

## تشنج ناشی از پنتیلین تترازول موجب بیان تظاهر *c-fos* در مغز موش

### صحرائی 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: یکی از مهم‌ترین موضوعات بیولوژی نوین، توصیف مکانیزم‌های مولکولی سازگاری موجودات به محرک‌های محیطی است. در این زمینه پروتئوونکوژن *c-fos* که شاخصی مفید جهت ردیابی محرک‌ها در سیستم عصبی به شمار می‌رود، 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 می‌گردد. هدف: در این مطالعه بر آن شدیم تا ساختمان‌های مغزی را که در جریان تشنج دچار افزایش فعالیت نورونی می‌شوند، با تکنیک بیان ژن *c-fos* ردیابی کنیم. مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر پنتیلین تترازول به عنوان داروی تشنج‌زا به مقدار  $65\text{mg/kg}$  و به طریق داخل صفاقی به موش صحرائی 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 می‌دهد ژن *c-fos* متعاقب تشنج ناشی از داروی پنتیلین تترازول در مناطق گیروس دنتال، هیپوکامپ، قشر حسی و سیستم لیمبیک بیان می‌گردد و احتمال دارد FOS به عنوان یک پروتئین هسته ای به DNA متصل و سبب ایجاد پاسخ‌های طولانی مدت اختصاصی به تشنج و شکل‌پذیری سیناپسی در راستای تطابق و سازگاری گردد. نتیجه‌گیری: 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 شکل‌گیری پاسخ مناسب سیستم عصبی و ایجاد سازگاری از اهمیت قابل توجهی برخوردار است.

کلید واژه‌ها: پنتیلین تترازول / تشنج / سی فوس (*c-fos*) / مغز

#### مقدمه

(۱، ۲ و ۱۲). در این میان ژن *c-fos* به عنوان یک تنظیم‌گر عمومی در پاسخ به محرک‌های 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 پروتئوونکوژن *c-fos* در پاسخ به محرک‌هایی چون میتوژن‌ها، فاکتورهای رشد و بیومدولاتورها موجب شده از آن به طور وسیعی به عنوان مارکر آناتومیکی جهت مطالعه نواحی فعال‌شده توسط محرک استفاده گردد (۱، ۲، ۴ و ۱۲). مطالعه نواحی مغز با روش کیندلینگ امروزه جهت بررسی صرع که یکی از

سیستم عصبی علاوه بر تغییرات سریع و متوسط از نظر زمانی، قادر به ایجاد تغییرات طولانی مدت نیز می‌باشد که چنین تغییراتی در ارتباط نزدیک با برنامه ظهور و بیان ژن (gene expression) و پروتئین‌سازی است. برخی محرک‌ها قادر به ارسال مولکول‌های پیامبر از سطح غشاء به درون سلول و اعمال اثرات مستقیمی بر ژنوم می‌باشند (همانند هورمون‌های استروئیدی و تیروئیدی) در حالی که گروه دیگر از محرک‌های خارج سلول از طریق بیان ژن‌های بلافصل اثر (Immediate early gene) منجر به فعال‌شدن و ایجاد پاسخ‌های مناسب می‌گردند

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 (۷و۶). در این میان پنتیلن تترازول (PTZ) Pentylentetrazol یکی از مواد تشنج زای سیستمیک است که به جهت فعال‌سازی نسبی هم‌زمان نورون‌ها از اهمیت خاصی در تحقیقات برخوردار است (۳). 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 (۹) در تحقیق حاضر بر آن شدیم تا الگوی برانگیختگی ژن *c-fos* را در مغز به خصوص ناحیه هیپوکامپ متعاقب تزریق تک دوز PTZ (داخل صفاقی) بررسی کنیم.

#### مواد و روش‌ها

مواد و داروها: پنتیلن تترازول (PTZ)، دی‌امینو بنزوبیدین (DAB) و پلی - ال - لایزین از شرکت سیگمای انگلستان، کیت ABC از شرکت VECTOR LAB آنتی 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 موش‌های صحرایی نر نژاد wistar با وزن بین ۱۸۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات در اتاقی با درجه حرارت  $24 \pm 2$  درجه سانتیگراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ 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 ۴ بار

روزی یک‌بار جهت handling به اتاق آزمایش منتقل شدند (۱۲).

ایجاد کیندلینگ در حیوانات: به منظور ایجاد کیندلینگ PTZ با دوز  $65 \text{ mg/kg}$  به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. حدود ۵-۲ دقیقه بعد از تزریق علائم تشنج در موش‌ها ظاهر شد (انقباض عضلات صورت و گوش‌ها، انقباض بدن، پرش‌های میوکلونیک، ایستادن روی دوپا و افتادن به پهلو و پشت) و این فعالیت‌ها به طور پراکنده‌ای در طول ۲۰ دقیقه پس از تزریق نیز مشاهده شد. حیواناتی که در این فاصله زمانی علائم تشنج نشان نداده و یا در اثر دارو مردند از مطالعه حذف شدند. حیوانات گروه کنترل که به جای PTZ، آب مقطر هم حجم دارو به طور هم‌زمان دریافت می‌کردند و گروه intact که هیچ تزریقی دریافت نمی‌کردند، هم‌زمان با حیوانات گروه آزمایشی کشته شده و آزمایشات ایمنو هیستوشیمی روی مغز آنها انجام گرفت.

ایمنو هیستوشیمی: جهت مطالعه برش‌های مغز از تکنیک ایمنو هیستوشیمی استفاده شد (۵). 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 کرایوستات ۲۰- درجه سانتیگراد انتقال یافت. برش‌های ۲۰ میکرونی تهیه و بر روی لام‌های آغشته به پلی-ال - لایزین منتقل می‌شدند. پس از تهیه برش‌ها، عمل فیکس کردن بافت‌ها در پارافرمالدئید ۴٪ به مدت ۱۵ دقیقه انجام و سپس بافت‌ها در محلول بافر فسفات (PBS) ( $\text{PH}=7.4$ ) به مدت ۱۵ دقیقه، سه بار و هر بار ۵ دقیقه شستشو می‌شدند. لام‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آنتی بادی *c-fos* با تیتراژ  $1/1000$  انکوبه می‌شدند. پس از اتمام مدت مذکور لام‌ها با PBS شستشو و سپس در آنتی بادی ثانویه به مدت دو

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

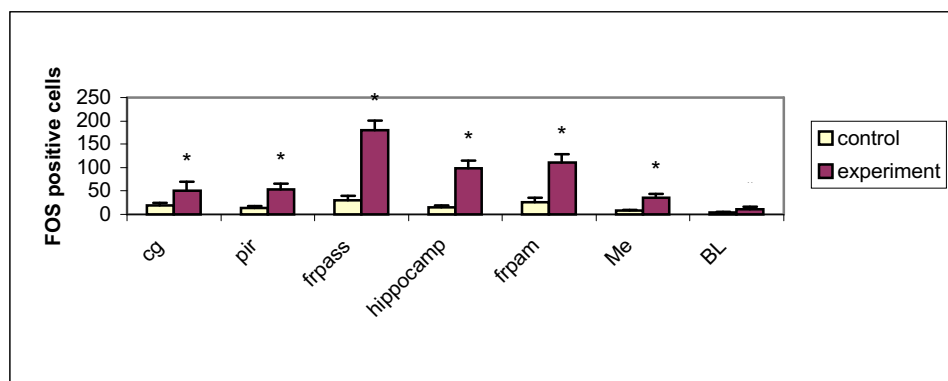
### نتایج

در مرحله اول جهت تعیین تیراژ مناسب آنتی‌بادی FOS،

مطالعه حذف گردید. مشاهدات میکروسکوپی بیانگر آن است که در گروه کنترل (نمودار ۱). تصاویر ۱ و ۲ شدت بالایی از بیان ژن *c-fos* را در هیپوکامپ و پیرفورم مغز موش‌های گروه intact کاملاً معنی دار بود ( $P < 0/001$ ) نسبت به گروه *c-fos* (نمودار ۱). تصاویر ۱ و ۲ شدت بالایی از بیان ژن *c-fos* را در هیپوکامپ و پیرفورم مغز موش‌های گروه PTZ نشان می‌دهد. تصویر 1C منطقه هیپوکامپ را با بزرگنمایی بیشتر نشان می‌دهد سلول‌های عصبی FOS مثبت به صورت دانه‌های قهوه‌ای رنگ تیره دیده می‌شوند 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 ساختمان‌های مذکور مشاهده نشد.

ساعت انکوبه شده و پس از 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 نورواناتومیک Paxinus & Watson مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به صورت میانگین  $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$  بیان غلظت‌های ۱/۱۰۰۰۰، ۱/۲۰۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۸۰۰ و ۱/۵۰۰ از آنتی‌بادی 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 شده بود که هیچکدام دارای سلول FOS مثبت نبودند. بررسی نتایج ایمنوهِستوشیمی 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 موش‌ها همه آنها مراحل مختلف تشنج را نشان دادند از میان حیوانات فقط دو مورد به دلیل تشنج زیاد مردند که مغز آنها از

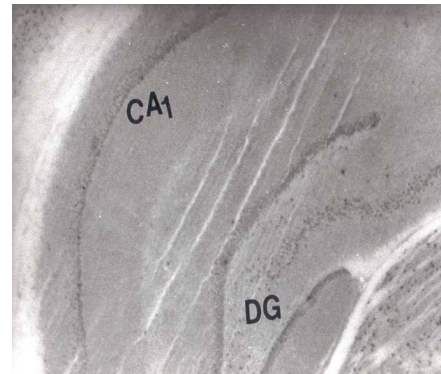


کورتکس سینگولی = cg ، پیرفورم = pir ، کورتکس حرکتی = frpam ، هیپوکامپ = hippocamp ، کورتکس حرکتی = frpam ، هسته مرکزی آمیگدال = Me ، هسته قاعده‌ای جانبی آمیگدال = BL

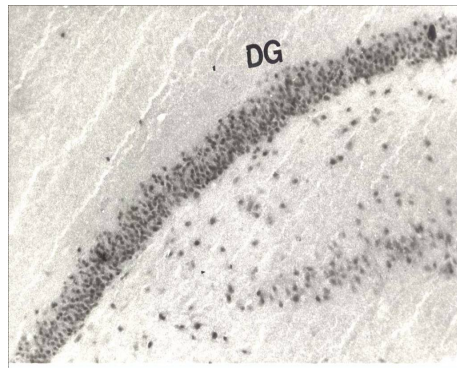
نمودار ۱: تعداد سلول های FOS مثبت در مغز موش های صحرایی که PTZ دریافت کرده اند (n=5) و گروه intact که هیچ دارویی دریافت نکرده بودند (n=4). شمارش در محدوده ۱۰۰ میکرومتر مربع اعداد به صورت  $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$  و  $P < 0.001$ \*



(تصویر 1a)

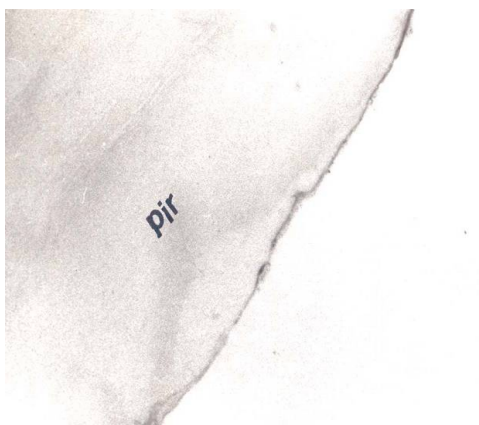


(تصویر 1b)

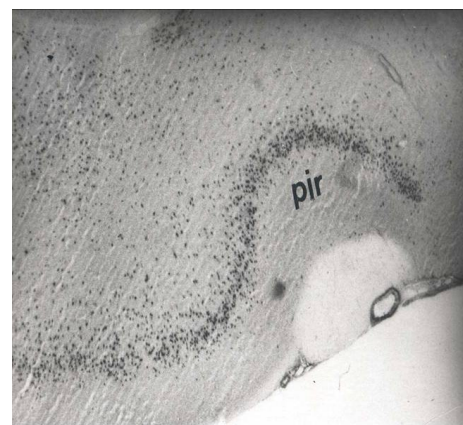


(تصویر 1c)

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



(تصویر 2a)



(تصویر 2b)

تصویر ۲: فوتومیکروگراف از بخش های مختلف کورتکس پیرفورم موش صحرایی که PTZ دریافت کرده است. برانگیختگی شدیدی از *c-fos* در آن مشهود است.

## بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که یک تزریق منفرد پنتیلن تترازول (65 mg/kg) سبب تحریک بیان ژن *c-fos* در مناطق خاصی از مغز می گردد که در این میان هیپوکامپ و قشر مغز بالاترین میزان را دارا هستند. این دو ساختمان مراکز هستند که از نظر پاسخ به تشنج دارای اهمیت می باشند. هیپوکامپ برانگیختگی شدیدی از *c-fos* را در شکنج دندانهای (DG)، بخش های CA3, CA4 نشان می دهد. هیپوکامپ مرکزی است که در شروع، انتشار و خاتمه تشنج دخالت دارد (9). 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 محرک های دیگر می باشد (12). 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 می گردد (14). احتمال دارد این دارو نه به طور مستقیم بلکه به دلیل فعال سازی توده های نورون های مغز سبب اکسپرس *c-fos* گردد (9). 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 (3). با استفاده از این مطالعات و مشاهدات ما می توان احتمال داد که پروتوانکوژن *c-fos* به سرعت در این شرایط بیان و منجر به فعال شدن ژن های هدف ثانویه همانند انکفالین، نوروپتید y، رسپتورهای گابا و یا دیگر ژن های ناشناخته گشته و آنها نیز به نوعی در القای

Dragunow و همکارانش (3)، Mihaly و همکاران (8) و Yaunt و همکاران (15) تأیید می گردد. همان گونه که تصاویر نشان می دهد اکسپرس ژن *c-fos* در قشر مغز در لایه های دوم، چهارم و پنجم به طور ویژه بیشتر از دیگر لایه ها بوده و در لایه اول اکسپرس مشاهده نمی گردد که این نتیجه نیز توسط مشاهدات Sagar و همکاران تأیید می گردد (15). مقادیر ناچیزی از FOS در مراکز پیریفورم و کورتکس سینگولی، بویایی و حرکتی حیوانات کنترلی دیده می شود چنین مشاهده ای تغییرات دائمی و شکل پذیری عصبی متعاقب تشنج نقش ایفا می کنند (4، 13 و 15). احتمال وجود چنین نقشی برای Fos به عنوان یک پروتئین هسته ای 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 برش های مغز قبلاً گزارش شده است (11). Rocha و همکاران یک نقش حفاظتی را برای *c-fos* در برابر تشنج های بعدی مطرح کرده اند (6). به طور خلاصه نتایج این تحقیق نشان می دهد که PTZ موجب افزایش بیان ژن *c-fos* به عنوان یک ژن بلا فصل اثر گشته و تغییرات دائمی متعاقب تشنج را احتمالاً بر عهده دارد. از آنجا که پروتئین FOS یک پیامبر ثالث بوده و قادر به کنترل دسته زیادی از ژن های افکتور مسئول تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک می باشد، ضروری است برای درک بهتر پدیده تشنج و اختلالات متعاقب آن، ژن های ثانویه مرتبط با *c-fos* با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی دوبل شناسایی و مطالعه گردند.

علوم پزشکی گیلان، هم چنین خانم دکتر خدیجه کیانی  
از دانشگاه لیورپول انگلیس به جهت مساعدت در تهیه  
آنتی

*c-fos* تشکر و قدر دانی می گردد.

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

#### 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. Pentylentetrazol-induced Seizures Decrease  $\gamma$  Amino Butyric Acid-mediated 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-fos 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.

## 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 contribute 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

