Journal of
Guilan University of Medical Sciences

Spring 2023. Vol 32. Num 1

Research Paper

Effects of Cabergoline and Levetiracetam on the Histological and Stereological Structure of the Cerebral Cortex, Hippocampus and Cerebellum of Rats With Pentylenetetrazol-Induced Seizure

Mohammad Hossein Hajati Pishvari[1], * Yousef Panahi[1], Gholamreza Hamidian[2]

1. Division of Pharmacology and Toxicology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2. Division of Histology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Hajati Pishvari MH, Panahi Y, Hamidian GH. [Effects of Cabergoline and Levetiracetam on the Histological and Stereological Structure of the Cerebral Cortex, Hippocampus and Cerebellum of Rats With Pentylenetetrazol-Induced Seizure (Persian)]. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2023; 32(1):18-29. https://doi.org/10.32598/JGUMS.32.1.1953.3

https://doi.org/10.32598/JGUMS.32.1.1953.3

CC BY NC

Received: 09 Mar 2022
Accepted: 20 Dec 2022
Available Online: 01 Apr 2023

Keywords:
Epilepsy, Neuron, Neuroglia, Histology, Prolactin

ABSTRACT

Background Epilepcy is a chronic neurological disease, and due to its complex mechanism, the current therapeutic drugs for it are not effective enough. It may have a non-neurological origin such as astrocytes and microglia.

Objective This study aims to investigate the effect of cabergoline and levetiracetam (alone or combined) on the histological and stereological structure of the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum in rats with pentylenetetrazol (PTZ)-induced seizure.

Methods In this experimental study, samples were 30 female rats in five groups of control, seizure (PTZ-induced kindling), seizure+levetiracetam, seizure+cabergoline, seizure+levetiracetam+cabergoline. Levetiracetam and cabergoline were used at 50 and 0.05 mg/kg doses, respectively, and half of these doses were used in the seizure+levetiracetam+cabergoline group. After anesthesia, animals' brain tissue was removed and after preparing tissue slices, the number of neurons and neuroglia was examined using stereology technique.

Results In the cerebral cortex and in the molecular and granular layers of the cerebellum, the numbers of neurons and neuroglia in the treatment groups were not significantly different from those in the control group, but a significant decrease was observed in the CA1, CA2, and CA3 regions of the hippocampus in the seizure group compared to the control group. In dentate gyrus, the number of neurons in all treatment groups and the number of neuroglia in the seizure group showed a significant decrease compared to the control group. In the Purkinje layer of the cerebellum, there was no significant change in the number of neurons compared to that in the control group.

Conclusion The hippocampus is more involved in the occurrence of seizure activity than other parts of the brain. Neurons and neuroglia play an essential role in seizures, but more studies are needed for determining the relationship between the number of these cells and the use of cabergoline because their number decreases in different parts of the hippocampus following chronic seizures, where the relationship is different between dendrite gyrus and CA regions.

Corresponding Author:
Yousef Panahi
Address: Division of Pharmacology and Toxicology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
Tel: +98 (41) 36378742-45
E-Mail: y.panahi@tabrizu.ac.ir

Extended Abstract

Introduction

Recent evidence shows that hippocampal pyramidal cells are low in patients with status epilepticus [9] and glial cells and neuro-inflammation are involved in the pathogenesis of epilepsy; therefore, it is hopeful that by targeting these cells, the existing therapeutic strategies can be completed. Recent studies have shown different functions of microglia in the development and maintenance of the central nervous system (CNS) in both healthy people and patients. The treatment of hippocampal tissue and the cerebral cortex with compounds that induce seizures indicate the direct stimulation of astrocytes through a pathway that causes the release of glutamate from glial cells. Anticonvulsant drugs can reduce the activity of this non-neuronal pathway [2]. When these stimulatory pathways are considered together with GABA- and adenosine-dependent inhibition in reactive astrocytes, the role of these supporting cells in causing seizures become more evident. Therefore, the dysfunction of astrocytes in the regulatory feedback loop is one of the causes of seizures.

Prolactin is a hormone with different actions in the CNS that causes the activation and suppression of microglia and astrocytes release inflammatory and anti-inflammatory cytokines [3]. Prolactin performs different actions through its receptors, which are found both in both nerve and glial cells of the brain. Considering the dynamics of glial cells and their function in different pathological conditions, as well as the protective effect of prolactin in nerve cells, there is a possibility that prolactin can be a new target in the neuropathology of neurological diseases [4]. Therefore, the purpose of this study is to compare the effects of cabergoline and levetiracetam on tissue and stereological changes in the cortex, hippocampus and cerebellum.

Methods

In the present study, 30 adult female rats were randomly divided into five groups of 6 including control (normal saline, oral gavage), chronic seizure (30 mg/kg Pentylenetetrazole, i.p., three times a week for 10 consecutive weeks) [5], chronic seizure+levetiracetam (30 mg/kg Pentylenetetrazole+50 mg/kg levetiracetam, oral gavage([6], chronic seizure+cabergoline (30 mg/kg Pentylenetetrazole+0.05 mg/kg cabergoline, oral gavage) [7] and chronic seizure+levetiracetam+cabergoline (30 mg/kg Pentylenetetrazole+25 mg/kg levetiracetam+0.025 mg/kg cabergoline). The animals were anesthetized with ketamine-xylazine and their brain tissue was removed and placed in a 10% formalin solution for histological and stereological studies [8]. After fixing the samples in three areas such as the hippocampus, cerebellum, and cerebral cortex, the tissue samples underwent standard procedures, including dehydration, clarification, and impregnation with paraffin. Using a rotary microtome, thin tissue slices with a thickness of 5 micrometers for histological study and a thickness of 50 micrometers for stereological study were created [9].

Results

The numbers of neurons and neuroglia in the cerebral cortex and in the molecular and granular layers of the cerebellum in the treatment groups were not significantly different from those in the control group. The number of neurons in the Purkinje layer of the cerebellum does was not significantly different compared to that in the control group. The number of neurons and neuroglia in CA1, CA2 and CA3 regions of the hippocampus in the seizure

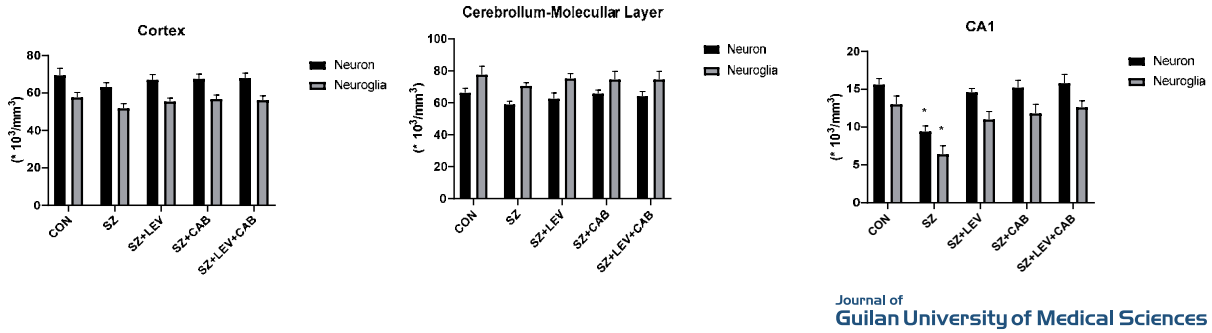


Figure 1. Effects of oral administration of levetiracetam (50 mg/kg, by gavage, for 10 weeks), cabergoline (0.05 mg/kg, by gavage, for 10 weeks) and 25 mg/kg levetiracetam + 0.025 mg/kg cabergoline on the number of neurons and neuroglia in the hippocampus CA, cerebellum, and cerebral cortex of PTZ-induced kindling animal model of seizure. Each column represents the mean ± SEM. * Significant compared to the control group at P<0.05.

group significantly decreased compared to the control group. In the dentate gyrus located in the hippocampus, the number of neurons in all treatment groups and the number of neuroglia in the seizure group were significantly reduced compared to the control group. Levetiracetam and cabergoline alone could relatively improve this decrease, while their simultaneous use had a more favorable effect (Figure 1).

The results of histological studies on the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus showed that the tissue structure as well as the condition and distribution of neurons and neuroglia in the cerebral cortex and cerebellum were normal in all groups, and no lesion or tissue damage was observed.

The results of the tissue studies related to the hippocampus shows no determined damage in different areas of the hippocampus

Discussion

In healthy brains, astrocytes exert appropriate feedback control for the regulation of neuronal activities. In epileptic brains, they regulate the expression level of neuronal NMDA receptors and involve in their stimulation by releasing glutamate and D-serine. Prolactin is a hormone that has a dual role in nerve cells; finding its connection in the pathways of nerve failure can be useful. It seems that the increase of prolactin after seizure has a protective role in the occurrence of epileptic activities. Prolactin both activates and suppresses microglia and astrocytes, and causes the release of inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Previous studies have found glial cells to be effective in the pathogenesis of epilepsy, and it is hopeful that by targeting them, their role in this process can be found more effectively [10]. In healthy brains, astrocytes exert appropriate feedback control in the regulation of neuronal activity and play an important role in maintaining the normal level of synchronization. In epileptic brains, they regulate the surface expression of neuronal NMDA receptors and participate in their stimulation by releasing glutamate and d-serine. So it can be concluded that prolactin is a hormone that has a dual role in nerve cells, so finding its connection in the pathways of nerve failure can be important.Therefore, the possibility that the increase of prolactin after convulsive activities has a protective role in the occurrence of epileptic activities is not far from expected

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the biomedical ethics committee of the University of Tabriz.

Funding

This study was funded by the University of Tabriz.

Authors' contributions

Conceptualization, design, data acquisition and interpretation, funding acquisition, supervision: Yousef Panahi; preparing initial draft: Yousef Panahi and Mohammad Hossein Hajati Pishvari; editing & review, data analysis: Gholamreza Hamidian.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the physiology unit of the Faculty of Veterinary Medicine at the University of Tabriz, including Gholamreza Vafaei Saiah, for their cooperation in using their laboratory facilities.

مقاله پژوهشی

اثر کابرگولین و لوتیراستام بر ساختار بافت‌شناسی و استریولوژیک کورتکس مغز، هیپوکامپ و مخچه در مدل کیندیلینگ تشنجی ناشی از پنتیلن‌تترازول در موش صحرایی

محمدحسین حاجتی پیشوری[۱]، *یوسف پناهی[۱]، غلامرضا حمیدیان[۲]

۱. بخش فارماکولوژی و سم‌شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲. بخش بافت‌شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Hajati Pishvari MH, Panahi Y, Hamidian GH. [Effects of Cabergoline and Levetiracetam on the Histological and Stereological Structure of the Cerebral Cortex, Hippocampus and Cerebellum of Rats With Pentylenetetrazol-Induced Seizure (Persian)]. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2023; 32(1):18-29. https://doi.org/10.32598/JGUMS.32.1.1953.3

https://doi.org/10.32598/JGUMS.32.1.1953.3

تاریخ دریافت: ۱۸ اسفند ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: ۲۹ آذر ۱۴۰۱
تاریخ انتشار: ۱۲ فروردین ۱۴۰۲

چکیده

زمینه صرع بیماری مزمن عصبی است که داروهای درمانی فعلی به‌علت مکانیسم پیچیده آن از کارایی کافی برخوردار نیستند. بنابراین ممکن است خاستگاهی غیرعصبی همچون آستروسیت‌ها و میکروگلیاها داشته باشد.

هدف مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر تجویز تنها و توأمان کابرگولین و لوتیراستام بر ساختار بافت‌شناسی و استریولوژیک کورتکس مغز، هیپوکامپ و مخچه متعاقب تشنج مزمن در موش صحرایی انجام شد.

روش‌ها در این مطالعه تجربی، ۳۰ سر موش صحرایی ماده در گروه‌های کنترل، تشنج (کیندیلینگ با پنتیلن‌تترازول)، تشنج+لوتیراستام، تشنج+کابرگولین، تشنج+لوتیراستام+کابرگولین بررسی شدند. لوتیراستام و کابرگولین به‌ترتیب با دُزهای ۵۰ و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در گروه مشترک نصف این مقادیر استفاده شد. بعد از یوتانایز کردن حیوانات، بافت مغز آن‌ها خارج و بعد از تهیه مقاطع بافتی با استفاده از تکنیک استریولوژی تعداد نورون‌ها و نوروگلیاها بررسی شد.

یافته‌ها در کورتکس مغز و لایه مولکولی و گرانولی مخچه گروه‌های درمان، تعداد نورون‌ها و نوروگلیاها تفاوت معناداری با گروه کنترل نداشت، اما در نواحی CA1، CA2 و CA3 مربوط به گروه تشنج کاهش معناداری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. در دنتیت ژایروس تعداد نورون‌ها در همه گروه‌های درمان و تعداد نوروگلیاها در گروه تشنج کاهش معناداری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. در لایه پورکینژ مخچه تغییر معنی‌داری در نورون‌ها در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری هیپوکامپ در بروز فعالیت‌های تشنجی بیشتر از سایر قسمت‌های مغز نقش دارد. همچنین نورون‌ها و نوروگلیا در تشنج نقش اساسی دارند، اما تعیین رابطه بین تغییرات تراکم این سلول‌ها و استفاده از کابرگولین نیازمند مطالعات بیشتری است، زیرا تراکم آن‌ها در قسمت‌های مختلف هیپوکامپ به‌دنبال تشنج مزمن کاهش یافت، اما در دنتیت ژایروس این رابطه با مناطق CA متفاوت است.

کلیدواژه‌ها:
صرع، نورون، نوروگلیا، بافت‌شناسی، پرولاکتین

* **نویسنده مسئول:**
یوسف پناهی
نشانی: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، بخش فارماکولوژی و سم‌شناسی.
تلفن: ۴۵-۳۶۳۷۸۷۴۲ (۴۱) ۹۸+
رایانامه: y.panahi@tabrizu.ac.ir

مقدمه

صرع یک اختلال عصبی مزمن شایع است که بیش از ۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان را تحت تأثیر قرار می دهد. با وقوع متناوب تشنج‌ها مشخص می‌شود که عملکرد طبیعی مغز را مختل می‌کند. میکروگلیا به‌عنوان سلول‌های ایمنی اصلی مغز، نقش مهمی در توسعه و نگهداری مدارهای عصبی در طول رشد و بزرگسالی ایفا می‌کند که بعید است با انواع سلول‌های دیگر جایگزین شوند. علی‌رغم اطلاعات زیادی که در مورد خواص میکروگلیال در شرایط فیزیولوژیکی وجود دارد، اطلاعات کمی در مورد اینکه آیا و چگونه میکروگلیا ساختار و عملکرد مدارهای عصبی را در شرایط صرع تعدیل می‌کند، وجود دارد.

میکروگلیاها، در صرع به‌سرعت در نواحی مغزی که تحت تأثیر محرک‌های تشنجی قرار دارند، فعال می‌شوند. فعال‌سازی میکروگلیا همراه با فعال‌سازی آستروسیتی احتمالاً به فرآیند صرع در مدل‌های حیوانی صرع کمک می‌کند [۱]. ازطرفی مشخص شده است آستروسیت‌ها در تحریکی که به تشنج منجر می‌شود، نقش دارند. تصور بر این است که فعالیت هم‌زمان عصبی در تشنج از یک منشأ کاملاً عصبی ناشی نمی‌شود، زیرا درمان بافت هیپوکامپ و قشر مغز با ترکیباتی که باعث القای تشنج می‌شوند، تحریک مستقیم آستروسیت‌ها ازطریق مسیری را نشان می‌دهد که باعث ترشح گلوتامات از گلیال می‌شود و اینکه داروهای ضدتشنج، فعالیت این مسیر غیرعصبی را کاهش می‌دهند [۲].

مطالعات ۲۰ سال گذشته نشان می‌دهد آستروسیت‌ها یک سری عملکردهای پیچیده را انجام می‌دهند که فراتر از برداشت و بازیافت انتقال‌دهنده‌های عصبی است. آستروسیت‌ها به‌عنوان سلول‌های غیرقابل تحریک در نظر گرفته می‌شوند، زیرا برخلاف نورون‌ها، پتانسیل‌های عمل ایجاد نمی‌کنند، آن‌ها نوعی تحریک‌پذیری را نشان می‌دهند که براساس تغییرات غلظت کلسیم درون سلولی است. آستروسیت‌ها بخش جدایی‌ناپذیر و فعال انتقال سیناپسی تحریکی و مهاری را تشکیل می‌دهند و با سیناپس‌ها ارتباط برقرار می‌کنند. شواهد جدید نقش مهمی را برای این سلول‌های گلیال در پاتوژنز اختلالات عصبی مانند صرع پیشنهاد کرده‌اند [۳]. در ضمن مشخص شده است که ارتباطات دو طرفه بین آستروسیت‌ها و سلول‌های عصبی برای عملکرد طبیعی سیستم عصبی در طی پردازش سیگنال ضروری است. آستروسیت‌ها توسط اتصالات شکاف به هم وصل می‌شوند تا یک سینسیتیوم عملکردی بزرگ را تشکیل دهند [۴].

تغییرات هورمونی هم به‌دنبال فعالیت‌های تشنجی مختلف ممکن است اتفاق بیافتد. برای مثال، بعد از تشنج‌های کمپلکس پارشیال و عمومی تونیک کلونیک مقدار پرولاکتین در دوسوم موارد افزایش دارد [۵]. پرولاکتین هورمونی است که در سیستم عصبی مرکزی عملکردهای متعدد دارد [۶] و باعث فعال شدن و سرکوب میکروگلیا و آستروسیت‌ها و ترشح سیتوکین‌های التهابی و ضدالتهابی می‌شود [۷]. پرولاکتین ازطریق گیرنده‌های پرولاکتین که در سلول‌های عصبی و سلول‌های گلیال مغز یافت می‌شوند، عمل می‌کند و ازطریق این گیرنده‌ها اعمال متفاوت خودش را در این قسمت‌ها انجام می‌دهد. چون حضور پرولاکتین می‌تواند باعث فعال شدن سلول‌های گلیال شود، بنابراین با در نظر گرفتن دینامیک این سلول‌ها و عملکردشان در شرایط مختلف به‌علاوه اثرات حفاظتی پرولاکتین در سلول‌های عصبی، می‌توان پرولاکتین را به‌عنوان هدف جدید و متفاوت در نوروپاتولوژی بیماری‌های عصبی مورد بررسی و مطالعه قرار داد [۸].

مطالعات قبلی نشان می دهند بین پرولاکتین و آسیب عصبی در بیماری صرع و مدل تجربی آن ارتباط وجود دارد. هرچند این ارتباط در شرایط آسیب عصبی بیشتر از نوع حفاظتی است [۷]. شواهد نشان می‌دهند در صرع وضعیتی انسان، سلول‌های پیرامیدال هیپوکامپ از دست می‌روند و در پاتوژنز بیماری صرع، التهاب عصبی و سلول‌های گلیال دخالت دارند، بنابراین جای امیدواری است که با هدف قرار دادن این سلول‌ها بتوان استراتژی‌های درمانی موجود را کامل کرد؛ به‌ویژه اینکه میکروگلیا به‌عنوان یک سلول التهابی عمده در مغز صرعی، کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است [۹].

بنابراین با در نظر گرفتن تعاملات بین نورون‌ها و نوروگلیا و احتمال افزایش پرولاکتین به‌دنبال فعالیت‌های مزمن تشنجی [۱۰] ناشی از پنتیلن تترازول ۱ این مطالعه با هدف مقایسه اثرات کابرگولین (داروی مورداستفاده برای درمان پرولاکتین بالا) و لوتیراستام (داروی ضدتشنج) بر تغییرات بافتی و استریولوژیک کورتکس، هیپوکامپ و مخچه انجام شد.

روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه تجربی، ۳۰ سر موش صحرایی ماده بالغ از محل پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی واقع در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم‌پزشکی ارومیه خریداری شدند. سپس برای انطباق‌پذیری با شرایط آزمایشگاهی به بخش حیوان‌خانه آزمایشگاه فارماکولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز انتقال یافتند.

گروه‌های مورد مطالعه

حیوانات مورد مطالعه به‌صورت کاملاً تصادفی در ۵ گروه کنترل (نرمال‌سالین)، تشنج مزمن، تشنج مزمن+لوتیراستام، تشنج مزمن+کابرگولین و تشنج مزمن+لوتیراستام+کابرگولین دسته‌بندی شدند. در هر گروه از ۶ سر موش صحرایی ماده بالغ

استفاده شد. در گروه تشنج به‌مدت ۱۰ هفته، هر هفته ۳ روز (در روزهای شنبه، دوشنبه و چهارشنبه) تزریق داخل‌صفاقی ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پنتیلن‌تترازول انجام شد [۱۱] که به این ترتیب موش‌ها به‌صورت مزمن دچار تشنج شدند.

در گروه‌های درمانی دیگر، همراه با برنامه تزریق داخل‌صفاقی پنتیلن‌تترازول طی زمان ۱۰ هفته پشت سر هم، از داروهای لوتیراستام به مقدار ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم [۱۲] (تشنج مزمن+لوتیراستام)، کابرگولین به مقدار ۰/۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم [۱۳] (تشنج مزمن+کابرگولین) و نیز ترکیب لوتیراستام+کابرگولین (تشنج مزمن+لوتیراستام ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم+کابرگولین ۰/۰۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌روش گاواژ خوراکی استفاده شد. برای تهیه غلظت‌های مورد نظر کابرگولین و لوتیراستام و همچنین تهیه پنتیلن‌تترازول از نرمال‌سالین استفاده شد. بعد از آنکه مدت‌زمان ۱۰ هفته سپری شد، با رعایت تمامی موازین اخلاقی، حیوانات با ترکیب کتامین+زایلازین (۷۰+۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. بعد از اینکه از یوتانازی موش‌ها اطمینان حاصل شد، سر آن‌ها از بدن جدا شد و سپس مغز و مخچه حیوانات مذکور به ور کامل از بدن خارج شد. برای تثبیت بافتی، مغز موش‌ها در محلول فرمالین ۱۰ درصد برای انجام مطالعات بافت‌شناسی و استریولوژیک قرار داده شد.

آماده‌سازی بافتی

پس از تثبیت نمونه‌ها برای مطالعه بافت‌شناسی و استریولوژیک در ۳ ناحیه هیپوکامپ، مخچه و قشر مخ، مراحل استاندارد تهیه مقاطع بافتی که شامل آب‌گیری، شفاف‌سازی و آغشتگی با پارافین است، طی شد و بدین‌ترتیب بلوک‌های پارافینی آماده شدند. در مرحله بعد با استفاده از میکروتوم دورانی از هر بلوک برش‌های سریالی تهیه شد. برای انجام این کار اصل انتخاب تصادفی یکنواخت و منظم به‌صورت ۱۰ برش ۵ میکرونی به منظور مطالعات بافت‌شناسی و تهیه تصاویر میکروسکوپی لحاظ شد و ۵ تا ۷ برش ۵۰ میکرونی با رعایت فاصله‌های ۳۰۰ میکرونی انتخاب شد تا رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین[1] به روش استاندارد و معمول انجام شود.

مطالعات استریولوژیک

تمامی فرایند مطالعه استریولوژیک و نیز تخمین تراکم سلول‌های عصبی و نوروگلیاها توسط سیستم رایانه‌ای تجهیزشده با نسخه شماره ۹ در نرم‌افزار استررئواینوستیگیتور اجرا شد. طی مطالعات استریولوژیک تراکم سلول‌ها به شیوه فراکشنیتور توسط قاب شمارش با ابعادی مطلوب در ۳ بخش مخچه، هیپوکامپ و کورتکس تخمین زده شد [۱۴].

در مطالعه حاضر برای انجام تمام مراحل پاساژ بافتی همچون آبگیری، شفاف‌سازی و آغشته‌سازی از دستگاهی به نام هیستوکینت (مدل ۲۰۰۰، آلمان) استفاده شد. بعد از اینکه تثبیت‌سازی انجام شد، نمونه‌های بافتی میزان زیادی آب داشتند که برای آغشتگی در این مرحله از پارافین که کاملاً آب‌گریز است، استفاده شد. آب بافت با استفاده از غلظت‌های ۵۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ الکل‌اتیلیک در زمان ۱ ساعت در ۲ ظرف الکل و در هرکدام به مدت‌زمان ۲ ساعت خارج شد.

ازآنجاکه الکل‌اتیلیک امکان مخلوط شدن با پارافین مذاب را ندارد، بنابراین باید پیش از عمل آغشتگی، بافت را در محلول شفافی همچون گزیلول که حلال پارافین است، قرار داد. در طی آغشته‌سازی، نمونه‌های بافتی در پارافین مذاب (۵۶ الی ۵۸ درجه سانتی‌گراد) گذاشته شدند. در مرحله آغشته‌سازی پارافین داخل بافت شده که این کار باعث استحکام‌بخشی ساختار بافتی و تسهیل ایجاد برش‌های نازک از بافت می‌شود. برای آغشتگی نمونه‌ها می‌توان از ۲ ظرف حاوی پارافین و هرکدام در مدت‌زمان ۲ ساعت استفاده کرد. به منظور قالب‌گیری، از قطعات فلزی L شکل استفاده شد که قطعات لوکهارت نامیده می‌شوند. در این هنگام ابتدا پارافین مذاب در داخل قالب ریخته شد و به‌دنبال آن باتوجه‌به خط‌مشی استریولوژیکی از پیش تعیین‌شده نمونه بافتی به داخل قالب اضافه شد [۱۵].

رنگ‌آمیزی

به دنبال انجماد پارافین، مقطع‌گیری آغاز شد و با استفاده از میکروتوم دورانی برش‌های نازک با ضخامت ۵ میکرومتر به منظور مطالعات هیستولوژی و ایمونوهیستوشیمی و برش‌های ضخیم با ضخامت ۲۰ میکرومتر به منظور مطالعات استریولوژیک بر روی نمونه‌های حاضر در قالب‌های پارافینی ایجاد شد. جهت از بین بردن چین و چروک برش‌ها ابتدا آن‌ها روی سطح آب گرم قرار گرفتند و به دنبال آن لام‌های حاوی چسب گلیسروآلبومین به قسمت پایینی برش‌های صاف‌شده برده شد و سپس برش‌ها از سطح آب برداشته شدند، خشک و رنگ‌آمیزی شدند. به‌طور معمول در برش‌های بافتی از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین استفاده می‌شود که در آن هسته سلول به رنگ بنفش و سیتوپلاسم آن به رنگ صورتی درمی‌آید.

در مطالعه حاضر از هماتوکسیلین هاریس و ائوزین الکلی استفاده شد. به این صورت که مقاطع در مدت‌زمان ۱۵ دقیقه در ۲ ظرف گزیلول قرار داده شدند تا پارافین حل شود که به آن پارافین‌گیری می‌گویند، سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱ دقیقه در الکل‌اتیلیک قرار داده شدند تا جلوی آسیب رسیدن به نمونه‌ها گرفته شود که به آن آب‌دهی می‌گویند. بعد از آب‌دهی، نمونه‌ها ۱۵ دقیقه در رنگ هماتوکسیلین قرار گرفتند و سپس چند ثانیه در محلول اسید الکل قرار گرفتند تا مازاد رنگ هماتوکسیلین بیرون رود.

1. hematoxylin and eosin stain (H&E)

عمل شست‌وشو تا پدیدار شدن رنگ آبی ادامه یافت که در انجام این کار محلول کربنات لیتیوم باعث سرعت‌بخشی به آن شد. پس از شست‌وشو، مقاطع در زمان ۵ دقیقه در محلول ۱ درصد ائوزین مانده و مجدداً شست‌وشو داده شدند. به منظور آبگیری، مقاطع بافتی به مدت ۱ دقیقه در الکل‌اتیلیک ماند و با قرار گرفتن در ۲ ظرف حاوی گزیلول در طی زمان ۱۵ دقیقه شفاف شدند. پس از پایان مراحل رنگ‌آمیزی، مقاطع از گزیلول بیرون آورده شد و با ریختن ۲ قطره چسب انتلان روی برش، با نهایت دقت به صورتی که چسب به‌طور یکسان در همه جا پخش شود و هیچ اثری از تشکیل حباب وجود نداشته باشد، لامل روی آن جای گرفت. در این حالت لام، خشک و آماده مطالعات میکروسکوپیک شد [۱۵].

تحلیل داده‌ها

در مطالعه حاضر مقادیر متغیرهای کمی به‌صورت میانگین±انحراف‌معیار نشان داده شد. برای مقایسه میانگین متغیرهای مورد بررسی بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک‌طرفه[2] و آزمون تعقیبی توکی[3] استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نسخه ۲۷ نرم‌افزار SPSS تجزیه‌وتحلیل شدند و سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

کورتکس مغزی

بررسی نتایج نشان داد استفاده مزمن لوتیراستام و کابرگولین و ترکیب این دو به‌صورت گاواژ همزمان با القای فعالیت‌های تشنجی توسط مدل کیندلینگ تشنجی ناشی از PTZ در موش صحرایی، تعداد نورون‌ها و نوروگلیا را در کورتکس مغزی به‌طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل تغییر نداده است (P>۰/۰۵) (تصویر شماره ۱). در بررسی‌های مربوط به ساختار بافت‌شناسی بخش کورتکس مغزی در گروه‌های کنترل و درمان، ساختار بافتی و همچنین وضعیت و پراکنش نورون و نوروگلیا در بخش قشری مغز در تمامی گروه‌ها نرمال بود و هیچ ضایعه یا آسیب بافتی مشاهده نشد (تصویر شماره ۲).

مخچه

بررسی نتایج مربوط به تعداد نورون‌ها و نوروگلیا در لایه مولکولی و گرانولار مخچه، تغییر معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد (P>۰/۰۵) (تصویر شماره ۱). در بررسی‌های مربوط به ساختار بافت‌شناسی بخش مخچه در گروه‌های کنترل و درمان، ساختار بافتی و وضعیت و پراکنش نورون و نوروگلیا و همچنین وضعیت سلول‌های پورکینژ در نواحی مختلف مخچه در تمامی گروه‌ها نرمال بود و هیچ ضایعه یا آسیب بافتی مشاهده نشد (تصویر شماره ۳).

هیپوکامپ

نتایج مربوط به هیپوکامپ نشان داد تعداد نورون‌ها و نوروگلیاها در نواحی CA1، CA2 و CA3 هیپوکامپ در گروه تشنج در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری داشته است، درحالی که مقایسه تغییرات این سلول‌های عصبی در سایر گروه‌های درمان در مقایسه با گروه کنترل تغییرات معناداری را نشان نداد (P>۰/۰۵) (تصویر شماره ۱). بررسی نتایج مربوط به شمارش تعداد نورون‌ها و نوروگلیاها در ناحیه دنتیت ژایروس[4] هیپوکامپ نشان داد تعداد نورون‌ها در همه گروه‌های درمان در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری دارد (P<۰/۰۵)، درصورتی که تعداد نوروگلیاها در فقط گروه تشنج کاهش معناداری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۵) و در گروه‌های لوتیراستام و ترکیب لوتیراستام و کابرگولین تفاوت معناداری با گروه کنترل مشاهده نشد (تصویر شماره ۱).

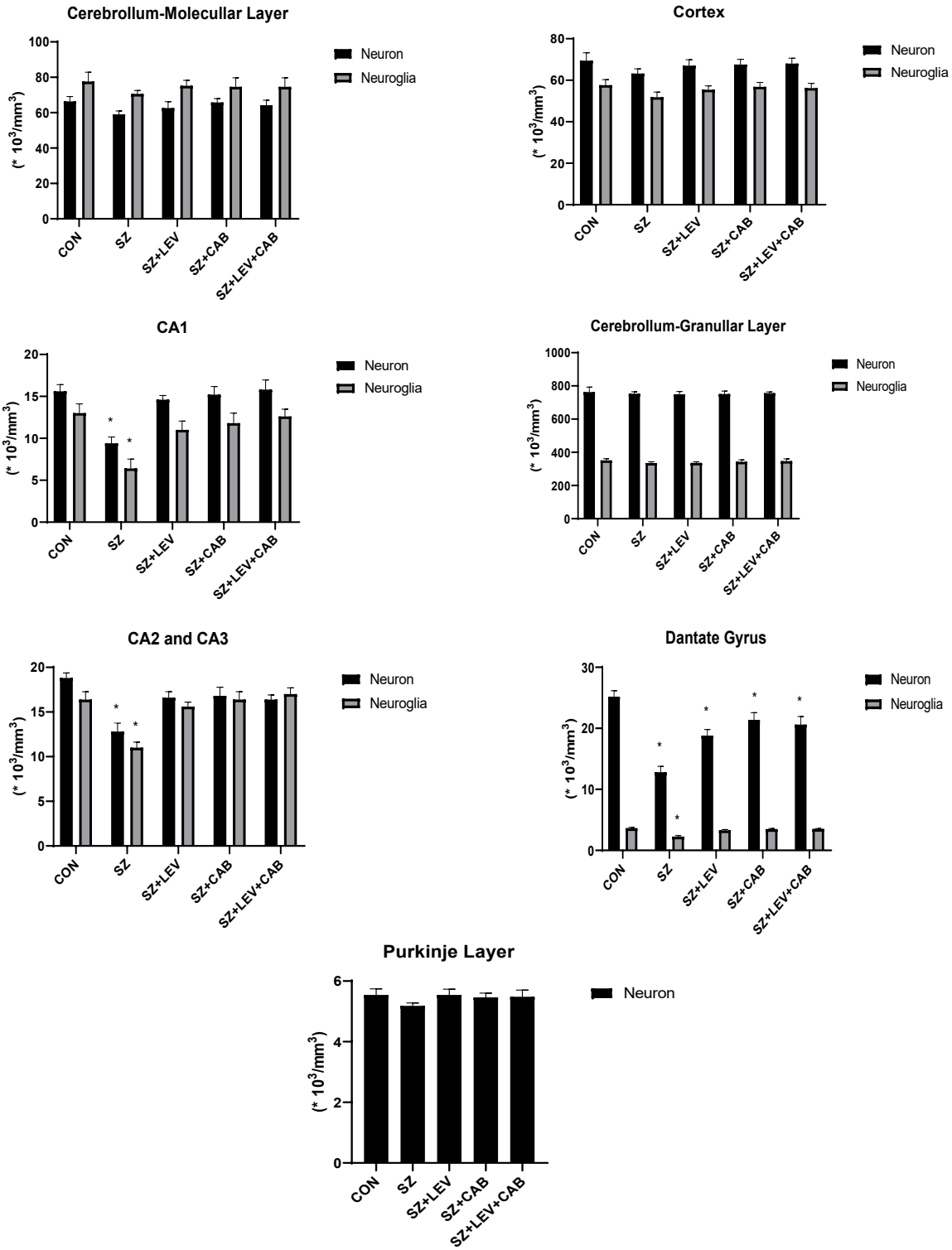
بافت‌شناسی و استریولوژیک

نتایج مربوط به بررسی‌های ساختار بافت‌شناسی هیپوکامپ در گروه‌های کنترل و درمان نشان داد آسیب بافتی خاصی در نواحی مختلف هیپوکامپ مشاهده نمی‌شود، اما وضعیت و پراکنش نورون و نوروگلیاها در بخش‌های مختلف هیپوکامپ در گروه‌های مختلف متفاوت است، به نحوی که کاهش جسم سلولی نورون‌ها و تراکم نوروگلیاها در نواحی CA1 و DG در گروه تشنج مزمن به‌خوبی مشهود است (تصویر شماره ۴). هرچند این وضعیت در حیوانات مبتلا به صرع مزمن که لوتیراستام یا کابرگولین را به‌تنهایی دریافت کردند، بهبود نسبی به دست آوردند، اما نسبت به گروه کنترل همچنان متفاوت است. در گروه تشنج مزمن دریافت‌کننده همزمان لوتیراستام و کابرگولین بهبود مطلوبی مشاهده می‌شود، به نحوی که نواحی مختلف هیپوکامپ در این گروه از لحاظ ساختاری مشابه گروه کنترل است.

بحث

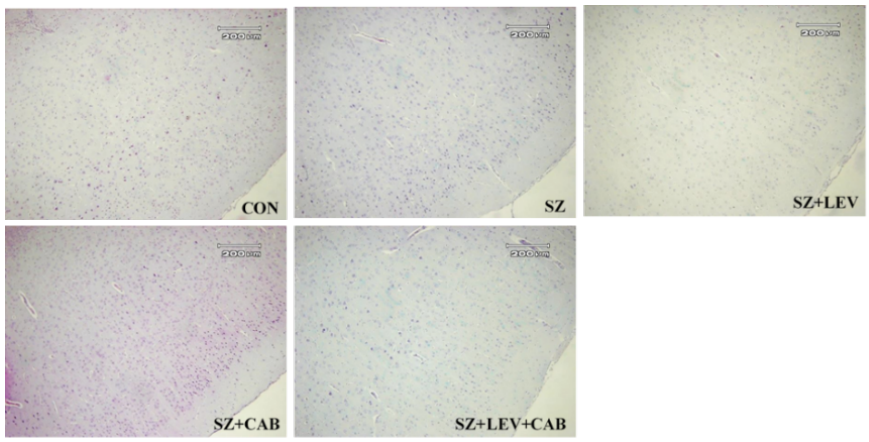
نتایج بافت‌شناسی و استریولوژیک مطالعه حاضر نشان می‌دهد بعد از مدل تشنجی القاشده توسط پنتیلن‌تترازول در موش صحرایی ماده به‌مدت ۱۰ هفته، دانسیته سلول‌های عصبی از جمله نورون‌ها و نوروگلیاها در کورتکس و لایه‌های مختلف مخچه تفاوتی ندارد، درحالی که در قسمت‌های مختلف هیپوکامپ از جمله نواحی CA1، CA2 و CA3 و دنتیت ژایروس تعداد نورون‌ها و نوروگلیا در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری را نشان می‌دهد.

2. One-way ANOVA
3. Tukey
4. Dentate gyrus (DG)



تصویر ۱. اثرات کابرگولین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، گاواژ، به مدت ۱۰ هفته)، لوتیراستام (۰/۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، گاواژ، به مدت ۱۰ هفته) و ترکیب کابرگولین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)+لوتیراستام (۰/۰۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر میزان تغییرات نورون و نوروگلیا در A) کورتکس مغز، B) لایه مولکولی مخچه، C) لایه گرانولار مخچه، D) ناحیه CA1 هیپوکامپ، E) ناحیه CA2 و CA3 هیپوکامپ، F) ناحیه دنتیت ژایروس هیپوکامپ و G) میزان تغییرات نورون ناشی از کیندلینگ تجربی با PTZ به مدت ۱۰ هفته در لایه پورکینژ مخچه گروه کنترل، گروه تشنج مزمن، گروه لوتیراستام، گروه کابرگولین و گروهی که ترکیب کابرگولین و لوتیراستام را با هم دریافت کرده‌اند. ۶ سر موش صحرایی در هر گروه مورد مطالعه قرار گرفتند. اختلاف $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است. علامت ستاره نشان‌دهنده تغییرات معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل است.

کورتکس مغز



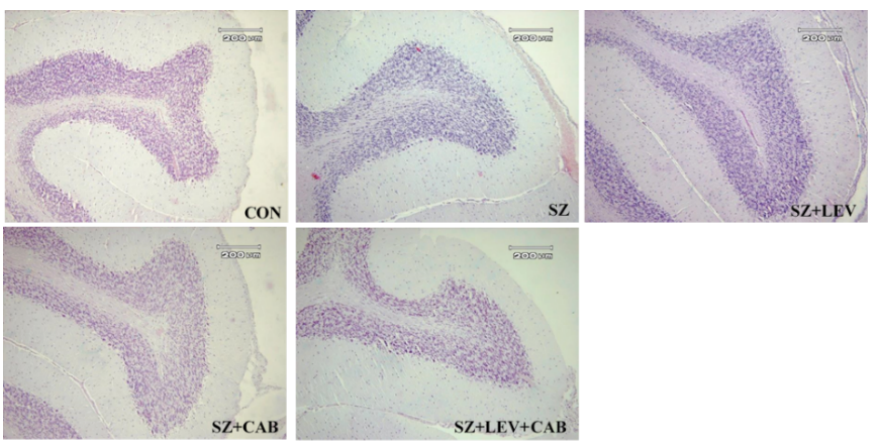
مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۲. ساختار بافت‌شناسی قشر مخ در گروه‌های کنترل، تشنج، تشنج+لوتیراستام، تشنج+کابرگولین و تشنج+لوتیراستام+کابرگولین (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی x200). ساختار بافت‌شناسی و نورون‌ها و نوروگلیای قشر مخ در همه گروه‌ها نرمال و بدون ضایعه یا آسیب بود.

در ناحیه دنتیت ژایروس، تعداد نورون در گروهی از حیوانات که لوتیراستام و کابرگولین دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری را نشان می‌دهد. هرچند میزان این کاهش در مقایسه با گروه تشنج کمتر است و به نظر می‌رسد هر ۲ دارو نوعی اثر حفاظتی در کاهش میزان نورون‌ها داشته باشند. باتوجه‌به اینکه مکانیسم اثر لوتیراستام و کابرگولین متفاوت است، پیدا کردن ارتباط تغییرات در دانسیته سلول‌های مورد نظر نیاز به بررسی‌ها و مطالعات بیشتری دارد. برای سلول‌های گلیال نقش موثری در رخداد فعالیت‌های تشنجی در نظر گرفته شده است که برای تعیین میزان و چگونگی این ارتباط می‌توان با طراحی مطالعات بیشتر در این زمینه عمل کرد

پرولاکتین هم باعث فعال شدن و سرکوب میکروگلیا و آستروسیت‌ها و هم ترشح سیتوکین‌های التهابی و ضدالتهابی می‌شود. همچنین پرولاکتین با آسیب عصبی در بیماری‌هایی مانند مولتیپل‌اسکلروزیس، صرع و با مدل‌های تجربی این بیماری‌ها ارتباط دارد. بااین‌حال، مطالعات نشان می‌دهند پرولاکتین در شرایط آسیب عصبی و التهاب دارای اثرات محافظت در برابر نورون است و ممکن است به‌عنوان یک عامل محافظت‌کننده نورون مورد استفاده قرار گیرد. با در نظر گرفتن عوامل دخیل در نقش احتمالی ۲ گانه پرولاکتین، نشان داده شده است که پرولاکتین ممکن است یک مولکول امیدوارکننده برای درمان برخی بیماری‌های عصبی باشد [۱۶]، زیرا پرولاکتین هورمونی با عملکردهای متعدد در سیستم عصبی مرکزی است که ازطریق گیرنده‌های خود اعمال متفاوتی را انجام می‌دهد و این گیرنده‌ها هم در سلول‌های عصبی و هم در سلول‌های گلیال (آستروسیت‌ها، میکروگلیاها و الیگودندروسیت‌ها) مغز یافت می‌شوند.اگرچه تأثیرات آن در دوران بارداری و شیردهی، استرس، اضطراب و افسردگی به‌خوبی بررسی شده است، کارهای

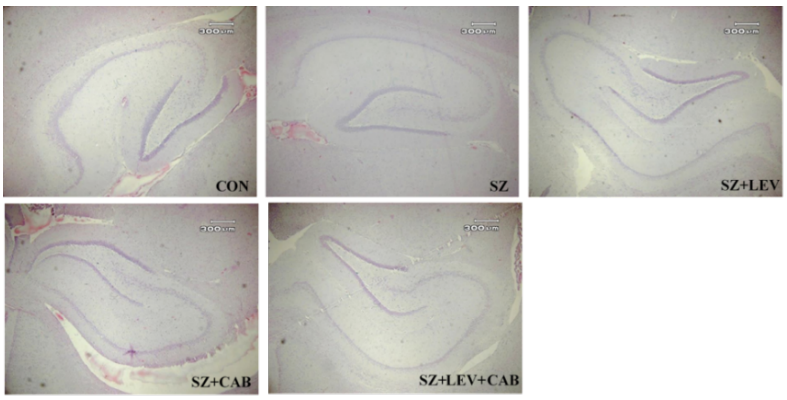
مخچه



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۳. ساختار بافت‌شناسی مخچه در گروه‌های کنترل، تشنج، تشنج+لوتیراستام، تشنج+کابرگولین و تشنج+لوتیراستام+کابرگولین (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی x200). ساختار بافت‌شناسی و نورون‌ها و نوروگلیای مخچه در همه گروه‌ها نرمال و بدون ضایعه یا آسیب بود.

هیپوکامپ



تصویر ۴. ساختار بافت‌شناسی هیپوکامپ در گروه‌های کنترل، تشنج، تشنج+لوتیراستام، تشنج+کابرگولین و تشنج+لوتیراستام+کابرگولین (رنگ‌آمیزی **H&E**، بزرگ‌نمایی x200). هیچ آسیب مشخصی در هیپوکامپ مشاهده نشد، اما تراکم نورون‌ها و نوروگلیا در **CA1** و **DG** در گروه صرع مزمن (تشنج) کاهش یافت. لوتیراستام و کابرگولین به‌تنهایی توانستند این کاهش را تا حدی بهبود بخشند و درمان همزمان با لوتیراستام و کابرگولین اثر مطلوب‌تری داشت.

اخیر روی این هورمون نقش جدیدی از پرولاکتین را به‌عنوان یک ماده محافظ در برابر آسیب مغز و درنتیجه، در برابر تخریب عصب آشکار کرده است، اما مکانیسمی که ازطریق آن‌ها این محافظت صورت می‌گیرد، به‌طور کامل روشن نشده است.

با این حال، نوروژنز و اثرات ضدآپوپتوزی آن از مکانیسم‌های قابل قبول هستند که می‌توانند واسطه این اثر باشند. همان‌طور که در مدل‌های مختلف آسیب مغزی نشان داده شده است، اطلاعات قابل توجهی وجود دارد که نشان‌دهنده فعال شدن گلیال در اثر پرولاکتین است. با در نظر گرفتن دینامیک سلول‌های گلیال و عملکرد آن‌ها در شرایط پاتولوژیک مختلف، همراه با اثر حفاظتی پرولاکتین از سلول‌های عصبی، امکان اینکه پرولاکتین هدف جدیدی در نوروپاتولوژی بیماری‌های عصبی در نظر گرفته شود وجود دارد [۸].

طبق نتایج مطالعه حاضر، کابرگولین باعث کاهش میزان سلول‌های میکروگلیا و نورون در نواحی مختلف هیپوکامپ شده است. تصور بر این است که فعالیت هم‌زمان عصبی در تشنج از یک منشأ کاملاً عصبی ناشی نمی‌شود. استروسیت‌ها با ترشح گلوتامات، به دپولاریزاسیون عصبی منجر به صرع کمک می‌کنند. مشخص شده است درمان بافت هیپوکامپ و قشر مغز با ترکیباتی که باعث القای تشنج می‌شوند، تحریک مستقیم آستروسیت‌ها ازطریق مسیری را نشان می‌دهد که باعث ترشح گلوتامات می‌شود و داروهای ضدتشنج فعالیت این مسیر غیرعصبی را کاهش می‌دهند و این یافته نشان می‌دهد رخداد صرع یک پایه آستروسیتی هم دارد و آستروسیت‌ها در وقوع آن نقش دارند که در صورت تجزیه‌وتحلیل تجربی این نتایج و تأیید و گسترش آن، یک هدف جدید برای مداخله درمانی خواهد بود [۲].

طبق مطالعات انجام‌شده، آستروسیت‌ها، نروترانسمیترهای شیمیایی آزاد می‌کنند. در مغز صرعی آنزیم اختصاصی آستروسیت‌ها به نام گلوتامین‌سنتتاز (مسئول تبدیل گلوتامات به گلوتامین سیناپسی است که پیش‌ساز سنتز گلوتامات و گاباست) کاهش می‌یابد که باعث کاهش مهار سیناپسی می‌شود و گسترش تحریک را افزایش می‌دهد. علاو برآن آستروسیت‌های واکنشی، افزایش بیان آدنوزین‌کیناز را نشان می‌دهند که آنزیم مسئول تبدیل آدنوزین به AMP است که یک ترکیب ضدصرع اندوژن است. بنابراین آدنوزین همراه آستروسیت‌های واکنشی کاهش می‌یابد. از طرف دیگر، آستروسیت‌ها بیان سطحی گیرنده‌های NMDA عصبی را تنظیم می‌کنند و در تحریک ناشی از آن‌ها از طریق آزاد کردن گلوتامات و دسرین شرکت می‌کنند.

سیگنال‌های کلسیمی آستروسیت‌ها که توسط داروهای ضدصرع تعدیل می‌شوند، آزاد شدن گلوتامات از گلیال که باعث تحریک نورون‌ها می‌شود را تحریک می‌کنند. وقتی این مسیرهای تحریکی با کاهش مهار وابسته به گابا و آدنوزین با هم در آستروسیت‌های واکنشی در نظر گرفته می‌شوند، امکان نقش و رویارویی این سلول‌های حمایتی در ایجاد تشنج خیلی محتمل است [۱۷]. آستروسیت‌های سالم فیدبک کنترلی مناسبی را در تنظیم فعالیت‌های نورونی اعمال می‌کنند و نقش مهمی در حفظ سطح نرمال هم‌زمان‌سازی دارند. بنابراین بدکاری آستروسیت‌ها در لوپ فیدبک تنظیمی به‌عنوان یکی از دلایل رخداد تشنج مورد بررسی قرار می‌گیرد. آستروسیت‌هایی که دچار بدکاری شده‌اند قادر به تنظیم افزایش بیش از حد کشش بین مجموعه نورون‌ها نیستند. بنابراین نتیجه آشفتگی عملکرد هوموستاتیک آستروسیت‌ها ممکن است آغازکننده فعال شدن هم‌زمان نورون‌ها باشد که می‌تواند بیان‌کننده این نکته باشد که فعل و انفعال نورون-آستروسیت ممکن است یک هدف جدید برای ایجاد استراتژی‌های جدید درمانی مؤثر برای صرع باشد [۱۸].

میکروگلیا به‌عنوان سلول‌های ایمنی اصلی مغز، نقش مهمی در توسعه و نگهداری مدارهای عصبی در طول رشد و بزرگسالی ایفا می‌کند که بعید است با انواع سلول‌های دیگر جایگزین شوند. علی‌رغم وجود اطلاعات زیاد در مورد خواص میکروگلیا در شرایط فیزیولوژیکی، اطلاعات کمی در مورد اینکه آیا و چگونه میکروگلیا ساختار و عملکرد مدارهای عصبی را در شرایط صرع تعدیل می‌کند، شناخته شده است. مشخص شده است که پس از تشنج حاد ناشی از داروهایی تشنجی یا تحریک الکتریکی، میکروگلییا به‌سرعت فعال و با آزاد کردن سیتوکین‌های پیش التهابی ممکن است منجر به تحریک‌پذیری عصبی و تخریب عصبی شود.

فعال‌سازی میکروگلیا همراه با فعال‌سازی آستروسیتی احتمالاً به فرآیند صرع در مدل‌های حیوانی صرع کمک می‌کند [۱]. دی‌جورجیو و همکاران در سال ۱۹۹۲ گزارش دادند در صرع وضعیتی انسان، سلول‌های پیرامیدال هیپوکامپ در مناطقی مثل پروسابیکولوم، CA1 و CA3 از دست می‌روند [۹]. درحالی که تشنج دوران نوزادی پیامدهای عصبی نامطلوبی دارد، اما در مورد اینکه آیا تشنج به‌سادگی آسیب اصلی مغز را منعکس می‌کند یا می‌تواند باعث آسیب شود، اختلاف نظر وجود دارد [۱۹]. ازآنجایی‌که صرع همچنان یک نگرانی مهم اجتماعی است و بار مالی زیادی در سطح جهانی دارد و استراتژی‌های درمانی فعلی اساساً مبتنی بر مکانیسم‌های عصبی است که حداقل در یک‌سوم بیماران موفق نبوده، به رویکردهای جایگزین و مکمل جدید نیاز است.

شواهد اخیر، سلول‌های گلیال و التهاب عصبی را در پاتوژنز صرع دخیل می‌داند و امیدوار است که با هدف قرار دادن این سلول‌ها بتوان استراتژی‌های موجود را کامل کرد. خصوصاً اینکه میکروگلیا به‌عنوان یک سلول التهابی عمده در مغز صرعی، کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. میکروگلیا در طی فنوتیپ صرع حاد، تأخیر در بازسازی سلول‌های عصبی و نوروژنز دارای نقش عملکردی مهمی است [۲۰]. بنابراین مطالعاتی که در آینده انجام خواهند شد، می‌توانند شکاف‌های اطلاعاتی موجود در این زمینه که تغییرات القایی صرع در عملکرد پایه میکروگلیا، ارتباط نورون-میکروگلیا در طی صرع مزمن و نقش میکروگلیاها در چگونگی گسترش صرع را پر کنند، زیرا مطالعه نقش میکروگلیاها در صرع می‌تواند به درمان‌های بهتر برای تسکین بیماری صرع منجر شود.

نتیجه‌گیری

تعداد نورون‌ها و نوروگلیا به‌دنبال فعالیت‌های تشنجی مزمن در قسمت‌های مختلف هیپوکامپ کاهش می‌یابد که به‌دنبال استفاده از کابرگولین به‌عنوان داروی کاهنده پرولاکتین جلوی این تغییرات گرفته شده است که این امر نشان‌دهنده احتمال زیاد ارتباط بین تعداد سلول‌های عصبی و میزان پرولاکتین در رخداد فعالیت‌های تشنجی است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه در کمیته اخلاق زیست‌پزشکی دانشگاه تبریز تأیید شده است (۶۴۶/ص-۱۴۰۱/۰۲/۲۷).

حامی مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه تبریز انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی، طراحی، جمع‌آوری و تفسیر داده‌ها، تأمین مالی و نظارت: یوسف پناهی؛ تهیه پیش‌نویس اولیه: یوسف پناهی و محمدحسین حاجتی پیشوری؛ ویرایش، بررسی و تجزیه‌وتحلیل داده‌ها: غلامرضا حمیدیان.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از بخش فیزیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز به‌ویژه جناب آقای دکتر وفایی سیاح به‌واسطه تسهیل استفاده از امکانات آزمایشگاهی ایشان تقدیر و تشکر می‌شود.

References

[1] Hiragi T, Ikegaya Y, Koyama R. Microglia after seizures and in epilepsy. Cells. 2018; 7(4):26. [DOI:10.3390/cells7040026] [PMID] [PMCID]

[2] Fellin T, Haydon PG. Do astrocytes contribute to excitation underlying seizures? Trends in Molecular Medicine. 2005; 11(12):530-3. [DOI:10.1016/j.molmed.2005.10.007] [PMID]

[3] Clasadonte J, Haydon PG. 46 astrocytes and epilepsy. In: Noebels J, editor. Jasper's basic mech epilepsies. Oxford: Oxford Academic; 2012. [DOI:10.1093/med/9780199746545.003.0046]

[4] Amiri M, Bahrami F, Janahmadi M. On the role of astrocytes in epilepsy: A functional modeling approach. Neuroscience Research. 2012; 72(2):172-80. [DOI:10.1016/j.neures.2011.11.006] [PMID]

[5] Bauer J. Interactions between hormones and epilepsy in female patients. Epilepsia. 2001; 42 (Suppl 3):20-2. [DOI:10.1046/j.1528-1157.2001.042suppl.3020.x] [PMID]

[6] Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. Endocrine Reviews. 1998; 19(3):225-68. [DOI:10.1210/edrv.19.3.0334] [PMID]

[7] Henkel ND, Smail MA, Wu X, Enright HA, Fischer NO, Eby HM, et al. Cellular, molecular, and therapeutic characterization of pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy. Scientific Reports. 2021; 11(1):19102. [DOI:10.1038/s41598-021-98534-3] [PMID] [PMCID]

[8] Anagnostou I, Reyes-Mendoza J, Morales T. Glial cells as mediators of protective actions of prolactin (PRL) in the CNS. General and Comparative Endocrinology. 2018; 265:106-10. [DOI:10.1016/j.ygcen.2018.01.024] [PMID]

[9] DeGiorgio CM, Tomiyasu U, Gott PS, Treiman DM. Hippocampal pyramidal cell loss in human status epilepticus. Epilepsia. 1992; 33(1):23-7. [DOI:10.1111/j.1528-1157.1992.tb02278.x] [PMID]

[10] Fisher RS. Serum prolactin in seizure diagnosis: Glass half-full or half-empty? Clinical Practice. 2016; 6(2):100-1. [DOI:10.1212/CPJ.0000000000000228] [PMID] [PMCID]

[11] Dhir A. Pentylenetetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. Current protocols in neuroscience. 2012; Chapter 9:Unit9.37. [DOI:10.1002/0471142301.ns0937s58] [PMID]

[12] Talos DM, Chang M, Kosaras B, Fitzgerald E, Murphy A, Folkerth RD, et al. Antiepileptic effects of levetiracetam in a rodent neonatal seizure model. Pediatric Research. 2013; 73(1):24-30. [DOI:10.1038/pr.2012.151] [PMID] [PMCID]

[13] Kharlip J, Salvatori R, Yenokyan G, Wand GS. Recurrence of hyperprolactinemia after withdrawal of long-term cabergoline therapy. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2009; 94(7):2428-36. [DOI:10.1210/jc.2008-2103] [PMID] [PMCID]

[14] Walløe S, Pakkenberg B, Fabricius K. Stereological estimation of total cell numbers in the human cerebral and cerebellar cortex. Frontiers in Human Neuroscience. 2014; 8:508. [DOI:10.3389/fnhum.2014.00508] [PMID] [PMCID]

[15] Golub VM, Brewer J, Wu X, Kuruba R, Short J, Manchi M, et al. Neurostereology protocol for unbiased quantification of neuronal injury and neurodegeneration. Frontiers in Aging Neuroscience. 2015; 7:196. [DOI:10.3389/fnagi.2015.00196] [PMID] [PMCID]

[16] Shukla G, Bhatia M, Vivekanandhan S, Gupta N, Tripathi M, Srivastava A, et al. Serum prolactin levels for differentiation of nonepileptic versus true seizures: Limited utility. Epilepsy & Behavior. 2004; 5(4):517-21. [DOI:10.1016/j.yebeh.2004.03.004] [PMID]

[17] Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SH, Schousboe A, Haydon PG, et al. Glial cells in (patho) physiology. Journal of Neurochemistry. 2012; 121(1):4-27. [DOI:10.1111/j.1471-4159.2012.07664.x] [PMID] [PMCID]

[18] Amiri M, Bahrami F, Janahmadi M. Functional contributions of astrocytes in synchronization of a neuronal network model. Journal of Theoretical Biology. 2012; 292:60-70. [DOI:10.1016/j.jtbi.2011.09.013] [PMID]

[19] Holmes GL, Gairsa JL, Chevassus-Au-Louis N, Ben-Ari Y. Consequences of neonatal seizures in the rat: Morphological and behavioral effects. Annals of Neurology. 1998; 44(6):845-57. [DOI:10.1002/ana.410440602] [PMID]

[20] Eyo UB, Murugan M, Wu L. Microglia-neuron communication in epilepsy. Glia. 2017; 65(1):5-18. [DOI:10.1002/glia.23006] [PMID] [PMCID]