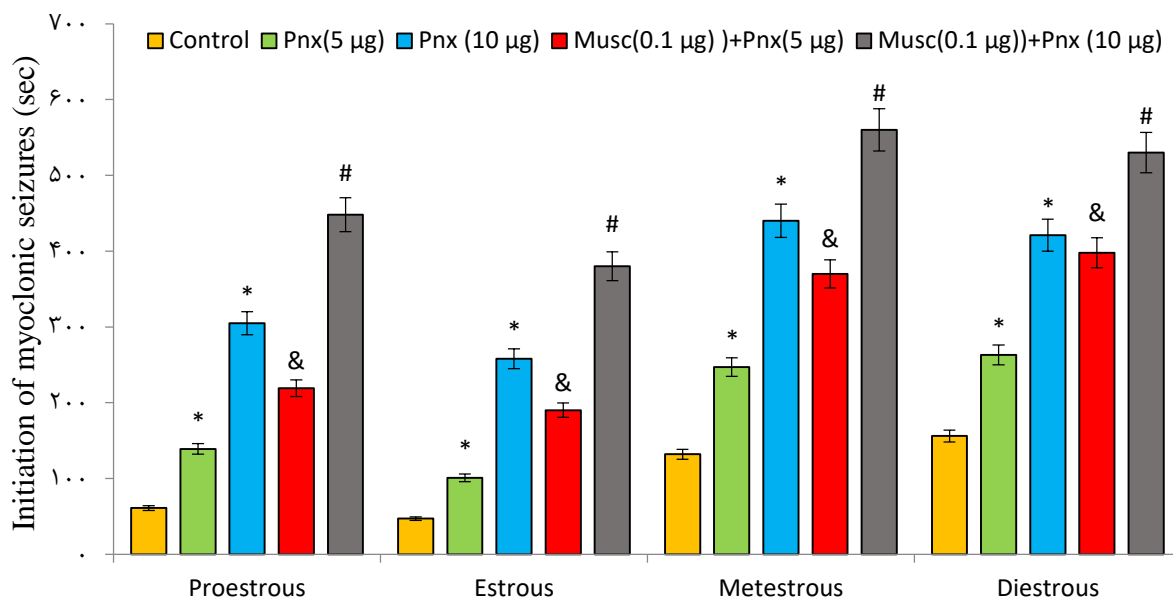
داده‌های به دست آمده از این مطالعه به شکل میانگین  $\pm$  SEM نمایش داده شد. به منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار میان گروه‌های آزمایشی از روش تحلیل واریانس دوطرفه (ANOVA) و تست تعقیبی توکی استفاده شد. در تمام مقایسه‌ها  $p < 0/05$  به عنوان معیار اختلاف معنی‌دار مدنظر بود.

## نتایج

**اثرات فوئنکسین (۵ و ۱۰ میکروگرم) و ترکیب فوئنکسین (۵ و ۱۰ میکروگرم) با موسیمول (۰/۱ میکروگرم) بر زمان شروع تشنجات میوکلونیک<sup>۲</sup> (ثانیه) در مراحل مختلف چرخه فحلی**

اثرات فوئنکسین (۵ و ۱۰ میکروگرم) و ترکیب فوئنکسین (۵ و ۱۰ میکروگرم) با موسیمول (۰/۱ میکروگرم) بر زمان شروع تشنجات میوکلونیک (ثانیه) در مراحل مختلف چرخه فحلی در نمودار ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود تزریق فوئنکسین به تنهایی در دوزهای ۵ و ۱۰ میکروگرم بصورت وابسته به دوز موجب افزایش معنی‌دار زمان شروع تشنجات میوکلونیک (ثانیه) در تمامی فازهای فحلی نسبت به گروه کنترل شد ( $p < 0/05$ ). همچنین تزریق توام فوئنکسین با موسیمول بطور معنی‌داری موجب تشدید اثر فوئنکسین بر زمان شروع تشنجات میوکلونیک (ثانیه) در تمامی فازهای فحلی شد ( $p < 0/05$ ). این نتایج نشان می‌دهد که فوئنکسین با دوزهای ۵ و ۱۰ میکروگرم موجب بروز اثرات ضد تشنجی و افزایش زمان شروع تشنجات میوکلونیک (ثانیه) می‌شود و این اثر

فونئکسین با تجویز همزمان موسیمول به عنوان آگونیسست گیرنده گابا A تشدید می‌گردد (نمودار ۱).



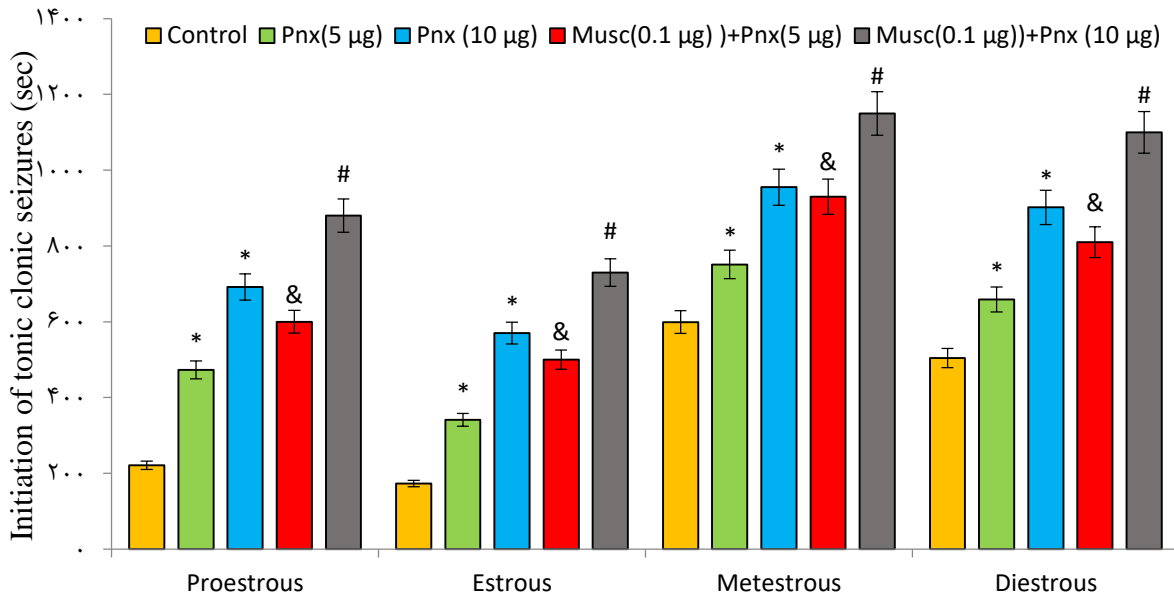
نمودار ۱- اثرات فونئکسین (PNX) (۵ و ۱۰ میکروگرم) و ترکیب فونئکسین (۵ و ۱۰ میکروگرم) با موسیمول (Musc) (آگونیسست گیرنده گابا A) (۰/۱ میکروگرم) بر زمان شروع تشنجات میوکلونیک (ITMS) (ثانیه) در مراحل مختلف چرخه فحلی. \* تفاوت معنی داری را در هر مرحله از چرخه فحلی در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهند ( $p < 0.05$ ). & تفاوت معنی داری را در هر مرحله از چرخه فحلی در مقایسه با گروه فونئکسین ۵ میکروگرم نشان می‌دهند ( $p < 0.05$ ). # تفاوت معنی داری را در هر مرحله از چرخه فحلی در مقایسه با گروه فونئکسین ۱۰ میکروگرم نشان می‌دهند ( $p < 0.05$ ). داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SEM ارائه شده است.

فازهای فحلی نسبت به گروه کنترل شد ( $p < 0.05$ ). همچنین تزریق توام فونئکسین با موسیمول بطور معنی داری موجب تشدید اثر فونئکسین بر زمان شروع تشنجات تونیک کلونیک (ثانیه) در تمامی فازهای فحلی شد ( $p < 0.05$ ). این نتایج نشان می‌دهد که فونئکسین با دوزهای ۵ و ۱۰ میکروگرم موجب بروز اثرات ضد تشنجی و افزایش زمان شروع تشنجات تونیک کلونیک (ثانیه) می‌شود و این اثر فونئکسین با تجویز همزمان موسیمول به عنوان آگونیسست گیرنده گابا A تشدید می‌شود (نمودار ۲).

اثرات فونئکسین (۵ و ۱۰ میکروگرم) و ترکیب فونئکسین (۵ و ۱۰ میکروگرم) با موسیمول (۰/۱ میکروگرم) بر زمان شروع تشنجات تونیک کلونیک<sup>۱</sup> (ثانیه) در مراحل مختلف چرخه فحلی

اثرات فونئکسین (۵ و ۱۰ میکروگرم) و ترکیب فونئکسین (۵ و ۱۰ میکروگرم) با موسیمول (۰/۱ میکروگرم) بر زمان شروع تشنجات تونیک کلونیک (ثانیه) در مراحل مختلف چرخه فحلی در نمودار ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود تزریق فونئکسین به تنهایی در دوزهای ۵ و ۱۰ میکروگرم بصورت وابسته به دوز موجب افزایش معنی-دار زمان شروع تشنجات تونیک کلونیک (ثانیه) در تمامی

<sup>۱</sup> Initiation Time of Tonic-Clonic Seizures (ITTS)



نمودار ۲- اثرات فونکسین (PNX) (۵ و ۱۰ میکروگرم) و ترکیب فونکسین (۵ و ۱۰ میکروگرم) با موسیمول (Musc) (آگونست گیرنده گابا A) (۱/۱ میکروگرم) بر زمان شروع تشنجات تونیک کلونیک (ITTS) (ثانیه) در مراحل مختلف چرخه فحلی. \* تفاوت معنی داری را در هر مرحله از چرخه فحلی در مقایسه با گروه کنترل نشان می دهند ( $p < 0.05$ ). & تفاوت معنی داری را در هر مرحله از چرخه فحلی در مقایسه با گروه فونکسین ۵ میکروگرم نشان می دهند ( $p < 0.05$ ). # تفاوت معنی داری را در هر مرحله از چرخه فحلی در مقایسه با گروه فونکسین ۱۰ میکروگرم نشان می دهند ( $p < 0.05$ ). داده ها به صورت میانگین  $\pm$  SEM ارائه شده است.

## بحث

صرع که نوعی اختلال در سیستم عصبی مرکزی است، ممکن است تا یک درصد از جمعیت کشورهای صنعتی را درگیر کند. در برخی از زنان مبتلا به صرع تغییر در شدت و آستانه تشنج در طول سیکل قاعدگی مشاهده می شود (۳۱). در این ارتباط، افزایش دو برابری و یا بیشتر بروز تشنج در دوره های خاصی از چرخه قاعدگی را به عنوان صرع کاتامینال یا قاعدگی می نامند که ممکن است ۱۰ تا ۷۰ درصد از زنان مبتلا به تشنج کانونی و عمومی را تحت تأثیر قرار دهد (۳). علیرغم اینکه پاتوژنز صرع قاعدگی به وضوح مشخص نشده است، اما مکانیسم کلی بروز آن احتمالاً در نتیجه جهش در ژن های تنظیم کننده کانال های سدیم و/یا گابا، عدم عملکرد صحیح در آزادسازی انتقال دهنده های عصبی، آسیب های شدید مغزی به عنوان مثال تروما و عفونت، عدم تعادل آب و الکترولیت، تغییر

## pH، تغییر در غلظت داروهای ضد صرع و تغییر در غلظت

هورمون تخمدانی باشد (۳۲). به نظر می رسد تفاوت در بروز تشنج در جنس نر و ماده در نتیجه اثرگذاری هورمون های جنسی روی تشنج از طریق تغییر در میزان تحریک پذیری عصبی باشد (۳۳،۳۴). بر اساس یافته ها، استروژن ها آستانه تشنج در نواحی آمیگدال و هیپوکامپ را کاهش داده و بروز تشنج های ناشی از PTZ را تقویت می کنند، در حالی که پروژسترون تحریک پذیری عصبی را کاهش می دهد، منجر به افزایش آستانه تشنج و مانع از بروز آن می گردد (۳۵،۳۶). در این راستا مشاهده شده است که بروز تشنج در طول فاز فولیکولی افزایش و در فاز لوتئال کاهش می یابد (۳۶). در زنان مبتلا به صرع، نوسانات چرخه ای در غلظت یا نسبت استروئیدهای تخمدان و متابولیت های نورواستروئیدی آن ها ممکن است مسئول بروز صرع قاعدگی باشد. در این گروه از زنان، در نیمه فاز

PNX-20 افزایش یافت (۴۴). در همین راستا و در آزمایشی دیگر مشاهده شد که متعاقب تزریق ICV این ترکیب در موش صحرایی سطوح پلاسمایی LH افزایش یافته که احتمالاً این تقویت ترشح ناشی از اثر PNX-20 بر GnRH بوده است (۲۶). علاوه بر این، مطالعاتی در ارتباط با تعاملات PNX با سایر نورون‌ها صورت گرفته است. به عنوان مثال نتایج یک مطالعه بیانگر نقش PNX در افزایش بیان ژن کیسپتین بوده است. به نظر می‌رسد این اثر تقویت کننده بر روی کیسپتین مکانیسم احتمالی دیگری در ارتباط با عملکرد PNX در سیستم تولیدمثلی باشد (۴۴). تا به امروز مطالعات اندکی در خصوص اثرات ضدتشنجی PNX انجام شده است. بر اساس مطالعه آزادی و همکاران (۲۰۲۲) تجویز PNX-14 با دوزهای ۵ و ۱۰ میکروگرم به صورت ICV در موش صحرایی، منجر به کاهش بازه و مرگ و میر ناشی از تشنج شد. از سوی دیگر تزریق این ترکیب در هر دو دوز، زمان آغاز تشنجات میوکلونیک و تونیک-کلونیک را افزایش داد (۳۰). در ارتباط با تداخل اثر فونئکسین و سیستم گابائوترژیک نیز، در مطالعه آزادی و همکاران (۲۰۲۲) مشاهده شد که تجویز توآمان PNX و آنتاگونیست گیرنده‌های گابا B اثری بر پارامترهای مورد بررسی در بروز تشنج نداشت، در حالیکه تزریق توآمان PNX و آنتاگونیست گیرنده‌های گابا A، منجر به تضعیف معنی‌دار افزایش زمان آغاز تشنجات میوکلونیک و تونیک-کلونیک ناشی از PNX گشت (۳۰).

در مطالعه کنونی نیز هم‌راستا با پژوهش‌های پیشین، تزریق PNX با دوزهای ۵ و ۱۰ میکروگرم به صورت ICV منجر به افزایش زمان آغاز تشنجات میوکلونیک و تونیک-کلونیک شد. همچنین تجویز توآمان PNX و موسیمول به عنوان آگونیست گیرنده‌های گابا A بطور

لوتال که سطح پروژسترون در بالاترین میزان قرار دارد، بروز تشنج کمتر است، در حالیکه در طول فاز پیش از قاعدگی که سطح پروژسترون به طور ناگهانی کاهش می‌یابد، احتمال بروز تشنج افزایش می‌یابد (۳۷). همچنین اثرات تشنج‌زا استرادیول نیز می‌تواند باعث افزایش صرع شود، اما در صرع قاعدگی کاهش سریع پروژسترون احتمالاً مهم‌ترین عامل باشد (۱۳). مطالعات پیشین نشان داده است که متابولیت‌های عصبی فعال پروژسترون، یعنی آلپرگنانولون (AP)<sup>۱</sup> و پرگنانولون (PREG)<sup>۲</sup> بر گیرنده‌های گابائوترژیک در مغز تأثیر می‌گذارند (۳۸-۴۰). در انسان و موش صحرایی، غلظت پلاسمایی و مغزی AP با غلظت پروژسترون در طول مراحل قاعدگی در ارتباط است (۳). AP یک تعدیل کننده آلوستریک مثبت گیرنده‌های گابا A است که ورود کلر را در CNS القا می‌کند و بدین طریق از ایجاد پتانسیل‌های عمل جدید عصبی به عنوان یک عامل ضد تشنج جلوگیری می‌نماید (۴۱،۴۲). نقش سیستم گابائوترژیک و به خصوص گیرنده‌های گابا A به این مورد محدود نمی‌شود و PTZ که به طور گسترده و همین‌طور در این مطالعه به منظور القاء صرع کاتامینال کاربرد دارد، اثر خود را از طریق اتصال به گیرنده‌های گابا A و ممانعت از بروز اثرات مهاری سیستم گابائوترژیک در CNS اعمال می‌کند (۱۵،۱۶،۴۳).

فونئکسین به عنوان یک نوروپپتید با اعمال شبه هورمونی می‌تواند با اثرگذاری بر محور HPG و همچنین بیضه و تخمدان فعالیت‌های تولیدمثلی را تنظیم کند. بر اساس نتایج یک مطالعه، سطح هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH)<sup>۳</sup> در هیپوتالاموس گورخرماهی<sup>۴</sup> با تزریق

<sup>۱</sup> Allopregnanolone

<sup>۲</sup> Pregnanolone

<sup>۳</sup> Gonadotropin-releasing hormone

<sup>۴</sup> Zebrafish



### تشکر و قدردانی

نویسندگان از همکاری دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (آزمایشگاه مرکزی دکتر رستگار) و حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران در اجرای این تحقیق قدردانی می‌نمایند.

### تعارض منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

### فهرست منابع

1. Luef G, and Rauchenzauner M. Epilepsy and hormones: a critical review. *Epilepsy & behavior*. 2009; 15(1): 73–77.
2. Doherty MJ, Rostad SW, Kraemer DL, Vossler DG, Haltiner AM. Neocortical gliosis in temporal lobe epilepsy: gender-based differences. *Epilepsia*. 2007; 48(8):1455–1459.
3. Kaboutari J, Zendeheel M, Habibian S, Azimi M, Shaker M, Karimi B. The antiepileptic effect of sodium valproate during different phases of the estrous cycle in PTZ-induced seizures in rats. *Journal of physiology and biochemistry*. 2012; 68(2):155–161.
4. Frank S, Tyson NA. A Clinical Approach to Catamenial Epilepsy: A Review. *The Permanente journal*. 2020; 24: 1–3.
5. Morris GL, Vanderkolk C. Human sexuality, sex hormones, and epilepsy. *Epilepsy & behavior*. 2005; 7: S22–S28.
6. Harden CL. Sexuality in men and women with epilepsy. *CNS spectrums*. 2006; 11: 13–18.

معنی‌داری به تشدید اثر فوئنکسین بر زمان شروع تشنجات میوکلونیک و تونیک - کلونیک (ثانیه) در تمامی فازهای فحلی منجر گشت. بر اساس این مشاهدات محتمل است که اثرات ضد تشنجی PNX از طریق گیرنده‌های گابا A میانجی‌گری می‌شود.

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه، احتمالاً اثرات ضد تشنجی فوئنکسین توسط گیرنده‌های گابا A میانجی‌گری می‌شود.

7. Frye CA. Role of androgens in epilepsy. Expert review of neurotherapeutics. 2006; 6(7): 1061–1075.

8. Reddy DS. Role of neurosteroids in catamenial epilepsy. *Epilepsy research*. 2004; 62(2-3): 99–118.

9. Edwards HE, Burnham WM, Mendonca A, Bowlby DA, MacLusky NJ. Steroid hormones affect limbic afterdischarge thresholds and kindling rates in adult female rats. *Brain research*. 1999; 838(1-2): 136–150.

10. Reddy DS, Castaneda DC, O'Malley BW, Rogawski MA. Anticonvulsant activity of progesterone and neurosteroids in progesterone receptor knockout mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2004; 310(1): 230–239.

11. Sherwin BB. Progestogens used in menopause. Side effects, mood and quality of life. *The Journal of reproductive medicine*. 1999; 44(2): 227–232.

12. Borowicz KK, Czuczwar SJ. Aminoglutethimide but not spironolactone enhances the anticonvulsant effect of some antiepileptics against amygdala-kindled seizures in rats. *Journal of neural transmission*. 2005; 112(7): 891–903.

13. Guille C, Spencer S, Cavus I, Epperson CN. The role of sex steroids in catamenial epilepsy and premenstrual

dysphoric disorder: implications for diagnosis and treatment. *Epilepsy & behavior*. 2008; 13(1): 12–24.

14. Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Konbil E, Neil J (eds) *Physiology of Reproduction*, 2. Raven Press, New York. 1975;613–709.

15. Rattka M, Brandt C, Bankstahl M, Bröer S, Löscher W. Enhanced susceptibility to the GABA antagonist pentylentetrazole during the latent period following a pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Neuropharmacology*. 2011; 60(2-3): 505–512.

16. Zendehdel M, Kaboutari J, Ghadimi D, Hassanpour S. The antiepileptic effect of ghrelin during different phases of the estrous cycle in PTZ-induced seizures in rat. *Int J Pept Res Ther*. 2014; 20: 511–517.

17. Krnjevic K. Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates, *Physiol Rev*. 1974; 54: 418-540.

18. Wood JD. The role of gamma-aminobutyric acid in the mechanism of seizures. *Progress in neurobiology*. 1975; 5(1): 77–95.

19. Meldrum BS. Epilepsy and gamma-aminobutyric acid-mediated inhibition. *International review of neurobiology*. 1975; 17: 1–36.

20. Haefely W, Polc P, Schaffner R, Keller HH, Pieri L, Mohler H. GABA-Neurotransmitters. Krogsgaard-Larsen et al.(eds), Copenhagen. 1979; 357.

21. Yosten GL, Lyu RM, Hsueh AJ, Avsian-Kretchmer O, Chang JK, Tullock CW, Dun SL, Dun N, Samson WK. A novel reproductive peptide, phoenixin. *Journal of neuroendocrinology*. 2013; 25(2): 206–215.

22. Billert M, Rak A, Nowak KW, Skrzypski M. Phoenixin: More than Reproductive Peptide. *International*

*Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(21): 8378.

23. Kalamon N, Błaszczuk K, Szlaga A, Billert M, Skrzypski M, Pawlicki P, Górowska-Wójtowicz E, Kotula-Balak M, Błasiak A, Rak A. Levels of the neuropeptide phoenixin-14 and its receptor GRP173 in the hypothalamus, ovary and periovarian adipose tissue in rat model of polycystic ovary syndrome. *Biochemical and biophysical research communications*. 2020; 528(4): 628–635.

24. Pałasz A, Rojczyk E, Bogus K, Worthington JJ, Wiaderkiewicz R. The novel neuropeptide phoenixin is highly co-expressed with nesfatin-1 in the rat hypothalamus, an immunohistochemical study. *Neuroscience letters*. 2015; 592: 17–21.

25. Schalla MA, Stengel A. Phoenixin-A Pleiotropic Gut-Brain Peptide. *International journal of molecular sciences*. 2018; 19(6): 1726.

26. Stein LM, Tullock CW, Mathews SK, Garcia-Galiano D, Elias CF, Samson WK, Yosten GL. Hypothalamic action of phoenixin to control reproductive hormone secretion in females: importance of the orphan G protein-coupled receptor Gpr173. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2016; 311(3): R489–R496.

27. Amado D, Cavaleiro EA. Hormonal and gestational parameters in female rats submitted to the Pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res*. 1998; 32: 266–274.

28. Zendehdel M, Kaboutari J, Salimi S, Hassanpour S. The Antiepileptic Effect of Carbamazepine during Estrous Cycle in Pentylentetrazol-Induced Seizures in Rat. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2015; 21: 133-138.

29. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th Edition, Academic Press, San Diego. 2007.

30. Azadi A, Zendehtdel M, Kaboutari J, Panahi N, Asghari A. Central Phoenixin Protective Role on Pentylenetetrazol-Induced Seizures during Various Stages of the Estrous Cycle among Rats. *Archives of Razi Institute*. 2022; 77(2): 689–695.
31. Gonsalves SF, Twitchell B, Harbaugh RE, Krogsgaard-Larsen P, Schousboe A. Anticonvulsant activity of intracerebroventricularly administered glial GABA uptake inhibitors and other GABA mimetics in chemical seizure models. *Epilepsy research*. 1989; 4(1): 34–41.
32. Reddy DS. Neuroendocrine aspects of CE. *Epilepsy Behav*. 2013; 63: 254–266.
33. Morrell MJ. Epilepsy in women: the science of why it is special. *Neurology* 1999; 53: 42–48.
34. Nicoletti F, Speciale C, Sortino MA, Summa G, Caruso G, Patti F, Canonico PL. Comparative effects of estradiol benzoate, the antiestrogen clomiphene citrate, and the progestin medroxyprogesterone acetate on kainic acid-induced seizures in male and female rats. *Epilepsia*. 1985; 26(3): 252–257.
35. Wong M, Moss R. Long-te 1 seizure activity in adult female rats. *Soc Neurosci Abstr*. 1998; 24(1): 472–474.
36. Cramer JA, Gordon J, Schachter S, Devinsky O. Women with epilepsy: hormonal issues from menarche through menopause. *Epilepsy & behavior*. 2007; 11(2): 160–178.
37. Backstorm T. Epileptic seizures in women related to plasma estrogen and progesterone during the menstrual cycle. *Acta Neurol Scand*. 1976; 54:149–159.
38. Khoshnood-Mansoorkhani MJ, Moein MR, Oveisi N. Anticonvulsant activity of *Teucrium polium* against seizure induced by PTZ and MES in mice. *Iran J Pharm Res*. 2010; 9(4): 395–401.
39. Herzog AG. Hormonal therapies: progesterone. *Neurotherapeutics*. 2009; 6: 383–391.
40. Reddy DS, Rogawski MA. Neurosteroid replacement therapy for CE. *Neurotherapeutics*. 2009; 6: 392–401.
41. Lambert JJ, Cooper MA, Simmons RD, Weir CJ, Belelli D. Neurosteroids: endogenous allosteric modulators of GABA receptors. *Psychoneuroendocrinol*. 2009; 34(1): 48–58.
42. Lan NC, Chen JS, Belelli D, Pritchett D, Seeburg PH, Gee KW. A steroid recognition site is functionally coupled to an expressed GABA-benzodiazepine receptor. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol Sect*. 1990; 188: 403–406.
43. Samokhina E, Samokhin A. Neuropathological profile of the pentylenetetrazol (PTZ) kindling model. *Int J Neurosci*. 2018; 128(11):1086-96.
44. Rajeswari JJ, Unniappan S. Phoenixin-20 Stimulates mRNAs Encoding Hypothalamo-Pituitary-Gonadal Hormones, is Pro-Vitellogenic, and Promotes Oocyte Maturation in Zebrafish. *Sci Rep*. 2020;10(1): 62-64.



## Central Effects of Phoenixin and Muscimol on Pentylentetrazol-Induced Seizures during Various Stages of the Estrous Cycle among Rats

Aliakbar Azadi<sup>1</sup>, Morteza Zendedel<sup>2</sup>, Jahangir Kaboutari<sup>3</sup>, Negar Panahi<sup>4</sup>, Ahmad Asghari<sup>5</sup>

1- Specialized Ph.D, Department of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Corresponding Author: zendedel@ut.ac.ir

3- Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

4- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

5- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 2023.02.16

Accepted: 2023.03.05

### Abstract

**Background & Aim:** Catamenial epilepsy is a special form of epilepsy in women whom seizure aggravation is arranged with menstrual cycle that may affect up to 70 % of epileptic women. According to earlier studies, the role of neuropeptide Phoenixin (PNX) in the reproductive system has been observed and its antiepileptic effects have been proven. It also appears that the GABAergic system plays an important role in inhibition of seizures. Therefore, the aim of this study was to investigate the central effects of PNX and muscimol (GABA-A receptor agonist) on Pentylentetrazol (PNT)-induced seizures during various stages of the estrous cycle among rats.

**Materials and Methods:** In this study, 120 adult female rats were randomly divided into five groups, including intracerebroventricular (ICV) injection of normal saline, PNX (5 µg), PNX (10 µg), muscimol (0.1 µg)+ PNX (5 µg) and muscimol (0.1 µg)+ PNX (10 µg), in proestrus, estrus, metestrus, and diestrus. After ICV injections, acute epilepsy was induced by intraperitoneal (IP) injection of 80 mg/kg of pentylentetrazole. Initiation time of myoclonic seizures (ITMS) and initiation time of tonic-clonic seizures (ITTS) were monitored and recorded for 30 min.

**Results:** The results of the present study showed that PNX alone increased both ITMS and ITTS in all phases of estrus ( $p < 0.05$ ). Furthermore, the injection of PNX with muscimol significantly reinforced the effects of the PNX on ITMS and ITTS in all estrus stages ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results showed that the antiepileptic activity of PNX was probably mediated by GABA-A receptors.

**Keywords:** Estrus Cycle, Pentylentetrazole, Phoenixin, Muscimol, Rat