

گیرنده ی هیپوکمپی NMDA در مدل حیوانی صرع غیابی

Hippocampal NMDA Receptor in an Animal Model of Absence Seizure

Fariba Karimzadeh¹, Milad Ahmadi^{1, 2}, Mostafa Modarres Mousavi¹, فاطمه علی پور^۱, مصطفی مدرس موسوی^۱، میلاد احمدی^{۱،۲}، فریبا کریم زاده^۱، میلاد احمدی^{۱،۲}، مصطفی مدرس موسوی^۱، فاطمه علی پور^۱، Fatemeh Alipour¹

1. Shefa Neuroscience Research Centre, Tehran, Iran.
2. Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Islamic Azad University, Karaj, Iran.

۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، تهران، ایران.
۲. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران.

چکیده

مقدمه گیرنده های گلوتاماتی در هم نوایی تخلیه های نیزه- موج در انواع مدل های حیوانی صرع غیابی تاثیر گذار است. ما در این مطالعه به بررسی توزیع یکی از زیرواحدهای گیرنده ی NMDA در منطقه ی CA1 در هیپوکمپ پرداخته ایم. **مواد و روش ها** بیان زیر واحد R2 از گیرنده ی NMDA که یک ناقل عصبی تحریکی فراوان در مغز است، در موش های صحرایی مبتلا به صرع غیابی بررسی گردید. **یافته ها** تعداد این زیر واحد از گیرنده NMDA در تشکیلات هیپوکمپ موش های صحرایی مبتلا به صرع غیابی کاهش یافته بود. **نتیجه گیری** تغییرات بیان این گیرنده ها در هیپوکمپ ممکن است در اختلالات شناختی موجود در مبتلایان به صرع غیابی دخیل باشد.

اطلاعات مقاله
دریافت: ۱۷ فروردین ۱۳۹۲
پذیرش: ۱۰ اردیبهشت ۱۳۹۲

کلید واژه:

هیپوکمپ،
صرع،
مغز،
گلوتامات.

Article info:

Received: 6 Apr. 2013

Accepted: 30 Apr. 2013

ABSTRACT

Introduction The glutamergic receptors affect the synchronization of spike and wave discharges in different animal models of absence seizure. We studied the distribution of a NMDA subtype receptor in CA1 area of the hippocampus. **Materials and Methods** Expression of NMDA subreceptor R2, the predominant excitatory neurotransmitter receptor in the brain, was investigated in rats suffering from absence-like seizures. **Results** Rats with absence-like seizures exhibited decreased number of these NMDA subreceptors in the hippocampal formation. **Conclusion** Changes of expression of these receptors in the hippocampus may be involved in cognition deficits in absence epilepsy.

Key words:

Hippocampus,
Epilepsy,
Brain,
Glutamates.

* Corresponding Author:

Fariba Karimzadeh

E-mail: Fariba_karimzade@yahoo.com

• نویسنده مسئول:

فریبا کریم زاده

آدرس الکترونیکی: Fariba_karimzade@yahoo.com

مقدمه

نقش این گیرنده در پاتوفیزیولوژی این بیماری و ارتباط آن با اختلالات حافظه بیردازیم.

مواد و روش ها

حیوانات

در این مطالعه از موش های صحرایی نر نژاد Wistar و WAG/Rij (تهیه شده از مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا) استفاده شد. حیوانات تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای 23 ± 3 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در طی مدت نگهداری، حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذای کافی داشتند. آنتی بادی اولیه علیه گیرنده NMDA R2 از شرکت دارویی abcam خریداری گردید. حیوانات مورد مطالعه، به چهار گروه موش های Wistar و WAG/Rij دو ماهه و شش ماهه تقسیم گردیدند.

جراحی و ثبت امواج مغزی

ابتدا موش ها با کلرال هیدرات (350mg/kg) بیهوش شده و سر حیوان در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شد. الکترودهای ثابت با روکش نقره بر روی کورتکس حسی-پیکری کاشته شد. ثبت امواج مغزی به مدت ۱ ساعت انجام شد. در طول ثبت امواج مغزی برای بیهوش نگه داشتن حیوان از فنتانیل (3µg/kg) هر ۲۰ تا ۳۰ دقیقه یکبار به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در موش های Wistar دو و شش ماهه و همچنین موش های WAG/Rij دو ماهه هیچ فعالیت تشنجی در امواج مغزی ثبت شده دیده نشد. موش های WAG/Rij شش ماهه که در امواج مغزی آن ها فعالیت SWDs مشاهده شد به عنوان موش های صرعی انتخاب شدند. لازم به ذکر است که حیوانات موجود در هر گروه ۶ عدد بودند.

تهیه بافت

پس از ثبت امواج مغزی، حیوانات با دوز بالای کلرال هیدرات بیهوش شدند. محلول سرم فیزیولوژیک با اسیدیته ۷/۴ به میزان ۵۰۰ سی سی از طریق سیستم قلبی عروقی تزریق گردید. به دنبال آن محلول فیکساتیو پارافمالدئید ۴ درصد به میزان ۵۰۰ سی سی وارد سیستم قلبی عروقی گردید. سپس سر حیوانات جدا شده و مغز آن ها خارج گردید و در داخل محلول فیکساتیو به مدت ۵ روز در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شد. مغز ها به منظور آبیگری از داخل الکل های ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ عبور داده شدند. پس از عبور از گزیلول و پارافین، نمونه ها قالب گیری شده برش های بافتی به صورت پشت سر هم (سریال) با ضخامت ۱۰ میکرومتر در فاصله ۲/۲ تا ۳/۳ میلی متر عقب تر از برگما (Bregma) تهیه شد. لام ها به فواصل هر ۵۰ میکرو متر یک لام، به صورت انتخابی برای بررسی های ایمونوهیستوشیمی

صرع کوچک نوعی حمله ی جنرالیزه غیر تشنجی همراه با اختلال هوشیاری ناگهانی است که در بسیاری از مشخصات با دیگر حملات تشنجی متفاوت است. یک حمله ی صرع کوچک مشخص به صورت عدم پاسخ به تحریکات محیطی، توقف فعالیت در حال انجام و شروع حرکات غیر ارادی و یا گاهی نیز به صورت تشنجات تونیک و یا کلونیک در اندام ها، پلک و یا کره ی چشم بروز می کند (۱).

موج الکتروفیزیولوژی صرع غیبی به صورت دوطرفه و همزمان در دو نیمکره ظاهر می گردد. ویژگی این موج بصورت ۳ نیزه و یک موج در ثانیه (spikes and slow wave) با فرکانس ۳ تا ۴ هرتز که به طور ناگهانی آغاز و پایان می یابد، است. برخلاف انواع دیگر تشنج های عمومی و نسبی، دوره ی مهاری پس از تشنج (postictal) در صرع کوچک دیده نمی شود و به طور مکرر، تا بیش از صد یا دویست بار در طول یک روز به خصوص در شرایط کم خوابی بیشتر بروز می کند (۲).

بررسی های پاتوفیزیولوژیک اختلال عملکرد مدار تالامو کورتیکال را عامل اصلی ایجاد این نوع صرع می داند اما اختلاف نظرهای زیادی در مورد اینکه چه بخشی از این شبکه آغازگر این اختلال است، وجود دارد. عده ای افزایش فعالیت سیستم تحریکی (گلوتامات) در قشر را عامل اصلی می دانند، در مقابل عده ی دیگری افزایش عملکرد سیستم مهاری (گابا) در تالاموس را عامل محرک شروع حملات می دانند. برخی نیز معتقدند که هر دو سیستم با هم در شکل گیری این حملات موثر هستند. هیچ کدام از این فرضیات نتوانسته است به طور کامل مکانیسم ایجاد و درمان این بیماری را روشن کند (۱).

به منظور روشن شدن مکانیسم های دخیل در پاتوفیزیولوژی و اختلالات حافظه ای این بیماری، نظر بسیاری از محققان به بررسی تغییرات توزیع گیرنده های تحریکی و مهاری در مدل های حیوانی صرع کوچک جلب گردیده است. در این راستا، کاهش گیرنده های NR1 در ناحیه ی قشر حسی-پیکری موش های WAG/Rij مشاهده شده است. همچنین کاهش گیرنده های mGlu1 در نواحی تالاموس و نئوکورتکس مشاهده شده است.

بسیاری از افراد که در کودکی خود این نوع تشنجات را تجربه نموده اند از مشکلاتی شناختی و حافظه ایی رنج می برند و از طرف دیگر ارتباط گیرنده های NMDA با حافظه ی فضایی در موش صحرایی به خوبی بررسی گردیده است (۳، ۴). لذا در این مطالعه سعی بر آن است تا با بررسی میزان تغییرات گیرنده ی NMDA R2 از زیر واحد های گیرنده NMDA در معتبرترین مدل ژنتیکی صرع کوچک (موش های نژاد WAG/Rij)، به

هر نمونه ۵ تصویر تهیه شده و با کمک نرم افزار Image Tools 2 سلول های واکنش یافته با آنتی بادی شمارش شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده های این مطالعه به کمک نرم افزار SPSS انجام گردید. به منظور تجزیه و تحلیل یافته ها از آزمون آنالیز من-ویتنی (Mann-Whitney rank sum test) در سطح معنی داری $P < 0.05$ استفاده شد. تمام داده ها به صورت $Mean \pm S.E.M$ می باشند.

یافته ها

در امواج مغزی ثبت شده از موش های شش ماهه نژاد WAG/Rij امواج تشنجی به شکل SWDs مشاهده گردید. از مهمترین ویژگی های این امواج فرکانس ۵ تا ۱۰ هرتز و دامنه ی ۲۵۰ تا ۱۵۰۰ میکروولت می باشد. زمان شروع تا خاتمه هر حمله از ۴۰۰ میلی ثانیه تا ۳ دقیقه به طول انجامید. شمایی از امواج ثبت شده در هر گروه در تصویر یک نشان شده است.

بررسی های ایمونوهیستوشیمی

مطالعات پیشین بیانگر دخالت گیرنده ی NMDA در پاتوفیزیولوژی بیماری صرع کوچک می باشد (۵). همچنین نقش این گیرنده ها در تثبیت حافظه و یادگیری به خوبی بررسی گردیده است (۶، ۷). از آنجا که افرادی که در کودکی به این بیماری مبتلا بوده اند از اختلالات شناختی و حافظه ایی رنج می برند، این مطالعه به بررسی تغییرات توزیع گیرنده ی NMDA در R2 منطقه ی CA1 پرداخته است (تصویر ۲). در بررسی های ایمونوهیستوشیمی نشان داده شد که توزیع گیرنده NMDA R2

انتخاب شدند.

ایمونوهیستوشیمی

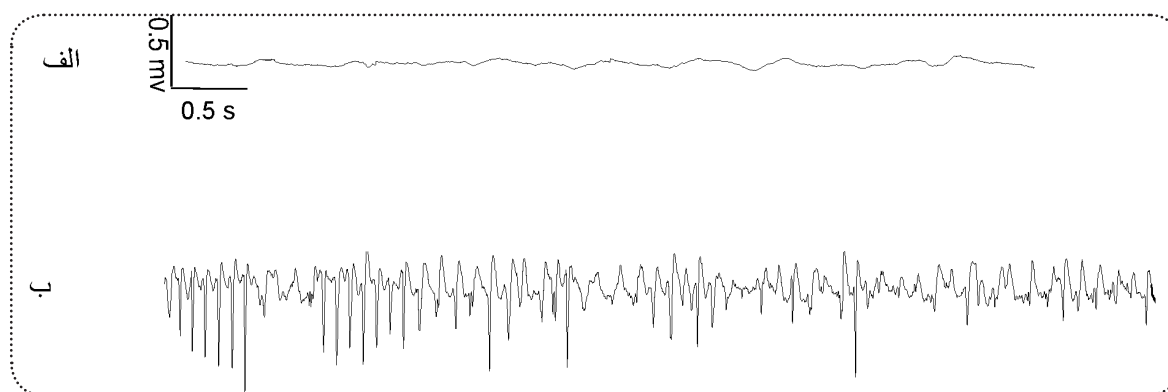
مقاطع پارافینی به منظور آبیگری مجدد از الکل های با درجات ۱۰۰، ۹۵، ۷۰ و ۵۰ عبور داده شدند. در مرحله ی بعد، بلاک کردن پراکسیداز اندوژنوس به کمک شستشو در محلول ۱۰ درصد H_2O_2 /Methanol به مدت ده دقیقه صورت گرفت.

لام ها در محلول Tris wash buffer با $pH = 7.4$ شسته شده و در سیترات بافر با $pH = 6$ در دمای ۱۲۰ درجه ی سانتیگراد و به مدت ۱۱-۱۰ دقیقه جوشانده شدند. بعد از سرد شدن لام ها به صورت تدریجی، شستشوی لام ها در محلول Tris wash buffer صورت گرفت.

آنتی بادی اولیه ی مونوکلونال علیه گیرنده NMDA R2 را با نسبت یک به چهار صد رقیق کرده و برش ها را به مدت یک شب در دمای ۴ درجه ی سانتی گراد با آنتی بادی اولیه انکوبه می کنیم. شستشوی لام ها در محلول Tris wash buffer صورت گرفت و سپس برش ها با آنتی بادی ثانویه Goat Polyclonal secondary antibody (HRP) رقیق شده با نسبت یک به صد به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند.

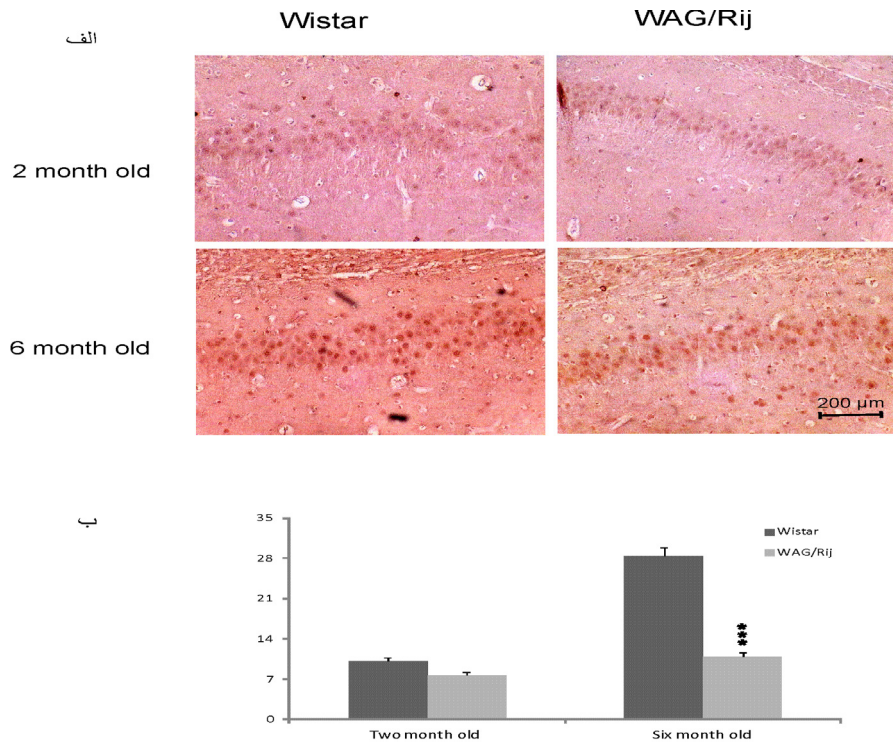
لام ها با Tris wash buffer شستشو و با کروموزن Substrate DAB یک درصد در مدت تاریکی به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند.

در انتها لام ها با هوماتوکسیلین رنگ شده و مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های کنترل منفی به منظور تایید صحت روش ایمونوهیستوشیمی تنها با آنتی بادی ثانویه انکوبه شدند. تصاویری با بزرگ نمایی $\times 40$ از منطقه CA1 تهیه گردید. از



تصویر ۱. ثبت امواج مغزی و حملات تشنجی (SWDs). الف) نمونه ایی از نوار مغزی ثبت شده در موش های سالم. ب) نمونه ایی از حملات صرع کوچک که در نوار مغزی موش های نژاد WAG/Rij شش ماهه مشاهده گردید.

شما



تفصیلات

تصویر ۲: توزیع گیرنده ی NMDA R2 در منطقه ی CA1 از هیپوکامپ. الف) تصاویری از نورون های واکنش یافته با آنتی بادی NMDA R2 در موش های ۲ و ۶ ماهه نژاد Wistar و WAG/Rij. ب) نمودار درصد نورون های واکنش یافته که به صورت $\text{Mean} \pm \text{S.E.M}$ نمایش داده شده است. این نمودار نشان می دهد که میزان نورون های واکنش یافته در منطقه CA1 در موش های WAG/Rij شش ماهه به طور چشمگیری نسبت به موش های Wistar همسن خود کاهش یافته است. شایان ذکر است که میزان نورون های واکنش یافته در منطقه ی CA1 در موش های ۲ ماهه نژاد Wistar و WAG/Rij تفاوتی نداشته است. *** نشان دهنده $P < 0.001$ می باشد.

در نوار مغزی می باشد. بر این اساس این مدل حیوانی بهترین مدل برای بررسی مکانیسم های دخیل در پاتوفیزیولوژی می باشد (۸-۱۰).

یافته های این مطالعه نشان داد که توزیع گیرنده ی NMDAR2 در ناحیه ی CA1 به طور چشمگیری در موش های شش ماهه ی نژاد WAG/Rij نسبت به موش های هم سن نژاد Wistar کاهش یافته است. شایان ذکر است که حملات تشنجی کوچک در تظاهرات رفتاری و نوار مغزی موش های شش ماهه WAG/Rij به خوبی ظاهر می گردد. در این راستا، مطالعات گذشته نشان دادند که توزیع گیرنده NR1 از زیرواحدهای گیرنده های NMDA و گیرنده GluR4 از زیرواحدهای گیرنده های AMPA در قشر حسی-پیکری در موش های نژاد WAG/Rij کاهش یافته است (۱۱، ۱۲). همچنین بیان پروتئین گیرنده ی mGlu1 در مدل ژنتیکی صرع کوچک تقلیل یافته است (۱۳). همچنین سطح ناقلین گلوتاماتی تالاموس و قشر حسی-پیکری در حیوانات مبتلا کاهش یافته است.

در منطقه CA1 به نحو قابل توجهی در موش های WAG/Rij شش ماهه نسبت به موش های Wistar هم سن خود کاهش یافته است ($P < 0.001$). میانگین تعداد نورون های واکنش یافته در موش های WAG/Rij و Wistar شش ماهه به ترتیب $0.8 \pm 10/83$ درصد و $1/49 \pm 2/42$ درصد می باشد. شایان ذکر است که تفاوت معنی داری در توزیع این گیرنده در موش های دو ماهه دیده نشد. میانگین تعداد نورون های واکنش یافته در موش های WAG/Rij و Wistar دو ماهه در منطقه CA1 به ترتیب $0/55 \pm 7/65$ و $0/67 \pm 10/12$ می باشد.

بحث و نتیجه گیری

موش های صحرایی نژاد WAG/Rij از معتبرترین و شبیه ترین مدل های حیوانی صرع کوچک می باشند. تظاهرات بالینی تشنجات در این مدل در موش های بالغ (بیشتر از سه ماه) بروز می کند. این تظاهرات شامل تظاهرات رفتاری مانند تظاهرات بالینی که در کودکان مبتلا بروز می کند و بروز امواج SWDs

به طور مثال افزایش بیان این گیرنده در موش های بالغ سبب افزایش حافظه ی فضایی گردیده است (۱۶). همچنین فعال ساختن این زیرواحد در هیپوکمپ و قشر جدید سبب تقویت پاسخ های سیناپسی می گردد (۳). مهار عملکرد این گیرنده در منطقه ی هیپوکمپ سبب اختلال در بازبایی اطلاعات گردیده است (۳). لذا کاهش گیرنده های مذکور در هیپوکمپ موش های مبتلا به صرع کوچک می تواند توجیهی برای اختلالات حافظه و شناخت در افراد مبتلا باشد. البته مطالعات بیشتر در زمینه ی مداخلات دارویی مرتبط با این گیرنده و اثرات آن در بهبود حافظه در مدل های حیوانی صرع کوچک پیشنهاد می گردد.

منابع

1. Snead OC, 3rd. Basic mechanisms of generalized absence seizures. *Ann Neurol*. 1995; 37(2): 146-57.
2. D'Arcangelo G, D'Antuono M, Biagini G, Warren R, Tancredi V, Avoli M. Thalamic oscillations in a genetic model of absence seizures. *Eur J Neurosci*. 2002; 16(12): 2383-93.
3. Zhao MG, Toyoda H, Lee YS, Wu LJ, Ko SW, Zhang XH, et al. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron*. 2005; 47(6): 859-72.
4. Mandelbaum DE, Burack GD. The effect of seizure type and medication on cognitive and behavioral functioning in children with idiopathic epilepsy. *Dev Med & Child Neurol*. 1997; 39(11): 731-5.
5. Koerner C, Danober L, Boehrer A, Marescaux C, Vergnes M. Thalamic NMDA transmission in a genetic model of absence epilepsy in rats. *Epilepsy Res*. 1996; 25(1): 11-9.
6. Bast T, Wilson IA, Witter MP, Morris RGM. From rapid place learning to behavioral performance: a key role for the intermediate hippocampus. *PLoS Biol*. 2009; 7(4): e1000089.
7. Clayton DA, Mesches MH, Alvarez E, Bickford PC, Browning MD. A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J Neurosci*. 2002; 22(9): 3628-37.
8. Bouwman BM, Suffczynski P, Midzyanovskaya IS, Maris E, van den Broek PL, van Rijn CM. The effects of vigabatrin on spike and wave discharges in WAG/Rij rats. *Epilepsy Res*. 2007; 76(1): 34-40.
9. Coenen A, Van Luijtelaar E. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genet*. 2003; 33(6): 635-55.

این در حالی است که سطح mRNA ناقلین گلوتاماتی در سلول های گلیال در مناطق تالاموس، هسته های ساب تالامیک و قشر حسی-پیکری و گیجگاهی در موش های مبتلا به صرع کوچک کاهش یافته است (۱۴). در این مطالعه کاهش توزیع گیرنده ی NMDA R2 در منطقه ی CA1 از هیپوکمپ موش های مبتلا به صرع کوچک نشان داده شد. بسیاری از مطالعات نشان داده اند افرادی که تجربه تشنجات کوچک را در دوران کودکی داشته اند از مشکلات شناختی و حافظه ای رنج می برند. از طرف دیگر گیرنده های NMDA در یادگیری و حافظه به خوبی بررسی گردیده است. مطالعات حاکی از آن است که گیرنده های NMDA و AMPA در هیپوکمپ سهم بسزایی در بازبایی اطلاعات دارند (۶). همچنین هیپوکمپ به عنوان محلی برای ذخیره ی اطلاعات شناخته شده است (۱۵). در این بین مطالعات متعددی به نقش گیرنده ی NMDA R2 در تثبیت و بازبایی اطلاعات پرداخته اند.

10. Danober L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol*. 1998; 55(1): 27-57.
11. van de Bovenkamp-Janssen MC, van der Kloet JC, van Luijtelaar G, Roubos EW. NMDA-NR1 and AMPA-GluR4 receptor subunit immunoreactivities in the absence epileptic WAG/Rij rat. *Epilepsy Res*. 2006; 69(2): 119-28.
12. Karimzadeh F, Soleimani M, Mehdizadeh M, Jafarian M, Mohamadpour M, Kazemi H, et al. Diminution of the NMDA receptor NR2B subunit in cortical and subcortical areas of WAG/Rij rats. *Synapse*. 2013; 67(12): 839-46.
13. Ngomba R, Santolini I, Biagioni F, Molinaro G, Simonyi A, van Rijn C, et al. Protective role for type-1 metabotropic glutamate receptors against spike and wave discharges in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Neuropharmacology*. 2011; 60(7-8): 1281-9.
14. Ingram EM, Tessler S, Bowery NG, Emson PC. Glial glutamate transporter mRNAs in the genetically absence epilepsy rat from Strasbourg. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000; 75(1): 96-104.
15. Cui Z, Wang H, Tan Y, Zaia KA, Zhang S, Tsien JZ. Inducible and reversible NR1 knockout reveals crucial role of the NMDA receptor in preserving remote memories in the Brain. *Neuron*. 2004; 41(5): 781-93.
16. Cao X, Cui Z, Feng R, Tang YP, Qin Z, Mei B, et al. Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. *Eur J Neurosci*. 2007; 25(6): 1815-22.