

تأثیر مهار منتشرشونده قشری بر میزان بیان رسپتورهای گلوتامات در مغز رت

The Effect of Cortical Spreading Depression on Glutamate Receptors in Rat Brain

Fatemeh Alipour^{1,2}, Elham mohammadzadeh^{1,3}, Fariba karimzadeh^{1,4}فاطمه علی پور^{۱,۲}، الهام محمدزاده^{۱,۳}، فریبا کریم زاده^{۱,۴}

1. Shefa Neuroscience Research Center, Khatam-al-Anbia Hospital, Tehran, Iran.
2. Kharazmi University of Biological Sciences, Tehran, Iran.
3. Shahid Behshti University of Medical Science, Tehran, Iran.
4. School of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیا، تهران، ایران.
۲. دانشگاه علوم خوارزمی، تهران، ایران.
۳. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۴. دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

مکیده

اطلاعات مقاله

دریافت: ۴ تیر ۱۳۹۲

پذیرش: ۱ مرداد ۱۳۹۲

مقدمه مهار منتشرشونده یک فعالیت بیوالکتریکی ذاتی در سیستم عصبی مرکزی می باشد که نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی بیماری های نورولوژیکی از جمله میگرن با اورا، صرع، فراموشی های منتشر گذرا و بیماری های نخاعی دارد. مواد و روش ها در این مطالعه ابتدا رت های نوجوان جراحی شده و کانول (جهت تزریق دارو ها) و الکترودهای ثبات روی قشر مغزی کاشته شدند. مهار منتشرشونده ی قشری در گروه SD با تزریق KCl به مدت چهار هفته متوالی القا گردید. در گروه شام، محلول رینگر تزریق شد. مغز همه ی رت ها شامل گروه های کنترل، شام و SD خارج شده و مراحل آماده سازی برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی انجام گردید. یافته ها بیان گیرنده NR_{2B} در ناحیه ی CA1 به طور چشمگیری در گروه SD در مقایسه با گروه کنترل و شام افزایش یافت. همچنین افزایش معنی داری در بیان گیرنده ی GluR1 در نواحی CA1 و CA3 در گروه SD مشاهده گردید. نتیجه گیری مهار منتشر شونده، بیان گیرنده NR_{2B} از زیرواحدهای گیرنده های NMDA و گیرنده ی GluR1 از زیر واحدهای گیرنده های AMPA را در مناطق مختلف هیپوکمپ رت های نوجوان افزایش می دهد.

کلید واژه:

مغز،
گلوتامات،
میگرن،
صرع.

Article info:

Received: 25 Jun. 2013

Accepted: 23 Jul. 2013

ABSTRACT

Introduction Spreading depression (SD) is an intrinsic bioelectrical activity in central nervous system which play important role in pathophysiology of some disorders such as migraine with aura, epilepsy, transient global amnesia, and spinal cord diseases. **Materials and methods** The juvenile rats were anesthetized and recording electrodes and cannula were implanted over the brain. Repetitive cortical SD events were induced by KCl injection through the cannula. Four weeks after the KCl or Ringer injection, all rats, including control, sham and SD groups, were decapitated and the brains removed. The distribution of NR_{2B} subunit of NMDA receptors and the GluR1 subunit of AMPA receptors were assessed by immunohistochemical staining. **Results** Expression of NR_{2B} receptors in the CA1 region significantly increased in the SD group compared with the sham and control group ($P < 0.05$). Also expression of GluR1 receptors in the CA1 and CA3 regions significantly increased in the SD group ($P < 0.01$). **Conclusion** Our result showed that SD enhanced expression of the NR_{2B} subunit of NMDA receptors and the GluR1 subunit of AMPA receptors in various regions of the juvenile rat brain.

Key words:

Brain,
Glutamates,
Migraine Disorders,
Epilepsy.

* Corresponding Author:

Fariba Karimzadeh

E-mail: Fariba_karimzade@yahoo.com

• نویسنده مسئول:

فریبا کریم زاده

آدرس الکترونیکی: Fariba_karimzade@yahoo.com

مقدمه

و گیرنده GluR1 از زیر واحدهای گیرنده های AMPA ارتباط این گیرنده ها و آسیب نورونی مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت.

مواد و روش ها

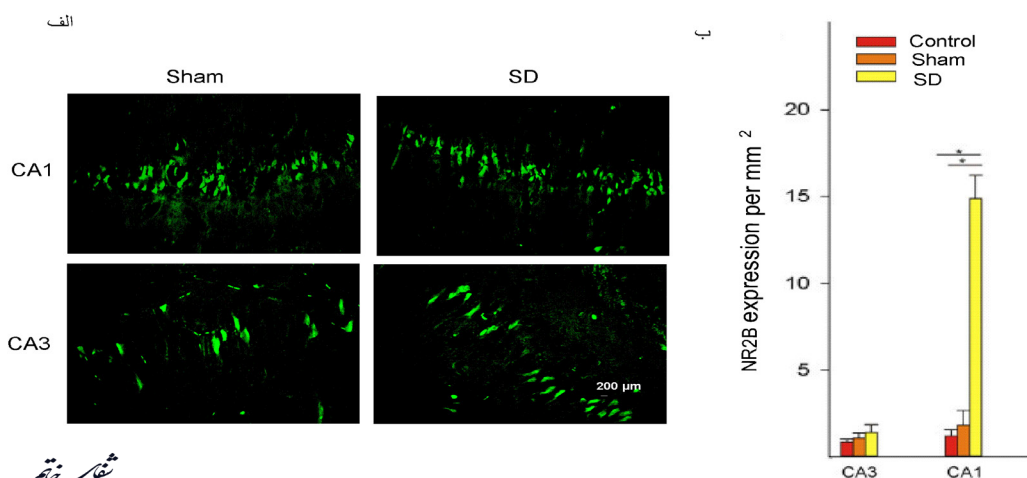
حیوانات

۴۰ رت نر جوان ویستار (۳۵-۲۵ روزه، ۹۰-۴۵ g) در شرایط استاندارد از نظر دسترسی به آب و مواد غذایی، نور (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)، رطوبت (۵۵-۵۰ درصد) و درجه حرارت 22 ± 2 درجه ی سانتی گراد نگهداری شدند. همه ی آزمایشات بر طبق اساسنامه تصویب شده توسط کمیته ی اخلاقی حیوانات مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، تهران، ایران انجام شد.

دستورالعمل جراحی

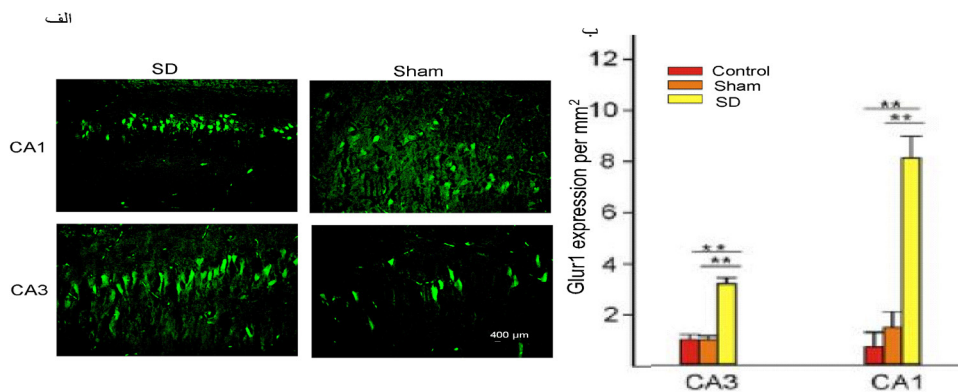
حیوانات با تزریق کتامین (Sigma; ۱۵۰ mg/kg) و زایلازین (Rompun®; Bayer ۰/۱ mg/kg) به صورت درون صفاقی بیهوش شدند و سر آن ها در داخل دستگاه استریوتکس (Stoelting Instruments, USA) قرار داده شد. کانول راهنمای درجه ی ۲۳ و دو الکترو نقره (هر بخش ۳-۲ میلی متر) بر روی قشر حسی-پیکری قرار داده شدند و توسط سیمان آکریلیک دندان پزشکی ثابت شدند. بعد از بخیه، حیوانات به قفس خودشان بازگردانده شدند. قبل از آغاز روش های آزمایشگاهی، رت ها به مدت یک هفته در قفس های مخصوص در یک اتاق با تهویه مناسب به منظور بهبود بعد از جراحی، قرار داده شدند. سپس حیوانات توسط پنتوباریتال (Sigma; ۶۰ mg/kg, i.p) بیهوش شده و با یک سوزن تزریق درجه ی ۲۷ تزریق انجام شد. سوزن تزریق به یک سرنگ همیلتون $10 \mu\text{l}$ توسط یک لوله ی پلی اتیلن (Harvard Apparatus, Inc) متصل شد. محلول KCl،

مهار منتشر شونده (SD) پدیده ای است که در طی آن یک موج دپلاریزاسیون نورونی- گلیایی با سرعت ۵-۳ میلی متر در دقیقه در سراسر قشر مغز منتشر و در پی آن موجب کاهش شدید و موقتی فعالیت بیوالکتریکی در آن منطقه ی قشر می شود (۲). در برخی اختلالات مغزی از جمله میگرن با اورا، صرع، بیماری های عروقی مغز، فراموشی های منتشر گذرا و بیماری های نخاعی، SD نقش مهمی دارد (۳، ۱). تحقیقات نشان می دهد که SD فعالیت آمیگدال را تحت تاثیر قرار می دهد. بیش از ۷۵ درصد امواج SD از میان قشر گیجگاهی به آمیگدال می رسد (۴). اعتقاد بر این است که SD تحت شرایط پاتولوژیکی مسئول مرگ نورونی می باشد (۶، ۵) و در مغز سالم رت های بالغ منجر به آسیب یا مرگ سلولی نمی شود (۷). مطالعات اخیر نشان می دهد SD در بافت های طبیعی مغز بی ضرر می باشد. همچنین بیان می کنند القای مکرر SD در مغز سالم رت های نوجوان موجب آسیب نورونی در مناطق قشری و زیرقشری می گردد. القای مکرر SD موجب مرگ نورونی و کاهش حجم نورون های طبیعی در لایه ی پنجم قشر تمپورال و لایه ی گرانولی dentate gyrus و هسته پوتامن رت های نوجوان می گردد (۸). آسیب نورونی و همچنین مرگ نورونی در چندین اختلال وابسته به SD نظیر ایسکمی مغز، صرع و ترومای مغزی در آزمایشات تجربی و بالینی گزارش شده است. مرگ نورونی به دلیل تکرار SD در رت های نوجوان سالم احتمالاً در ارتباط با پاتوفیزیولوژی اختلالات نورولوژیکی در نوزادان و کودکان می باشد (۹). نقش گیرنده های گلوتاماتی در پیشبرد فرآیند آپوپتوز به خوبی بررسی گردیده است (۸). در این مطالعه، با بررسی میزان بیان گیرنده NR_{2B} از زیر واحدهای گیرنده های NMDA



شفاخته

تصویر ۱. توزیع گیرنده NR_{2B}. الف) تصاویر گرفته شده با کمک میکروسکوپ فلورسنت از مناطق CA1 و CA3. ب) توزیع گیرنده NR_{2B} به صورت Mean \pm SEM نشان داده شده است. بیان این گیرنده به دنبال القا SD در منطقه CA1 نسبت به گروه کنترل و شم افزایش چشمگیری یافته است. این تفاوت در ناحیه CA3 معنا دار نبود. * نشان دهنده ی $P < 0.05$ می باشد.



تصویر ۲

توزیع گیرنده GluR1 (الف) تصاویر گرفته شده با کمک میکروسکوپ فلورسنت از مناطق CA1 و CA3. (ب) توزیع گیرنده GluR1 به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده است. بیان این گیرنده به دنبال القا SD در منطقه CA1 و CA3 نسبت به گروه کنترل و شم افزایش چشمگیری یافته است. ** نشان دهنده $P < 0.01$ می باشد.

۳ مولار به میزان $10 \mu\text{l}$ در مدت ۶۰ ثانیه تزریق شد ($n=22$). پس از اتمام تزریق، سرنگ تزریق در کانول راهنما به مدت ۶۰ ثانیه نگه داشته شد تا انتشار دارو تسهیل شود. در گروه شم ($n=12$)، $10 \mu\text{l}$ محلول رینگر با روش ذکر شده، تزریق شد. تزریق KCl و محلول رینگر هر کدام ۴ بار در چهار هفته ی متوالی انجام شد. بیهوشی به مدت ۶۰ دقیقه بعد از تزریق محلول KCl یا رینگر ادامه یافت. نوار مغزی (EEG) از رت های بیهوش به مدت ۶۰ دقیقه بعد از تزریق محلول KCl یا رینگر گرفته شد. حیوانات گروه کنترل بیهوش شدند ولی هیچ جراحی صورت نگرفت ($n=6$). چهار هفته بعد از اولین تزریق محلول KCl یا رینگر، تمامی حیوانات توسط کلرال هیدرات (350 mg/kg) (Sigma-Aldrich) تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند و با حدود ۲۰۰ میلی لیتر نرمال سالین و در پی آن با ۶۰۰ میلی لیتر محلول پارافرمالدهید ۴٪ (PFA) پرفیوژن شدند. سپس مغزها خارج شدند و در پارافرمالدهید ۴٪ برای حداقل یک هفته نگهداری شدند. مغزها با عبور از الکل اتیلیک با غلظت افزایشی پاساژ داده شدند و پس از آب گیری، در گزین شفاف سازی شدند. در مرحله ی بعد نمونه ها در بلوک های پارافینی قالب گیری و برش های کروئال به صورت تصادفی از نمونه ها تهیه گردید.

یافته ها

پیشنهاد شده است که گیرنده NR_{2B} و GluR1 در شروع و گسترش SD دخیل هستند (۱۰-۱۳). به منظور امتحان کردن تغییرات گیرنده های گلوتامات بعد از القای مکرر SD در هیپوکمپ، توزیع گیرنده های NR_{2B} و GluR1 مورد بررسی قرار گرفتند. القای مکرر SD تغییرات خاصی را در بیان گیرنده های GluR1 و NR_{2B} ایجاد نموده است. بیان گیرنده NR_{2B} در ناحیه ی CA1 به طور چشمگیری در گروه SD در مقایسه با گروه کنترل و شم افزایش یافت ($P < 0.05$ ، تصویر ۱). همچنین افزایش معنی داری در بیان گیرنده GluR1 در نواحی CA1 و CA3 در گروه SD مشاهده گردید ($P < 0.01$ ، تصویر ۲).

روش ایمونوهیستوشیمی

سه لام از برش های تهیه شده، در محدوده (۲/۳ تا ۴/۳) عقب تر از برگما انتخاب شده و با عبور از گزینل و الکل، شفاف سازی و آبدهی شدند. در مرحله ی بعدی در بافر فسفات سالین (PBS) سه بار شستشو داده شدند و سپس در سیترات بافر در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. بعد از سرد شدن در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه، برش ها در ۱۰٪

تضعیف شود (۱۴). از طرف دیگر بیماران مبتلا به برخی بیماری‌های عصبی نظیر صرع و میگرن با اورا از اختلالات حافظه‌ای و شناختی رنج می‌برند. این اختلالات در آزمون‌های رفتاری انجام شده در مدل‌های حیوانی نیز گزارش گردیده است. یافته‌های این مطالعه بیانگر افزایش گیرنده‌های گلوتاماتی در منطقه‌ی هیپوکمپ می‌باشد. هیپوکمپ به عنوان یک مرکز مهم برای ذخیره و تثبیت اطلاعات شناخته شده است. لذا افزایش گیرنده‌های گلوتاماتی در این منطقه می‌تواند سبب افزایش مرگ نورونی و به دنبال آن اختلال در شناخت و حافظه گردد. از این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که اگر این گیرنده‌ها در کانون مطالعات دارویی قرار بگیرند شاید بتوان با مداخلات دارویی در روند مرگ نورونی، کمک شایانی به مبتلایان به این نوع بیماری‌ها نمود.

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان می‌دهد که القای مکرر SD، آسیب‌هایی را در ساختار و عملکرد بافت مغز در رت‌های جوان ایجاد می‌کند. همچنین یافته‌های این مطالعه حاکی از آن است که القا SD در رت‌های نوجوان سبب افزایش بیان گیرنده‌های NR_{2B} و GluR1 می‌گردد. مرگ نورونی با فعال شدن گیرنده‌های NMDA و به دنبال آن ورود کاتیون‌ها از جمله Ca^{2+} و Na^{+} تسریع می‌گردد. در مطالعه‌ی انجام شده، القای مکرر SD بیان زیر واحد NR_{2B} و زیر واحد GluR1 را افزایش می‌دهد. این افزایش می‌تواند توجیهی برای آسیب نورونی ایجاد شده در برخی اختلالات عصبی که فرآیند SD در آنها دخیل است، باشد. مطالعات نشان داده‌اند که میزان آپوپتوز با ترکیباتی که به طور ویژه‌ای زیر واحد NR_{2B} را مسدود می‌کند، می‌تواند

منابع

1. Gorji A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Res Rev.* 2001; 38(1-2): 33-60.
2. Leao AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol.* 1944; 7: 359-90.
3. Lauritzen M, Dreier JP, Fabricius M, Hartings JA, Graf R, Strong AJ. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *J Cerebr Blood F Met.* 2011; 31(1): 17-35.
4. Avoli M, Drapeau C, Louvel J, Pumain R, Olivier A, Villemure JG. Epileptiform activity induced by low extracellular magnesium in the human cortex maintained in vitro. *Ann NeuroL.* 1991; 30(4): 589-96.
5. Dreier JP, Kleeberg J, Alam M, Major S, Kohl-Bareis M, Petzold GC, et al. Endothelin-1-Induced Spreading Depression in Rats Is Associated with a Microarea of Selective Neuronal Necrosis. *Exp Biol Med.* 2007; 232(2): 204-13.
6. Yanamoto H, Miyamoto S, Tohnai N, Nagata I, Xue J-H, Nakano Y, et al. Induced spreading depression activates persistent neurogenesis in the subventricular zone, generating cells with markers for divided and early committed neurons in the caudate putamen and cortex. *Stroke.* 2005; 36(7): 1544-50.
7. Nedergaard M, Hansen AJ. Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain res.* 1988; 449(1): 395-8.
8. Jafarian M, Rahimi S, Behnam F, Hosseini M, Haghir H, Sadeghzadeh B, et al. The effect of repetitive spreading depression on neuronal damage in juvenile rat brain. *Neurosci.* 2010; 169(1): 388-94.
9. Somjen GG. Is spreading depression bad for you? Focus on repetitive normoxic spreading depression-like events result in cell damage in juvenile hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol.* 2006; 95(1): 16-7.
10. Faria LC, Mody I. Protective effect of ifenprodil against spreading depression in the mouse entorhinal cortex. *J Neurophysiol.* 2004; 92(4): 2610-4.
11. Formicola D, Aloia A, Sampaolo S, Farina O, Diodato D, Griffiths LR, et al. Common variants in the regulative regions of GRIA1 and GRIA3 receptor genes are associated with migraine susceptibility. *BMC medical genetics.* 2010; 11(1): 103.
12. Peeters M, Gunthorpe MJ, Strijbos PJLM, Goldsmith P, Upton N, James MF. Effects of pan- and subtype-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on cortical spreading depression in the rat: therapeutic potential for migraine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 321(2): 564-72.
13. Sadeghian H, Jafarian M, Karimzadeh F, Kafami L, Kazemi H, Coulon P, et al. Neuronal death by repetitive cortical spreading depression in juvenile rat brain. *Exp Neurol.* 2012; 233(1): 438-46.
14. Williams AJ, Dave JR, Lu X, Ling G, Tortella FC. Selective NR2B NMDA receptor antagonists are protective against staurosporine-induced apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2002; 452(1): 135-6.