



Semnan University of Medical Sciences

# KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

**Volume 20, Issue 3 (Summer 2018), 417-602**

**ISSN: 1608-7046**

**Full text of all articles indexed in:**

*Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase*

---

## اثر تجویز استرادیول و عصاره سویا بر تشنجات کلونیک ناشی از پنتیلین تترازول و تغییرات سطح سرمی متابولیت‌های نیتریک اکساید در موش‌های صحرایی اوارکتومی شده

اژدر حیدری<sup>۱</sup> (Ph.D)، غلامعلی حمیدی<sup>۱</sup> (Ph.D)، محمود سلامی<sup>۱</sup> (Ph.D)، الهه اربابی<sup>۱</sup> (M.Sc)، سمانه سادات علوی<sup>۱</sup> (M.Sc)، مهسا هادی‌زاده<sup>۱</sup> (M.Sc)، نسترن افسرده<sup>۲</sup> (M.Sc)

۱- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۲- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ابرام، ابرام، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۲

• نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۴۵۱۱۴۳ - afsordehn@gmail.com

### چکیده

هدف: استروژن بر فعالیت نرونی تاثیرگذار است و گزارشات متناقضی در مورد نقش آن در تشنج وجود دارد. هم‌چنین مطالعات قبلی نشان داده‌اند که استروژن بر مسیر نیتریک اکساید در سیستم عصبی تاثیرگذار است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر تجویز استرادیول و عصاره سویا به عنوان یک فیتواستروژن گیاهی بر تشنجات کلونیک ناشی از پنتیلین تترازول و تغییرات سطح سرمی متابولیت‌های نیتریک اکساید در موش‌های صحرایی ماده اوارکتومی شده بود. مواد و روش‌ها: ۶۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار به صورت تصادفی به شش گروه شامل کنترل، شاهد کنترل، اوارکتومی، حامل دارو، استرادیول (۱۰۰  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ، زیر جلدی) و عصاره سویا (۲۰  $\text{mg}/\text{kg}$ ، گاواژ) تقسیم‌بندی شدند. پس از ۲۸ روز تجویز استرادیول یا عصاره سویا، تک دوز پنتیلین تترازول (۹۰  $\text{mg}/\text{kg}$ ، داخل صفاقی) جهت القاء تشنج تزریق شد و زمان تاخیر تا مشاهده تشنجات کلونیک ثبت شد. سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید با استفاده از روش گریس اندازه‌گیری شد. یافته‌ها: اوارکتومی به صورت معنی‌داری موجب کاهش زمان رسیدن به تشنجات کلونیک و سطح سرمی متابولیت‌های نیتریک اکساید شد. تجویز استرادیول به مدت ۲۸ روز به صورت معنی‌داری زمان رسیدن به تشنجات کلونیک و سطح سرمی متابولیت‌های نیتریک اکساید را افزایش داد ( $P < 0/05$ )، تجویز سویا بر این پارامترها تاثیر معنی‌داری نداشت. نتیجه‌گیری: هورمون‌های تخمدان بر تشنج و مسیر نیتریک اکساید تاثیر دارند و اثر ضد تشنج استرادیول تا حدی به واسطه تعدیل مسیر نیتریک اکساید است.

واژه‌های کلیدی: تشنج، سویا، استرادیول، نیتریک اکساید، پنتیلین تترازول، اوارکتومی

### مقدمه

ضد تشنجی آن احتمال وقوع تشنج بیش‌تر است، این نسبت در روزهای قبل از تخمک‌گذاری و خونریزی کاهش و در روزهای اول و میانه فاز لوتئال افزایش می‌یابد [۳]. استروژن عموماً بر دو گیرنده داخل سلولی  $\alpha$  و  $\beta$ های اثر می‌گذارد که در مغز و مناطق مختلف بدن توزیع می‌شوند [۸]. عمل‌کرد ضد تشنجی استروژن با اثر روی گیرنده‌های  $\beta$  رخ می‌دهد [۹]. آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) با تاثیر بر ال\_ آرژنین موجب تولید سیتروکالین و نیتریک اکساید NO می‌شود [۱۰]. نیتریک اکساید یک مولکول گازی شکل کوچک است و قابل عبور از غشاهای سلولی پستانداران است [۱۱]. NO نیمه عمر کوتاه دارد و چون از نظر شیمیایی عاملی بسیار واکنش‌پذیر

صرح ممکن است در دوره‌های خاصی از سیکل جنسی شدیدتر شود [۱]. یعنی که فرکانس و شدت تشنج می‌تواند با تغییر در ترشح هورمون‌های جنسی تغییر کند [۲] از دهه‌ها قبل این باور شکل گرفته، که ارتباط مستقیمی بین سطح استروژن و تشنج وجود دارد [۳]. هم‌چنین استروژن می‌تواند بر تنظیم تحریک نورونی اثر داشته باشد [۴]. از عمل‌کردهای استروژن می‌توان به نقش آنتی‌اکسیدانی آن در مغز اشاره کرد [۵]. اگر چه مطالعات هر دو اثر تشنج‌زایی [۶] و ضد تشنجی [۷] را برای استروژن پیشنهاد داده‌اند. در فاز تخمک‌گذاری به علت کاهش نسبت پروژسترون به استروژن و کاهش اثرات

گاوژ دریافت کرد (SOY). بعد از انجام جراحی اوارکتومی و طی شدن دو روز [۲۰] ریکاوری، در گروه‌های ۴ تا ۶ تجویز داروها به مدت ۲۸ روز انجام گرفت. جهت خونگیری از موش‌های صحرایی و اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک اکساید، ۲۱ روز بعد از شروع درمان با استفاده از میکروپیست به طور میانگین ۱ تا ۱/۵ میلی‌لیتر خون از گوشه داخلی چشم حیوان گرفته شد، پلاسما از سلول‌های خونی جدا و سرم تا زمان اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک اکساید در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ۲۸ روز بعد از پیش‌درمانی با استرادیول و عصاره سویا به منظور القا تشنج در موش‌های صحرایی ماده از میزان ۹۰ mg/kg به شکل تزریق داخل صفاقی بهره گرفته شد.

#### روش تهیه عصاره

برای تهیه عصاره مقدار ۱۰۰ گرم پودر دانه سویا گونه (Glycine max) از شرکت دارویی باریج اسانس تهیه شد، در ۸۰۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد حل شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از ۷۲ ساعت به وسیله قیف دستگاه، عصاره قطره قطره جدا گردید. جهت خشک کردن عصاره، ماده تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت در دسیکاتور قرار داده شد تا به وسیله پمپ خلأ، آب، الکل و مواد اضافی دیگر تبخیر شود. برای تهیه دارو، مقدار مشخصی از پودر برداشته شده و در آب مقطر حل شد تا دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به دست آید [۲۱].

#### اوارکتومی

جهت اوارکتومی، موش‌ها با ۱۰۰ mg/kg کتامین و ۱۰ mg/kg زایلازین بی‌هوش شده دست‌ها و پاهای حیوان فیکس شد، موهای ناحیه بین دو کشاله ران در خط وسط و روی مثانه شیو شده و پس از ضد عفونی کردن پوست توسط بتادین یک برش یک سانتی‌متری طولی روی پوست ایجاد گردید بعد از شناسایی تخمدان‌ها، جدا کردن تخمدان‌ها از بافت اطراف و برگرداندن رحم به داخل شکم، عضلات به وسیله نخ بخیه قابل جذب کرومیک و پوست توسط نخ بخیه غیر قابل جذب ناپلون بخیه زده شد و حیوان به قفس برگردانده شد. در گروه SHAM تنها برش طولی در ناحیه بین دو کشاله ران ایجاد شد و تخمدان‌ها خارج نگردید.

#### اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک اکساید

از روش Miranda و همکاران برای احیاء نیترات به نیتريت با استفاده از وانادیم کلراید (VCl3) و متعاقب آن سنجش نیتريت کل با استفاده از معرف گریس به روش طیف‌سنجی استفاده گردید. با استفاده از الایزا ریدر جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. هر نمونه از بلانک

است، علاوه بر نقش‌های متعدد در بدن می‌تواند به عنوان یک نوروترانسمیتر نیز فعال باشد [۱۲]. عمل‌کرد آن در بافت‌های محیطی و عصبی تحت تاثیر هورمون استروژن نیز قرار می‌گیرد. استروژن‌تراپی در زنان یائسه مبتلا به افسردگی با افزایش سطح پلاسمای متابولیت‌های NO اثرات مفیدی در بهبود افسردگی دارد [۱۳] اما عمل‌کرد NO در ایجاد یا مهار تشنج به طور کامل روشن نیست در بعضی مطالعات NO نقش تشنج‌زا و در دیگر مطالعات عمل‌کرد ضد تشنج دارد [۱۴]. سویا یک منبع غنی از فیتواستروژن‌ها، به عنوان منبع غذایی در آسیا استفاده می‌شود [۱۵]. فیتواستروژن‌ها ترکیبات استروئیدی گیاهی هستند که شامل ایزوفلاون‌ها، لیگنان‌ها و کومستان‌ها می‌شوند [۱۶]. ایزوفلاون‌ها ساختاری شبیه استروژن‌های درون‌زاد دارند با گیرنده‌ای استروژن باند می‌شوند و اثر محافظت نورونی مانند استروژن دارند [۱۷]. همان‌طور که پیش توضیح داده شده با توجه به این‌که، یکی از مسیرهای واسطه‌ای عمل‌کرد استروژن در بدن موجودات زنده از طریق نیتریک اکساید می‌باشد و از طرفی در مطالعات مختلف استروژن دارای نقش‌های دو گانه تشنج‌زایی و ضد تشنجی نشان داده شده است. هدف از این مطالعه برای اولین بار بررسی این سوال است که آیا عمل‌کرد استرادیول و سویا (به عنوان یک استروژن گیاهی) در بروز تشنج کلونیک در موش‌های ماده اوارکتومی شده با تغییر در سطح نیتریک اکساید سرم مرتبط می‌باشد یا خیر؟.

#### مواد و روش‌ها

جهت انجام این مطالعه آزمایشگاهی، موش‌های صحرایی ماده از نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۲۰-۱۷۰ گرم انتخاب شدند. حیوانات در شرایط مناسب حیوان‌خانه مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان و شرایط استاندارد ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی با دسترسی آسان به آب و غذا قرار داده و از بدو تولد جدا از حیوانات نر نگهداری شدند و به طور تصادفی در شش گروه (n=۱۰) تقسیم‌بندی شدند. شامل: ۱. گروه کنترل دست‌نخورده، موش‌های صحرایی ماده که فقط تست تشنج روی آن‌ها انجام شد (CON)، ۲. گروهی که جراحی شدند ولی تخمدان‌ها خارج نشد (SHAM)، ۳. گروهی که جراحی شدند و تخمدان‌ها خارج گردید، اوارکتومی شده (OVX)، ۴. گروه اوارکتومی شده‌ای که حامل Sesame oil را دریافت کرد (VEH)، ۵. گروه اوارکتومی شده‌ای که ۱۰۰ μg/kg استرادیول [۱۸] را به صورت زیر جلدی دریافت کرد (EST)، ۶. گروه اوارکتومی شده‌ای که ۲۰ mg/kg عصاره آبی-الکلی سویا [۱۹] را به صورت

متغیر وابسته) از تحلیل واریانس دو طرفه (تحلیل دوعاملی) و متعاقب آن از آزمون توکی جهت مقایسه‌ی گروه‌های پژوهش استفاده شد. سطح  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

جدول ۱ نشان می‌دهد اولاً، همگنی واریانس‌ها در گروه‌های جراحی بر حسب آستانه تشنج و میزان متابولیت‌ها مورد تایید است زیرا بر اساس مقدار آماره آزمون لوین (F) مقادیر خطای آزمون کم‌تر از سطح معنی‌داری ۰/۰۵ بوده است. ثانیاً، مقادیر ضریب تعیین مدل نشان می‌دهد که ۶۷/۱ درصد تغییرات آستانه تشنج و ۶۱/۳٪ متابولیت‌ها توسط نوع جراحی و تجویز/عدم تجویز دارو بیان می‌شود که مقادیر قابل توجه‌ای می‌باشند. ثالثاً، نتایج آزمون تحلیل واریانس دو طرفه (مدل تحلیل دوعاملی) نشان می‌دهد که اثرات نوع جراحی و تجویز/عدم تجویز دارو و اثر متقابل نوع جراحی و تجویز/عدم تجویز دارو روی آستانه تشنج و متابولیت‌ها معنادار است زیرا دارای مقادیر خطای آزمون کم‌تر از سطح معنی‌داری ۰/۰۵ بود.

خود کم شده و رگرسیون خطی میانگین مقادیر برای تعیین متابولیت‌های نیتریک اکساید استفاده شد [۲۲].

## مطالعه رفتاری

۲۸ بعد از پیش‌درمانی با استرادیول و عصاره سویا جهت القای تشنج، داروی پنتیلن تترازول از شرکت سیگما آلدریج (ایالات متحده آمریکا) خریداری و در نرمال سالین استریل ۰/۹٪ حل شد. به منظور القا تشنج در موش‌های صحرایی ماده از میزان ۹۰ mg/kg به شکل تزریق داخل صفاقی بهره گرفته شد. رفتار حیوان طی ۳۰ دقیقه بعد از تزریق پنتیلن تترازول در یک قفس Plexiglas زیر نظر گرفته شد و پاسخ‌های تشنجی حیوان به صورت کشش میوکلونیک (myoclonic twitch)، تشنج کلونیک (clonic seizures)، توسعه تونیک اندام حرکتی تحتانی (tonic hindlimb extension) و مرگ (death) طبقه‌بندی شد [۲۳]. اگرچه همه این مراحل مشاهده و با استفاده از کرنومتر بر حسب ثانیه ثبت شد، تنها آستانه تشنج در مرحله کلونیک جهت مطالعه مورد مقایسه قرار گرفت.

## تجزیه و تحلیل آماری

جهت تحلیل اثرات تجویز/عدم تجویز دارو و نوع جراحی (به عنوان متغیرهای مستقل) روی آستانه تشنج و متابولیت‌ها

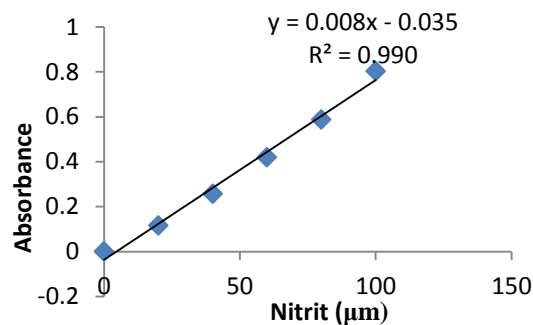
جدول ۱. نتایج آزمون همگنی واریانس‌ها (آزمون لوین) و تحلیل واریانس دو طرفه جهت تعیین اثرات تجویز دارو و نوع جراحی روی آستانه تشنج و متابولیت‌ها

نتایج آزمون همگنی واریانس‌ها در گروه‌ها (آزمون لوین)					
متغیر وابسته	درجه آزادی اول	درجه آزادی دوم	آماره آزمون F	Sig.	ضریب تعیین
آستانه تشنج	۴	۴۵	۰/۷۶۹	۰/۵۵۱	۰/۶۷۱
متابولیت‌ها	۴	۲۵	۰/۶۹۲	۰/۵۹۷	۰/۶۱۳
نتایج آزمون تحلیل واریانس دو طرفه (مدل تحلیل دوعاملی)					
متغیر وابسته	آماره آزمون F		Sig.		اثرات مربع آنا جزئی
	آستانه تشنج	متابولیت‌ها	آستانه تشنج	متابولیت‌ها	آستانه تشنج
منبع تغییرات					متابولیت‌ها
مدل اصلاح شده	۷/۹۹۵	۶/۳۵۷	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۵۰۴
ثابت	۴۰۱۶/۷۸۵	۱۸۷/۶۴	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۸۸۲
تجویز دارو	۷۴۶/۱	۲/۵۴۱	۰/۰۱۱	۰/۰۱۶	۰/۳۱۳
نوع جراحی	۱۰/۶۶۰	۸/۲۰۶	۰/۰۰۹	۰/۰۰۸	۰/۴۹۶
اثر متقابل تجویز دارو و نوع جراحی	۰/۱۱۶	۰/۲۵۸	۰/۰۲۱	۰/۰۲۴	۰/۲۹۶

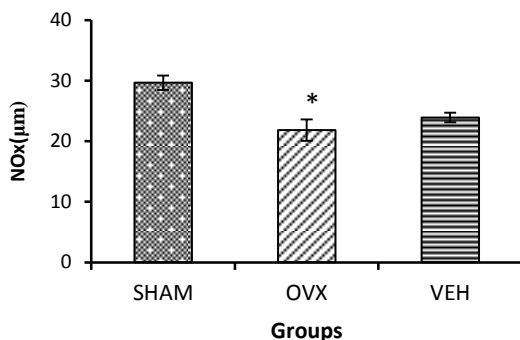
معنی‌داری نداشته، ( $P=0.16$ ) که نشان می‌دهد؛ جراحی اثری بر آستانه بروز تشنج کلونیک ندارد. در حالی که این تغییرات در گروهی که تخمدان‌ها خارج و استروژن حذف شده بود OVX به صورت معنی‌داری کم‌تر از گروه SHAM بود ( $P=0.002$ ). همچنین آستانه تشنج در گروه دریافت‌کننده

داده‌های حاصل از زمان شروع تشنج در گروه‌های کنترل، شم و اوارکتومی نشان داد که بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. ( $F_{3,36}=16/807, P<0.05$ ) همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، میانگین زمانی شروع تشنج یا آستانه تشنج در گروه SHAM نسبت به کنترل دست‌نخورده CON تغییر

شکل ۴ سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید (نیتريت) سرم در گروه SHAM به صورت معنی‌داری بیشتر از گروه OVX بوده، که نشان می‌دهد برداشتن تخمدان‌ها و حذف استروژن سطح نیتريت سرم را کاهش داده است ( $P=0/011$ ). در حالی که در گروه VEH نسبت به گروه OVX سطح نیتريت سرم تغییر معنی‌داری نداشت ( $P=0/057$ ), که نشان می‌دهد حامل تأثیری بر سطح نیتريت سرم نداشته است.



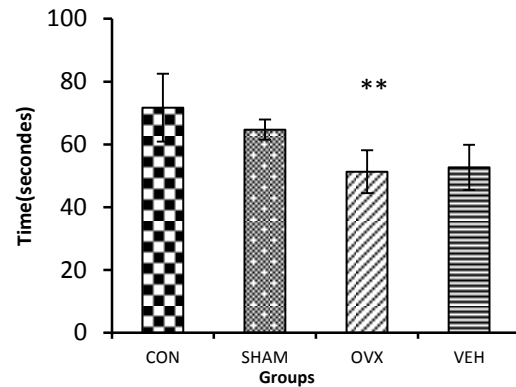
شکل ۳. منحنی استاندارد جذب نوری غلظت‌های مختلف نیتريت و رگرسیون خطی میانگین مقادیر برای تعیین متابولیت‌های نیتريت اکساید



شکل ۴. سطح سرمی متابولیت‌های نیتريت اکساید در گروه SHAM و اوارکتومی OVX و حامل VEH بر حسب میکرومول.  $*P<0.05$  (مقایسه با گروه SHAM)  $n = 6$ , Mean  $\pm$  S.E.M

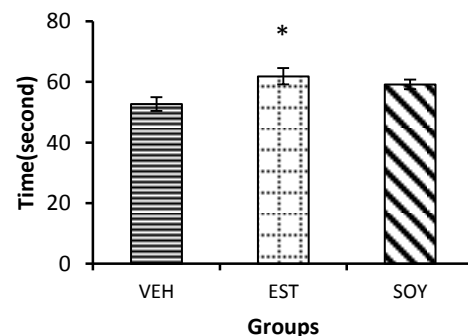
هم‌چنین داده‌های حاصل از اندازه‌گیری سطح متابولیت گروه‌های دریافت‌کننده استرادیول و عصاره سویا نسبت به گروه حامل نشان داد که بین این گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $F_{2,15}=7/444$ ,  $P<0/05$ ) نتایج حاصل از تجویز استرادیول در شکل ۵ نشان می‌دهد که سطح نیتريت سرم به صورت معنی‌داری بیشتر از گروه حامل بود ( $P=0/034$ ) اما این تغییرات در گروهی که عصاره سویا دریافت کرده بود، نسبت به گروه حامل تغییر معنی‌داری نداشت ( $P=0/053$ ).

روغن کنجد نسبت به گروه اوارکتومی معنی‌دار نبود، ( $P=0/97$ ) که نشان می‌دهد حامل تأثیری بر آستانه بروز تشنج کلونیک نداشته است.



شکل ۱. میانگین زمانی آستانه تشنج کلونیک گروه‌های کنترل دست نخورده (CON)، شم (SHAM)، اوارکتومی (OVX) و حامل (VEH) بر حسب ثانیه.  $**P<0.001$  (مقایسه با گروه شم و Mean  $n=10$   $\pm$  S.E.M

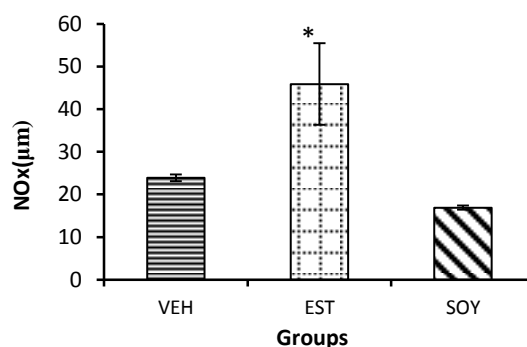
آزمایش داده‌های حاصل از تست تشنج در گروه‌های دریافت‌کننده استرادیول و عصاره سویا اختلاف معنی‌داری را نشان می‌داد ( $F_{2,27}=4/518$ ,  $P<0/05$ ). بر اساس شکل ۲ آستانه بروز تشنج کلونیک در گروه دریافت‌کننده استرادیول به صورت معنی‌داری بیشتر از گروه حامل بود ( $P=0/018$ ), در حالی که در گروه دریافت‌کننده عصاره سویا، آستانه تشنج نسبت به گروه حامل تغییر معنی‌داری نداشته است. ( $P=0/116$ )



شکل ۲. میانگین آستانه تشنج کلونیک گروه‌های حامل VEH، استرادیول EST و عصاره سویا SOY بر حسب ثانیه.  $*P<0.05$  (مقایسه با گروه VEH)  $n = 10$ , Mean  $\pm$  S.E.M

بعد از رسم منحنی استاندارد جذب نوری نیتريت همانند شکل ۳ سپس اختلاف بین گروه‌های شم، اوارکتومی و حامل از نظر سطح متابولیت‌های نیتريت اکساید در خون از نظر آماری معنی‌دار بود ( $F_{2,15}=6/059$ ,  $P<0/05$ ). با توجه به

حاصل از آزمایشات ما هم‌خوانی دارد. این در حالی است که صادقیان و همکاران نشان دادند که غلظت متابولیت‌های NO در سرم و بافت ناحیه هیپوکامپ در هر سه گروه حیوان‌های که تخمدان آن‌ها خارج شده است و گروه‌های اوارکتومی شده و شم که تحت درمان با ۴mg/kg استرادیول والرات بوده‌اند کم‌تر از گروه شم بوده است [۳۳]. گزارش‌ها حاکی از این است که استروژن باعث بیان nNOS و eNOS در مناطقی از مغز از جمله هیپوکامپ می‌شود [۳۴]. در رابطه با مکانیسم‌های احتمالی استروژن بر افزایش سطح نیتریک اکساید دو نظریه متفاوت مطرح است، اول این‌که استروژن بیان nNOS را از طریق گیرنده‌های  $\beta$  ایجاد می‌کند [۳۵] و درمان طولانی‌مدت با استرادیول در موش‌های ماده اوارکتومی شده باعث افزایش بیان nNOS در هیپوتالاموس و هیپوکامپ می‌شود [۳۴]. در حالی که نتایج تحقیقات دیگر نشان می‌دهد که استروژن بر روی رسپتورهای  $\alpha$ ، عمل کرده و منجر به S-nitrosylation در اندوتلیوم می‌شود و در نهایت استروژن از راه رسپتورهای  $\alpha$  و عمل‌کرد ایزوفرم eNOS نیتریک اکساید اندوتلیالی تولید می‌کند [۳۶]. در هر حال افزایش تولید NO از هر مسیری که باشد ممکن است به اثرات محافظتی استروژن کمک کند [۳۷]. هم‌چنین با وجود شباهت بین نقش GABA و NO در کاهش تحریک‌پذیری کلی نوروها و عمل‌کرد سینرژیک در محافظت نورونی [۳۸،۳۷]. این احتمال وجود دارد که استرادیول با افزایش نیتريت سرم و شباهت عمل‌کردی که با میانجی GABA دارد نقش ضد تشنجی داشته باشد [۳۹]. از سوی دیگر نتایج مطالعه ما نشان داد که دریافت عصاره آبی الکی سویا به عنوان یک استروژن گیاهی شناخته شده موجب افزایش مختصری در آستانه بروز تشنج شد. که البته از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. که می‌توان گفت تا حدودی هم‌راستا با نتایج مطالعات قبلی مبنی بر افزایش مختصری در شدت تشنجات در موش‌های ماده دریافت‌کننده سویا بوده است [۴۰]. در حالی که ابراهیم‌زاده و همکاران نشان دادند هر دو دوز ۲۰mg/kg و ۶۰ عصاره سویا نمرات تشنج در موش‌های اوارکتومی شده را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد [۴۱]. در توجیه علت اختلاف، این احتمال وجود دارد که نسبت ایزوفلاون‌های سویا در تعیین گرایش به تشنج موثر است [۴۰]. ایزوفلاون‌های سویا شامل دیادزئین و جنیستئین هستند که توسط باکتری‌های روده به A-equol متابولیزه می‌شوند و از جایی که دیادزئین نسبت به جنیستئین میل بیش‌تری برای اتصال به گیرنده‌های استروژن دارد و به همین دلیل اثر قوی‌تری نسبت به سویا در افزایش شدت تشنج دارد [۴۲]. در حالی که جنیستئین یا ترکیبی از جنیستئین و دیادزئین، AGS



شکل ۵. سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید گروه‌های حامل VEH، استرادیول EST و عصاره سویا SOY بر حسب میکرومول (مقایسه با گروه VEH)  $n = 6$ , Mean  $\pm$  S.E.M  $P < 0.05$ \*

### بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر بیانگر آن است که، برداشتن تخمدان‌ها به صورت دو طرفه منجر به تغییر آستانه تشنج می‌شود و تجویز مزمن استرادیول آستانه تشنج را به تاخیر می‌اندازد. این نتایج در تائید مطالعاتی است که نشان می‌دهند که استروژن دارای اثر ضد تشنجی است این اثرات به نظر می‌رسد که وابسته به دوز باشد. به عنوان مثال تجویز مزمن استرادیول در دوزهای ۱۰-۲۰  $\mu\text{g/kg}$  باعث افزایش آستانه تشنج کلونیک و کاهش مرگ و میر می‌شود [۲۴]. احتمالاً اثرات ضد تشنجی استروژن وابسته طول دوره مصرف باشد زیرا تحقیقات نشان داده‌اند که تجویز مزمن  $\beta$  استرادیول نسبت تجویز حاد آن در روز انجام تست تشنج موثرتر است [۲۵] و تجویز مداوم و پیوسته استروژن از کپسول‌های زیر پوستی در موش‌های ماده دوره تشنج ناشی از اسید کاینیک افزایش داده است [۲۶]. در حالی که درمان حاد با استروژن اثر تشنج‌زایی دارد [۲۸،۲۷]. مطالعات نشان داده است که استروژن دارای اثرات محافظت نورونی در برابر آسیب‌های عصبی القاشده توسط تشنج است [۲۴]. اثرات مختلف استروژن بر تشنج بستگی به عوامل مختلفی مانند طول مدت درمان، روش تجویز، مدل تشنج، منطقه سیستم عصبی یا نوروترانسمیتر درگیر در آن باشد [۲۹]. علاوه بر این یافته‌های ما نشان داد، که اوارکتومی سطح متابولیت‌های نیتریک اکساید سرم را کاهش می‌دهد. که با نتایج برخی از مطالعات قبلی که حاکی از کاهش تعداد نوروها بیان‌کننده nNOS در مناطقی CA1، CA3، DG هیپوکامپ در اثر برداشتن تخمدان‌ها می‌شود هم‌خوانی دارد [۳۰]. در مطالعه حاضر درمان با استرادیول سطح نیتريت سرم را افزایش داد. مطالعات دیگر نیز افزایش سنتز NO سلول‌های اندوتلیال را بعد از کاربرد غلظت‌های فیزیولوژیک استروژن را نشان می‌دهد [۳۱،۳۲]، که با نتایج

Aging Workshop (STRAW) Park City, Utah, July, 2001. Menopause 2001; 8: 402-407.

[5] Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. Mol Pharmacol 1997; 51: 535-541.

[6] Harden CL, Pulver MC, Ravdin L, Jacobs AR. The effect of menopause and perimenopause on the course of epilepsy. Epilepsia 1999; 40: 1402-1407.

[7] Veliskova J, Velisek L, Galanopoulou AS, Sperber EF. Neuroprotective effects of estrogens on hippocampal cells in adult female rats after status epilepticus. Epilepsia 2000; 41: S30-35.

[8] Shughrue PJ, Scrimo PJ, Merchenthaler I. Evidence for the colocalization of estrogen receptor-beta mRNA and estrogen receptor-alpha immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. Endocrinology 1998; 139: 5267-5270.

[9] Frye CA, Ryan A, Rhodes M. Antiseizure effects of 3alpha-androstanediol and/or 17beta-estradiol may involve actions at estrogen receptor beta. Epilepsy Behav 2009; 16: 418-422.

[10] Snyder SH. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. Science 1992; 257: 494-496.

[11] Raevskii KS, Bashkatova VG, Vanin AF. [The role of nitric oxide in brain glutaminergic pathology]. Vestn Ross Akad Med Nauk 2000; 4: 11-15.

[12] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991; 43: 109-142.

[13] Lopez-Jaramillo P, Teran E. Improvement in functions of the central nervous system by estrogen replacement therapy might be related with an increased nitric oxide production. Endothelium 1999; 6: 263-266.

[14] Takemiya T, Suzuki K, Sugiura H, Yasuda S, Yamagata K, Kawakami Y, Maru E. Inducible brain COX-2 facilitates the recurrence of hippocampal seizures in mouse rapid kindling. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2003; 71: 205-216.

[15] Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1999; 85: 47-51.

[16] Bedell S, Nachtigall M, Naftolin F. The pros and cons of plant estrogens for menopause. J Steroid Biochem Mol Biol 2014; 139: 225-236.

[17] Villaseca P. Non-estrogen conventional and phytochemical treatments for vasomotor symptoms: what needs to be known for practice. Climacteric 2012; 15: 115-124.

[18] Andersen HL, Weis JU, Fjalland B, Korsgaard N. Effect of acute and long-term treatment with 17-beta-estradiol on the vasomotor responses in the rat aorta. Br J Pharmacol 1999; 126: 159-168.

[19] Azcoitia I, Moreno A, Carrero P, Palacios S, Garcia-Segura LM. Neuroprotective effects of soy phytoestrogens in the rat brain. Gynecol Endocrinol 2006; 22: 63-69.

[20] Xu J, Zhu J, Shi C, Guo K, Yew DT. Effects of genistein on hippocampal neurodegeneration of ovariectomized rats. J Mol Neurosci 2007; 31: 101-112.

[21] Parvin Jahromi SH, Mahjoor AA, Ahsan nia N, Safarpour D. Histopathological and stereological studies of soybean hydroalcoholic extract effects on the rat ovary. Iranian South Med J 2012; 15: 161-170. (Persian).

[22] Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide 2001; 5: 62-71.

[23] Mohammadpour T, Hosseini M, Karami R, Sadeghnia HR, Ebrahimzadeh Bideskan AR, Enayatifard L. Estrogen-dependent effect of soy extract on pentylene-tetrazole-induced seizures in rats. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao 2012; 10: 1470-1476.

[24] Hoffman GE, Moore N, Fiskum G, Murphy AZ. Ovarian steroid modulation of seizure severity and hippocampal cell death after kainic acid treatment. Exp Neurol 2003; 182: 124-134.

[25] Veliskova J, Velisek L. Beta-estradiol increases dentate gyrus inhibition in female rats via augmentation of hilar neuropeptide Y. J Neurosci 2007; 27: 6054-6063.

[26] Schauwecker PE, Wood RI, Lorenzana A. Neuroprotection against excitotoxic brain injury in mice after ovarian steroid depletion. Brain Res 2009; 1265: 37-46.

[27] Edwards HE, Burnham WM, Mendonca A, Bowlby DA, MacLusky NJ. Steroid hormones affect limbic afterdischarge thresholds and kindling rates in adult female rats. Brain Res 1999; 838: 136-150.

و مرگ و میر را تغییر نمی دهد که نشان می دهد که جنسیتین ممکن با اثرات تشنج زایی دیادزین مقابله کند [۴۰]. نتایج یافته های مطالعه حاضر نشان داد که تجویز کم تر از یک ماه عصاره سویا منجر به افزایش مختصری در سطح نیتريت سرم شد. با این وجود تحقیقات دیگر نشان داده اند که مصرف ۹۰ روز سویا موجب افزایش معنی دار در سطح متابولیت های NO در سرم زنان می شود [۴۳]. از طرفی گزارشات دیگر نشان داده اند تجویز پروتئین سویا منجر به کاهش نیتريك اكساید كلبيوی در رت می شود [۴۴]. وجود دارد این فرضیه که حضور مقدار نسبتاً بالای از پیش سازهای نیتريك اكساید (آرژنین) در اسیدآمینهای پروتئین سویا می تواند توجیه کننده تولید NO با مصرف سویا باشد [۴۵]. از آن جایی که مطالعه ای مبنی بر میزان تولید نیتريك اكساید توسط سویا بر فعالیت تشنجی ثبت نشده است، و با توجه به نتایج حاصل از مطالعاتی که ذکر شد احتمال می رود دوز عصاره سویا و دوره زمانی مصرف، بر میزان سطح متابولیت های نیتريك اكساید تولیدی تاثیرگذار باشد. همچنین جهت توجیه این اختلاف بین نتایج حاصل از نقش سویا بر آستانه تشنج در مطالعه ما و دیگر محققان احتمالاً تنوع در گونه های مختلف سویا و متعاقب آن تفاوت در میزان ماده موثره جنیستین و دیادزین نیز مطرح است.

در مطالعه حاضر تجویز مزمن استرادیول منجر به افزایش آستانه بروز تشنج ناشی از پنتیلین تترازول شد، که هم راستا با افزایش سطح نیتريت سرم در این گروه بود. در حالی که این تغییرات اثر معنی داری در گروه دریافت کننده عصاره سویا ایجاد نکرد. به نظر می رسد یکی از مکانیسم های احتمالی ضد تشنجی استرادیول افزایش سطح متابولیت های نیتريك اكساید سرم باشد، که البته نیاز به تحقیقات تکمیلی در این زمینه وجود دارد.

## تشکر و قدردانی

با سپاس فراوان از آقای دکتر اصغر قاسمی و آقای دکتر جدی (مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران) به خاطر همکاری و راهنمایی های ارزنده شان در انجام این طرح.

## منابع

- [1] Veliskova J, De Jesus G, Kaur R, Velisek L. Females, their estrogens, and seizures. Epilepsia 2010; 51: 141-144.
- [2] Reddy DS. The role of neurosteroids in the pathophysiology and treatment of catamenial epilepsy. Epilepsy Res 2009; 85: 1-30.
- [3] Backstrom T. Epileptic seizures in women related to plasma estrogen and progesterone during the menstrual cycle. Acta Neurol Scand 1976; 54: 321-347.
- [4] Soules MR, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W, Woods N. Executive summary: Stages of Reproductive

synaptic depression in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 1994; 6: 1528-1535.

[38] Lovick TA, Key BJ. Inhibitory effect of nitric oxide on neuronal activity in the periaqueductal grey matter of the rat. *Exp Brain Res* 1996; 108: 382-388.

[39] Chakraborti A, Gulati K, Ray A. Possible role of nitric oxide (NO) in the regulation of gender related differences in stress induced angiogenesis in rats. *Nitric Oxide* 2014; 43: 74-80.

[40] Westmark CJ. A hypothesis regarding the molecular mechanism underlying dietary soy-induced effects on seizure propensity. *Front Neurol* 2014; 5: 169.

[41] Ebrahimzadeh Bideskan AR, Hosseini M, Mohammadpour T, Karami R, Khodamoradi M, Nemat Karimooy H, Alavi H. Effects of soy extract on pentylentetrazol-induced seizures in ovariectomized rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2011; 9: 611-618.

[42] Westmark CJ, Westmark PR, Malter JS. Soy-based diet exacerbates seizures in mouse models of neurological disease. *J Alzheimers Dis* 2013; 33: 797-805.

[43] Simao AN, Lozovoy MA, Bahls LD, Morimoto HK, Simao TN, Matsuo T, Dichi I. Blood pressure decrease with ingestion of a soya product (kinako) or fish oil in women with the metabolic syndrome: role of adiponectin and nitric oxide. *Br J Nutr* 2012; 108: 1435-1442.

[44] Lo HC, Wang YH, Chiou HY, Lai SH, Yang Y. Relative efficacy of casein or soya protein combined with palm or safflower-seed oil on hyperuricaemia in rats. *Br J Nutr* 2010; 104: 67-75.

[45] Erdman JW, Jr. AHA Science Advisory: Soy protein and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the AHA. *Circulation* 2000; 102: 2555-2559.

[28] Hom AC, Buterbaugh GG. Estrogen alters the acquisition of seizures kindled by repeated amygdala stimulation or pentylentetrazol administration in ovariectomized female rats. *Epilepsia* 1986; 27: 103-108.

[29] Veliskova J. Estrogens and epilepsy: why are we so excited? *Neuroscientist* 2007; 13: 77-88.

[30] Cai ZL, Wang CY, Gu XY, Wang NJ, Wang JJ, Liu WX, et al. Tenuigenin ameliorates learning and memory impairments induced by ovariectomy. *Physiol Behav* 2013; 118: 112-117.

[31] Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Circ Res* 1997; 81: 885-892.

[32] Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 1995; 360: 291-293.

[33] Sadeghian R, Fereidoni M, Soukhtanloo M, Azizi-Malekabadi H, Hosseini M. Decreased nitric oxide levels in the hippocampus may play a role in learning and memory deficits in ovariectomized rats treated by a high dose of estradiol. *Arq Neuropsiquiatr* 2012; 70: 874-879.

[34] Grohe C, Kann S, Fink L, Djoufack PC, Paehr M, van Eickels M, et al. 17 Beta-estradiol regulates nNOS and eNOS activity in the hippocampus. *Neuroreport* 2004; 15: 89-93.

[35] Hu Y, Wu DL, Luo CX, Zhu LJ, Zhang J, Wu HY, Zhu DY. Hippocampal nitric oxide contributes to sex difference in affective behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 14224-14229.

[36] Chakrabarti S, Lekontseva O, Peters A, Davidge ST. 17beta-Estradiol induces protein S-nitrosylation in the endothelium. *Cardiovasc Res* 2010; 85: 796-805.

[37] Boulton CL, Irving AJ, Southam E, Potier B, Garthwaite J, Collingridge GL. The nitric oxide--cyclic GMP pathway and



## Effect of estradiol and soy extract administration on pentylenetetrazole induced clonic seizures and serum levels of nitric oxide metabolites in ovariectomized rats

Azhdar Heydari (Ph.D)<sup>1</sup>, holamali Hamidi (Ph.D)<sup>1</sup>, Mahmoud Salami (Ph.D)<sup>1</sup>, Elaheh Arbabi (M.Sc)<sup>1</sup>, Samaneh sadat Alavi (M.Sc)<sup>1</sup>, Mahsa Hadizadeh (M.Sc)<sup>1</sup>, Nastaran Afsordeh (M.Sc)<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup> - Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

<sup>2</sup> - Medical School, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

\* Corresponding author. +98 9183451143 afsordehn@gmail.com

Received: 6 Jan 2017 ; Accepted: 13 Jan 2018

**Introduction:** Estrogen influences neuronal activity and there are controversial reports regarding its role on seizure. Also, previous studies have shown that estrogen influences the nitric oxide pathway in the nervous system. In this way, the aim of the present study was to investigate the effect of estradiol and soy extract as a phytoestrogen on pentylenetetrazole- induced clonic seizures and serum levels of nitric oxide metabolites (NOx) in ovariectomized rats.

**Materials and Methods:** Sixty female Wistar rats were randomly divided into six groups (n =10 in each group) including intact control, sham-control, ovariectomy, vehicle, estradiol (100 µg/kg, subcutaneously), and soy extract (20 mg/kg, gavage). After 28 days of estradiol or soy extract administration, single dose of pentylenetetrazole was injected (90 mg/kg, intraperitoneally) for seizure induction and latency to the clonic seizures was recorded. Serum levels of NOx were measured by Griess method.

**Results:** Ovariectomy significantly reduced the latency of clonic seizures and serum levels of NOx. Estradiol significantly increased the latency of clonic seizures and serum levels of NOx (P < 0.05). Soy administration had not significant effect on these parameters.

**Conclusion:** Ovarian hormones have influence on seizure and nitric oxide pathway anticonvulsant effect of estradiol is related due to modulation of nitric oxide pathway slightly.

**Keywords:** Seizure, Soybean, Estradiol, Nitric oxide, Pentylenetetrazole, Ovariectomy.