Archive of SID

تشنج ناشی از پنتیلن ترازول موجب بیان تظاهر c-*fos* در مغز موش صحرایی می گردد

دکتر پروین بابایی*-دکتر بهرام سلطانی**

*استادیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

** استادیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

چکیده

مقدمه: یکی‌از مهم‌ترین موضوعات بیولوژی نوین، توصیف مکانیزم‌های مولکولی سازگاری موجودات به محرک‌های محیطی است. در این زمینه پروتواونکوژن c-*fos* که شاخصی مفید جهت ردیابی محرک‌ها در سیستم عصبی به شمار می رود، از اهمیت بسزایی برخوردار است. c-*fos* به عنوان یک فاکتور نسخه بردار توسط سیگنال‌های محیطی به طور اختصاصی القاء و سبب تنظیم تظاهر ژن‌های هدف می گردد.

هدف: در این مطالعه بر آن شدیم تا ساختمان‌های مغزی را که در جریان تشنج دچار افزایش فعالیت نورونی می شوند، با تکنیک بیان ژن c-*fos* ردیابی کنیم.

مواد و روش ها: در مطالعه حاضر پنتیلن ترازول به عنوان داروی تشنج زا به مقدار ۶۵mg/kg و به طریق داخل صفاقی به موش صحرایی تزریق و سپس دو ساعت بعد از ایجاد تشنج، مغز حیوانات گروه کنترل و آزمایش هم‌زمان جهت پروسه ایمونوهیستوشیمی آماده گردید. در این تکنیک آنتی بادی c-*fos*، کیت ABC و DAB ، جهت شناسایی نورون‌های دارای پروتئین FOS مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان می دهد ژن c-*fos* متعاقب تشنج ناشی از داروی پنتیلن ترازول در مناطق گیروس دنتال، هیپوکامپ، قشر حسی و سیستم لیمبیک بیان می گردد و احتمال داردFOS به عنوان یک پروتئین هسته ای به DNA متصل و سبب ایجاد پاسخ‌های طولانی مدت اختصاصی به تشنج و شکل پذیری سیناپسی در راستای تطابق و سازگاری گردد.

نتیجه گیری: از آنجا که پروتئین FOS قادر به اتصال به بخش تنظیمی ژن‌های هدفی چون پروانکفالین می‌باشد و این ماده به طور وسیعی بعد از تشنج رها می‌گردد، لذا کشف ارتباط FOS و ژن‌های هدف در شکل گیری پاسخ مناسب سیستم عصبی و ایجاد سازگاری ازاهمیت قابل توجهی برخوردار است.

کلید واژه ها: پنتیلن ترازول/ تشنج / سی فوس (c-*fos*) / مغز

مقدمه

سیستم عصبی علاوه بر تغییرات سریع و متوسط از نظر زمانی، قادر به ایجاد تغییرات طولانی مدت نیز می باشد که چنین تغییراتی در ارتباط نزدیک با برنامه ظهور و بیان ژن (gene expression) و پروتئین‌سازی است. برخی محرک ها قادر به ارسال مولکول‌های پیامبر از سطح غشاء به درون سلول و اعمال اثرات مستقیمی بر ژنوم می‌باشند(همانند هورمون های استروئیدی و تیروئیدی) در حالی‌که گروه دیگر از محرک‌های خارج سلول از طریق بیان ژن‌های بلافصل اثر (Immediate early gene) منجر به فعال‌شدن و ایجاد پاسخ‌های مناسب می‌گردند (۱، ۲ و۱۲). دراین میان ژن c- *fos* به عنوان یک تنظیم‌گر عمومی در پاسخ به محرک های گوناگون خارج سلولی به طور سریع و گذرا در هسته بیان می‌شود و سپس از طریق ساختن پروتئین نسخه بردار FOS بر ژن‌های هدف مرتبط با محرک تأثیر می‌گذارد. فعالیت پروتواونکوژن c-*fos* در پاسخ به محرک‌هایی چون میتوژن‌ها، فاکتورهای رشد و بیومدولاتورها موجب شده از آن به طوروسیعی به‌عنوان مارکر آناتومیکی جهت مطالعه نواحی فعال‌شده توسط محرک استفاده گردد(۱، ۲، ٤و۱۲). مطالعه نواحی مغز با روش کیندلینگ امروزه جهت بررسی صرع که یکی از

www.SID.ir

Archive of SID

اختلالات عصبی و مشکلات پزشکی است مورد توجه محققین این رشته می‌باشد. بدین منظور می‌توان از جریان الکتریکی یا مواد شیمیایی جهت ایجاد تشنج استفاده کرد(٦و٧). دراین میان پنتیلن تترازول (PTZ) Pentylenetetrazol یکی از مواد تشنج زای سیستمیک است که به جهت فعال‌سازی نسبی هم‌زمان نورون‌ها از اهمیت خاصی در تحقیقات برخوردار است(٣). از آنجا که یکی از ساختمان‌های حساس به تشنج و مواد تحریکی هیپوکامپ می‌باشد و مطالعه آن مدلی خوب برای درک فعالیت‌های سیستم عصبی به شمار می‌رود(٩) در تحقیق حاضر برآن شدیم تا الگوی برانگیختگی ژن c- *fos* را در مغز به خصوص ناحیه هیپو کامپ متعاقب تزریق تک دوز PTZ (داخل صفاقی) بررسی کنیم.

مواد و روش ها

مواد و داروها: پنتیلن تترازول (PTZ)، دی امینو بنزوییدین (DAB) و پلی - ال-لایزین از شرکت سیگمای انگلستان، کیتABC از شرکت VECTOR LABآنتی بادی c-*fos* از شرکت Oncogene Products و آنتی بادی ثانویه بیوتینه شده از شرکت AMERSHAM انگلستان خریداری گردیدند.

حیوانات: در این تحقیق تجربی از موش های صحرایی نر نژاد wistar با وزن بین ٢٥٠-١٨٠ گرم استفاده شد. حیوانات در اتاقی با درجه حرارت ٢±٢٤ درجه سانتیگراد و شرایط نوری ١٢ ساعت روشنایی و ١٢ ساعت تاریکی نگهداری شدند. آب و غذا به طور آزاد در اختیار آنها قرار داشت. حیوانات به سه گروه تقسیم شدند:گروه اول یا گروه آزمایش داروی PTZ دریافت کردند(n=10) گروه دوم به جای دارو آب مقطر دریافت می‌کردند(n=6) و گروه سوم(n=5) هیچ تزریقی دریافت نکردند. حیوانات قبل از آزمایش حداقل ٤ بار روزی یک‌بار جهت handling به اتاق آزمایش منتقل شدند(١٢).

ایجاد کیندلینگ در حیوانات: به منظور ایجاد کیندلینگ PTZ با دوز mg/kg ٦٥ به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. حدود ٥-٢ دقیقه بعداز ترزیق علایم تشنج در موش‌ها ظاهر شد(انقباض عضلات صورت و گوش‌ها، انقباض بدن، پرش های میوکلونیک، ایستادن روی دوپا و افتادن به پهلو و پشت) و این فعالیت ها به طور پراکنده‌ای در طول ٢٠ دقیقه پس از ترزیق نیز مشاهده شد. حیواناتی که دراین فاصله زمانی علائم تشنج نشان نداده و یا در اثر دارو مردند از مطالعه حذف شدند. حیوانات گروه کنترل که به جایPTZ، آب مقطر هم حجم دارو به طور هم‌زمان دریافت می کردند و گروه intact که هیچ تزریقی دریافت نمی‌کردند، هم‌زمان با حیوانات گروه آزمایشی کشته شده و آزمایشات ایمونوهیستوشیمی روی مغز آنهاانجام گرفت.

ایمونوهیستوشیمی: جهت مطالعه برش های مغز از تکنیک ایمونوهیستوشیمی استفاده شد(٥). بدین منظور حیوانات دو ساعت پس از دریافت PTZ یا آب مقطر با گیوتین کشته شده و مغز آنها سریعاً جدا و به نیتروژن مایع منتقل، سپس بافت جهت تهیه برش به دستگاه میکروتوم کرایوستات٢٠- درجه سانتیگراد انتقال یافت. برش‌های٢٠ میکرونی‌تهیه و برروی لام‌های آغشته به پلی-ال - لایزین منتقل‌می‌شدند. پس‌ازتهیه‌برش‌ها،عمل‌فیکس کردن بافت‌ها در پارافرمالدئید٤٪ به مدت ١٥دقیقه انجام وسپس بافت‌ها در محلول بافر فسفات(PBS) (PH=٧/٤) به مدت ١٥ دقیقه، سه بار و هر بار ٥ دقیقه شستشو می‌شدند. لام‌ها به مدت ٢٤ ساعت در آنتی بادی c-*fos* با تیتر ١/١٠٠٠ انکوبه می‌شدند. پس از اتمام مدت مذکور لام‌ها با PBS شستشو و سپس در آنتی بادی ثانویه به مدت دو

www.SID.ir

Archive of SID

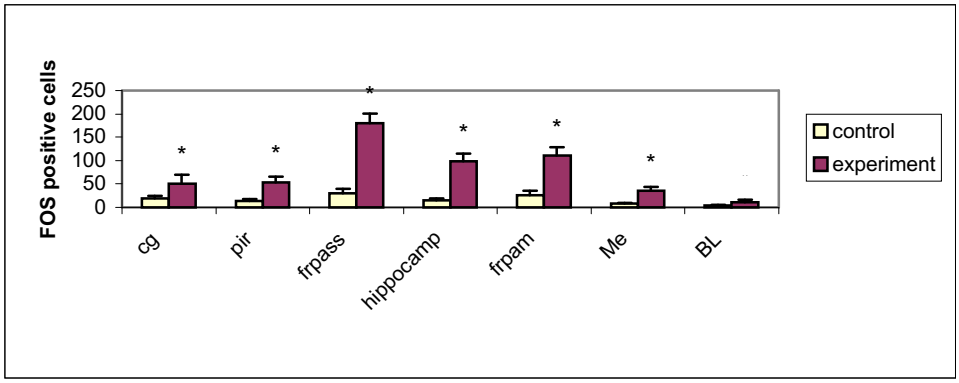
ساعت انکوبه شده و پس‌از شستشو با PBS نهایتاً از کیت ABC و DAB جهت رنگ آمیزی و تعیین هسته‌های FOS مثبت استفاده گردید(۵). لام‌های تهیه شده بعد از رنگ‌آمیزی و آبگیری با لامل پوشانده شده و زیر استریومیکروسکوپ و براساس اطلس نوروآناتومیک Paxinus & Watson مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به صورت میانگین mean±S.E.M بیان غلظت‌های ۱/۱۰۰۰۰، ۱/۲۰۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۸۰۰ و ۱/۵۰۰ از آنتی بادی FOS مورد بررسی قرار گرفت(نتایج گزارش نشده است) برای ادامه کار مناسب‌ترین غلظت آنتی‌بادی ۱/۱۰۰۰ انتخاب شد و کلیه آزمایشات با این غلظت انجام پذیرفت. همچنین برای حصول اطمینان از پروتئین مشخص شده لام‌های کنترل بدون AbI، بدون AbII و بدون ABC تعبیه شده‌بود که هیچکدام دارای سلول FOS مثبت نبودند. بررسی نتایج ایمونوهیستوشیمی نشان‌دهنده بیان ناچیزی از ژن c-*fos* در نقاط پراکنده‌ای از قشر مغز موش‌های کنترل بود که از نظر آماری نسبت به گروه intact تفاوت معنی‌داری نداشت. لذا مقایسه گروه دارو فقط با گروه intact صورت گرفته است.

با تزریق دوز ۶۵ mg/kg از PTZ به موش ها همه آنها مراحل مختلف تشنج را نشان دادند از میان حیوانات فقط دو مورد به دلیل تشنج زیاد مردند که مغز آنها از مطالعه حذف گردید. مشاهدات میکروسکوپی بیانگر بیان ژن c-*fos* به تعداد زیاد و در مناطق هیپوکامپ، آمیگدال، سیستم لیمبیک، کورتکس حسی وحرکتی و پریفورم مغز موش‌های گروه PTZ می‌باشد که از نظر آماری نسبت به گروه intact کاملاً معنی دار بود($P< ۰/۰۰۱$)(نمودار ۱). تصاویر ۱و ۲ شدت بالایی از بیان ژن c-*fos* را در هیپوکامپ و پریفورم مغز موش‌های گروه PTZ نشان می‌دهد. تصویر 1C منطقهٔ هیپوکامپ را با بزرگنمایی بیشتر نشان می‌دهد سلول‌های عصبی FOS مثبت به صورت دانه‌های قهوه‌ای رنگ تیره دیده می شوند الگوی اکسپرس FOS در هیپوکامپ و قشر مغز دو نیمکره مغزی قرینه بوده و هیچ گونه اختلاف معنی دار بین آنها از نظر بیان ژن در ساختمان های مذکور مشاهده نشد.

گردیده و آنالیز آماری توسط ANOVA و t- student جهت مقایسه تعداد سلول‌های FOS مثبت گروه‌ها صورت گرفت.

نتایج

در مرحـله اول جهت تعیین تیتراژ مناسب آنتی‌بادی FOS،

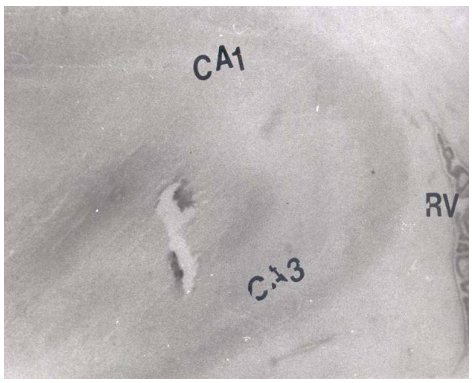


کورتکس سینگولی= cg ، پیریفورم= pir ، کورتکس حرکتی= frpam ، هیپوکامپ= hippocamp ، کورتکس حرکتی= frpam ، هسته مرکزی آمیگدال= Me ، هسته قاعده‌ای جانبی آمیگدال= BL

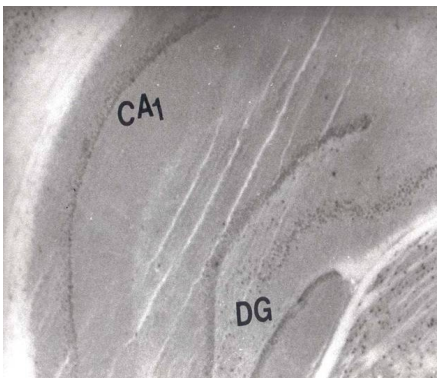
www.SID.ir

Archive of SID

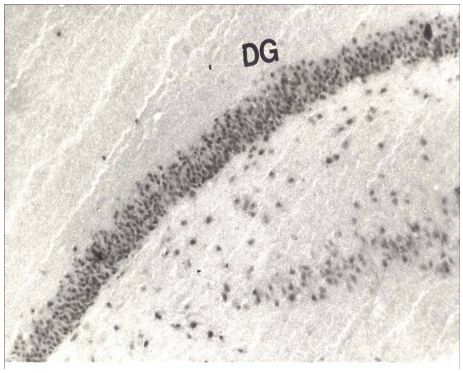
نمودار ۱: تعداد سلول های FOS مثبت در مغز موش های صحرایی که PTZ دریافت کرده اند(n=۵) و گروه intact که هیچ دارویی‌دریافت نکرده‌بودند(n=٤). شمارش درمحدوده۱۰۰میکرومترمربع واعداد به صورتmean±S.E.M و P<0.001 *



(تصویر 1a)



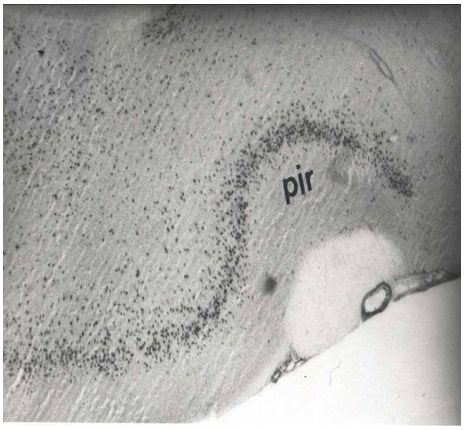
(تصویر 1b)



(تصویر 1c)

تصویر ۱: فوتومیکروگرف از بخش های مختلف هیپوکامپ موش صحرایی که **PTZ** دریافت کرده است. برانگیختگی شدیدی از***c-fos*** در هیپوکامپ علی الخصوص شکنج دندانه ای **(DG)** مشهود است.

(تصویر 2a)



(تصویر 2b)

تصویر ۲: فوتومیکروگرف از بخش‌های مختلف کورتکس پیریفورم موش صحرایی که PTZ دریافت کرده است. برانگیختگی شدیدی از *c-fos* در آن مشهود است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل ازاین تحقیق نشان می دهد که یک تزریق منفرد پنتیلن تترازول (٦٥ mg/kg) سبب تحریک بیان ژن c-*fos* در مناطق خاصی از مغز می گردد که در این میان هیپوکامپ و قشرمغز بالاترین میزان را دارا هستند. این دو ساختمان مراکزی هستند که از نظر پاسخ به تشنج دارای اهمیت می‌باشند. هیپوکامپ برانگیختگی شدیدی از c-*fos* را در شکنج دندانه‌ای (DG)، بخش‌های CA4, CA3 نشان می دهد. هیپوکامپ مرکزی است که در شروع، انتشار و خاتمه تشنج دخالت دارد (٩) . مشاهده ما در هیپوکامپ توسط نتایج تحقیق قبلاً نیز توسط گروه Smith و همکاران گزارش شده است که احتمالاً به دلیل فعالیت حسی و حرکتی در پاسخ به استرس یا محرک‌های دیگر می‌باشد(١٢). درباره مکانیسم اثر پنتیلن تترازول بر بیان ژن c-*fos* اطلاعات دقیقی در دست نیست. PTZ دارویی است که با محل اتصال بنزودیازپینی گیرنده های گابا متصل و باعث مهار گابا و در نتیجه افزایش فعالیت تحریکی نورونی می‌گردد (١٤). احتمال دارد این دارو نه به طور مستقیم بلکه به دلیل فعال‌سازی توده‌ای نورون‌های مغز سبب اکسپرس c-*fos* گردد(٩). تحقیقات Dragunow و همکاران ضمن تأیید نتایج تحقیق ما بیان می دارد که استفاده از بنزودیازپین قادر است چنین القای ژن c-*fos* متعاقب استعمال PTZ را به طور کامل کاهش دهد(٣). با استفاده از این مطالعات و مشاهدات ما می‌توان احتمال داد که پروتواونکوژن c-*fos* به سرعت در این شرایط بیان و منجر به فعال شدن ژن‌های هدف ثانویه همانند انکفالین، نوروپپتید y، رسپتورهای گابا و یا دیگر ژن‌های ناشناخته گشته وآنها نیز به نوعی در القای Dragunow و همکارانش(٣)، Mihaly و همکاران(٨) و Yaunt و همکاران (١٥) تأیید می‌گردد. همان‌گونه که تصاویر نشان می‌دهد اکسپرس ژن c-*fos* در قشر مغز در لایه‌های دوم، چهارم و پنجم به طور ویژه بیشتر از دیگر لایه‌ها بوده و در لایه اول اکسپرس مشاهده نمی‌گردد که این نتیجه نیز توسط مشاهدات Sagar و همکاران تأیید می‌گردد(١٥). مقادیر ناچیزی از FOS در مراکز پیریفورم و کورتکس سینگولی، بویایی و حرکتی حیوانات کنترلی دیده می‌شود چنین مشاهده‌ای

تغییرات دائمی و شکل‌پذیری عصبی متعاقب تشنج نقش ایفا می‌کنند(٤، ١٣و١٥). احتمال وجودچنین نقشی برای Fos به عنوان یک پروتئین هسته‌ای که قادر به اتصال به DNA و اعمال تغییراتی در تعداد گیرنده ها و یا مدارهای هیپوکامپ باشد دور از انتظار نیست.چنین تغییراتی در ساختمان هیپوکامپ به دنبال کیندلینگ شیمیایی بر روی برش‌های مغز قبلاً گزارش شده است (١١). Rocha و همکاران یک نقش حفاظتی را برای c-*fos* در برابر تشنج‌های بعدی مطرح کرده‌اند(٦). به طور خلاصه نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که PTZ موجب افزایش بیان ژن c-*fos* به عنوان یک ژن بلافصل اثر گشته و تغییرات دائمی متعاقب تشنج را احتمالاً بر عهده دارد. از آنجا که که پروتئین FOS یک پیامبر ثالث بوده و قادر به کنترل دسته زیادی از ژن‌های افکتور مسئول تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک می‌باشد، ضروری است برای درک بهتر پدیدهٔ تشنج و اختلالات متعاقب آن، ژن‌های ثانویه مرتبط با c-*fos* با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی دوبل شناسایی و مطالعه گردند.

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدردانی

این تحقیق از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گیلان انجام شده و بدین وسیله از کلیه مسئولین و همکاران محترم حوزه پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، هم چنین خانم دکتر خدیجه کیانی از دانشگاه لیورپول انگلیس به جهت مساعدت در تهیه آنتی بادی c-*fos* تشکر و قدر دانی می گردد.

منابع

1.Curran T, Morgan J I. Memories of Fos. Bio Essays 1987: 7: 255-258.

2.Doug WS, Trevor A D. Neurochemical Identification of fos- Positive Neurons using two Colour Immunoperoxidase Staining. J Neurosci Methods 1993: 479: 73-83.

3.Dragunow M, Robertson HA. Localization and Induction of c-fos Protein Like Immunoreactive Material in the Nuclei of Adult Mammalian Neurons. Brain Res 1988: 440: 252-260.

4.Guzowski J E, Setlow B, Wagner E K, Mc Gaugh JL. Experience-dependent Gene Expression in the Rat Hippocampus after Spatial Learning. J Neurosci 2001: 21(14): 5089-5098.

5.Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of Avidin-Biotin Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques. J Histochem Cytochem 1981: 29: 577-585.

6.Kamphuis W, Deriy T C, Talamini LM, Lopes Da Silva FH. Rat Hippocampal Kindling Induces Changes in the Glutamate Receptor mRNA Expression Patterns in Dentate Granule Neurons. Eur J Neurosci 1994: 6: 1119-1127.

7.Kamphuis W, Huisman E, Veerman M J, Lopes Da Silva FH. Development of Changes in Endogenous GABA Release During Kindling Epileptogenesis in Rat Hippocampus. Brain Res 1997: 545: 33-40.

8.Mihaly A, Szakass R. Time-dependent Distribution and Neuronal Localization of c-fos Protein in the Rat Hippocampus Following 4-Aminopyridine Seizure. Epilepsy Res 2001: 44 : 97-108.

9.Psarropoulou C, Matsokis N, Kostopoulous G. Pentylenetetrazol-induced Seizures Decrease γ Amino Butyric Acid-medicated Recurrent Inhibition and Enhance Adenosine-mediated Depression. Epilepsia 1994: 35: 12-19.

10.Rocha L, Kaufman DL. In Vivo Administration of c-fos Antisense Oligonucleotides Accelerates Amygdal Kindling. Neurosci Lett 1998: 241: 111-114.

11.Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-*fos* Protein in Brain: Metabolic Mapping at the Cellular Level. Science 1988: 240: 1328-1330.

12.Smith MA, Banerjee S, Glowa J. Induction of c-f*os* mRNA in rat Brain by Conditioned and Unconditioned Stressors. Brain Res 1992: 578: 135-141.

13.Sonnenberg JL, Leon PF, Curran T, Morgan JI. Dynamic Alterations Occurs in the Levels and Composition of Transcription Factor AP-1 Complex after Seizure. Neuron 1989: 3: 359-65.

14.Taylor CD. How dose Seizures Begin Clues from Hippocampal Slices. Tins 1988: 11: 375-378.

15.Yount GL, Ponsalle P, White JD. Pentylentetrazole-Induced Seizures Stimulate Transcription of Early and Late Response Genes. Molecular Brain Res 1994: 21: 219-224.

www.SID.ir

Archive of SID

Pentylentetrazol- Induced Seizure Induces Immediate Early Gene c-*fos* in Rat Brain

Babaei P., Soltani B.

Abstract

Introduction: One of the most important subjects in modern biology is to explain the molecular mechanisms by which an organism adapts in response to environmental signals. In this area, the protooncogene c-*fos* is widely used as a useful marker for tracing stimuli in the nervous system. It is considered as a general transcription factor, which can regulate expression of related target genes.

Objective: The purpose of this research was to study the brain structures involved in seizure using c-fos expression mapping.

Materials and Methods: In this study, we used pentylentetrazole 65mg/kg, i.p, as a kindling inducing drug and approximately two hours after the drug usage, immunohistochemical analysis was performed using immunoperoxidase staining with c-*fos* antibody, ABC kit and DAB.

Results: Results showed a dramatic and specific induction of c-*fos* in the nuclei of neurons in dentate gyrus, hippocampus, somatosensory cortex and limbic system.

Conclusion: It is possible that FOS, a nuclear protein binding to the regulatory part of some target genes such as proenkephaline which is widely released after seizure can contributes to neural plasticity.

Therefore, finding the relationship of FOS with target genes in forming appropriate response in nervous systems plasticity is of great importance.

Key words: Brain/ c-*fos*/ Immediate Early Genes/ Pentylentetrazol/ Seizure

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir