

تغییر بیان گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکابینوئیدی ۱ هیپوکامپ در سه مدل تشنجی پنتیلن تترازول، پیلوکارپین و اسید کاینیک

گیتی نسودی^۱ (M.Sc.)، محمود اله دادی سلمانی^{۱*} (Ph.D.)، نرگس حسین مردی^۲ (Ph.D.)، تقی لشکر بلوکی^۱ (Ph.D.)، ایران گودرزی (Ph.D.)^۳، فرشاد مرادپور^۳ (Ph.D.)

۱- گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۱۵

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳-۲۵۲۲۰۲۲۳ elahdadi@du.ac.ir

چکیده

هدف: تشنج یک فعالیت نورونی هم‌زمان و غیرطبیعی در مغز است که می‌تواند باعث فعال شدن گیرنده‌های مختلف تشدیدکننده یا تضعیف‌کننده تشنج از جمله گیرنده اورکسینی و/یا اندوکابینوئیدی شود. زمان فعال شدن این گیرنده‌ها می‌تواند بر کنترل تشنج‌ها موثر باشد. لذا این مطالعه زمان بیان ژن گیرنده‌های اورکسینی ۱ یا اندوکابینوئیدی ۱ به دنبال تشنج در سه مدل تشنجی پنتیلن تترازول، اسید کاینیک و پیلوکارپین را بررسی می‌کند.

مواد و روش‌ها: تعداد ۵۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در سه گروه تجربی پنتیلن تترازول، اسید کاینیک و پیلوکارپین قرار گرفتند. شدت تشنج بر اساس زمان نهفته تزریق داروی تشنج‌زا تا شروع تشنج (از زمان تزریق تا شروع تشنج؛ زمان نهفته ۱ و از زمان شروع تشنج تا تشنج‌های تونیک-کلونیک؛ زمان نهفته ۲) و مدت زمان تشنج محاسبه گردید. بررسی بیان ژن دو گیرنده اورکسینی ۱ و اندوکابینوئیدی ۱ به روش RT-PCR انجام شد و نتایج با گروه کنترل (بدون القای تشنج) مقایسه گردید. یافته‌ها: مطالعه ما نشان داد مدت زمان نهفته اول و دوم در مدل‌های اسیدکاینیک و پیلوکارپین به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه پنتیلن تترازول افزایش داشت، در حالی که مدت زمان مراحل تشنجی کم‌تر بود. میزان بیان ژن گیرنده اورکسینی ۱، چهار ساعت بعد و گیرنده اندوکابینوئیدی ۱، بلافاصله و چهار ساعت بعد در مدل تشنجی پنتیلن تترازول نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. میزان بیان ژن گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکابینوئیدی ۱ در مدل اسیدکاینیک، یک هفته بعد از تشنج افزایش نشان داد، در حالی که در گروه پیلوکارپین، فقط ۲۸ روز بعد از تشنج افزایش بیان گیرنده‌ها مشاهده گردید. نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که هر چه تاخیر زمانی تشنج در یک مدل کم‌تر و مدت زمان تشنجی بیش‌تر باشد، افزایش بیان ژن گیرنده اورکسینی ۱ و اندوکابینوئیدی ۱ زودتر اتفاق می‌افتد.

واژه‌های کلیدی: تشنج، گیرنده اورکسین، اندوکابینوئیدها، هیپوکامپ

مقدمه

ویژه اشکال تونیک کلونیک عمومی آن سبب وحشت و اضطراب فراوان می‌شود [۱] و در این راستا، انجام تحقیقات بیش‌تر در مورد عوامل دخیل در تشدید یا کنترل تشنج‌ها و تلاش برای کشف داروهای جدید برای درمان این بیماری مهم خواهد بود [۴]. از جمله این عوامل، تغییرات سلولی و مولکولی در مغز و به ویژه هیپوکامپ است که برخی از آن‌ها باعث تشدید و تکرار تشنج‌ها [۵] و برخی نیز منجر به کنترل تشنج‌ها می‌گردند [۷،۶]. گیرنده‌های اندوکابینوئیدی در مدل تشنج پیلوکارپین حاد در هیپوکامپ کاهش می‌یابد، در حالی که در مدل‌های صرع ناشی از پیلوکارپین و تب در هیپوکامپ افزایش

تشنج یک اختلال فیزیولوژیک گذرای مغزی و ناشی از تخلیه‌های الکتریکی هم‌زمان یا بیش از حد گروهی از نورون‌های مغز است که شکل بروز آن بستگی به عملکرد این نورون‌ها دارد [۲،۱]. تشنج‌ها دارای اثرات متعددی بر مغز و عملکرد بدن هستند؛ تشنج می‌تواند عمومی (Generalized) باشد و موجب بی‌هوشی شود و یا جزئی (Partial) باشد که در این نوع تشنج، تمرکز از بین می‌رود. تشنج‌های عمومی نسبت به تشنج جزئی اثرات بیش‌تری روی مغز می‌گذارند و در نتیجه تاثیر بیش‌تری نیز بر روی عملکرد بدن دارند [۳]. تشنج، به

هیپوکمپ، افزایش داشته است [۱۸]. از طرفی میزان بیان گیرنده اورکسینی ۱ به دنبال مهار گیرنده اورکسینی ۲ در شرایط استرس کاهش می‌یابد [۲۲]. این مطالعات، اثرات تشنج‌زایی اورکسین و نقش گیرنده‌های هیپوکامپی آن به عنوان عوامل دخیل در تشنج‌ها را تأیید می‌کنند. از طرفی، مشخص شده است که گیرنده‌های اورکسینی بخشی از مسیر اثرگذاری گیرنده‌های اندوکابینوئیدی می‌باشند و این دو گیرنده در مناطقی از مغز، به‌طور هم‌زمان بیان می‌شوند. لذا، زمان تغییر بیان گیرنده اورکسینی ۱ پس از تشنج نیز، در مدل‌های مختلف به این لحاظ دارای اهمیت است.

بر این اساس، این مطالعه به بررسی تغییر بیان دو گیرنده اندوکابینوئیدی ۱ (عمدتاً دارای اثرات ضد تشنجی) و اورکسینی ۱ (عمدتاً دارای اثرات تشنج‌زا) در هیپوکامپ موش‌های صحرایی در زمان‌های مختلف در سه مدل تشنجی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

حیوانات. در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی 50 ± 20 گرم استفاده شد. حیوانات در اتاقی در دمای کنترل شده (23 ± 2 درجه سانتی‌گراد) و در شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری می‌شدند. حیوانات به آب و غذای به مقدار کافی دسترسی داشتند. کلیه قوانین و قواعد اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه دامغان در این مطالعه رعایت شده است.

داروها. پنتیلن تترازول (PTZ، ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، داخل وریدی)، اسیدکاینیک ($0/8$ میکروگرم بر میکرولیتر، داخل هیپوکامپی)، پیلوکارپین (۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، داخل صفاقی) و لیتیم کلراید (۳ میلی‌اکی‌والان/کیلوگرم، داخل صفاقی) از شرکت سیگما خریداری شد. هیوسین (یک میلی‌گرم/کیلوگرم) و دیازپام (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) از بازار داخلی (دیازپام از شرکت داروسازی کاسپین و هیوسین از شرکت داروسازی اکسیر) تهیه و به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

القای تشنج. جهت القای تشنج‌ها از سه مدل PTZ، اسیدکاینیک و پیلوکارپین استفاده شد. در هر یک از این سه مدل، رفتار تشنجی بر اساس زمان هفته ۱ و زمان هفته ۲ و نیز مدت زمان تشنج مورد بررسی قرار گرفت. زمان هفته ۱ از زمان تزریق ماده تشنج‌زا تا زمان ظهور اولین نشانه‌های تشنج و زمان هفته ۲ از زمان شروع تشنج تا بروز تشنج‌های تونیک-کلونیک مدنظر قرار گرفت. جهت مقایسه بین گروه‌ها از متغیر شدت تشنج (تغییر در "زمان هفته + مدت زمان تشنج") استفاده

نشان می‌دهد [۹،۸]. میزان بیان گیرنده‌های اندوکابینوئیدی ۱ (CBIR) در هیپوکامپ موش‌های صحرایی مدل پیلوکارپین، کاهش می‌یابد و این کاهش می‌تواند باعث کاهش تحریک راجعه (Recurrent excitation) شود که به نوعی یک مکانیسم مقابله‌ای مغز برای کنترل تشنج است [۱۱،۱۰]. در این راستا، تغییر بیان گیرنده‌های اندوکابینوئیدی ۱ در نوروئیدی ۱ در نوروئیدی ۱ نیز، متفاوت است، به طوری که، بیان گیرنده‌های اندوکابینوئیدی ۱ در هیپوکامپ بیماران صرعی، بر روی پایانه‌های گابارژیک افزایش و بر روی پایانه‌های گلوتاماترژیک کاهش می‌یابد [۱۳،۱۲]. این مطالعات نشانگر تفاوت در تغییرات بیان گیرنده‌ای است که برخی به نفع تشنج و بعضی در جهت کنترل تشنج هستند. البته، فعالیت گیرنده اندوکابینوئیدی ۱، به عنوان یک مکانیسم فیدبک منفی برای تعدیل پیام‌رسانی نوروترانسمیترها عمل می‌کند. به این صورت که، رهایش اندوکابینوئیدها از نوروئیدی ۱ پس‌سیناپسی متناسب با فعالیت سیناپس بوده و منجر به فعال شدن گیرنده‌های اندوکابینوئیدی ۱ در نوروئیدی ۱ پیش‌سیناپسی و مهار رهایش نوروترانسمیترها می‌شود [۱۴]. اندوکابینوئیدها و آگونیست‌های گیرنده‌های اندوکابینوئیدی ۱ دارای فعالیت ضد تشنجی در مدل‌های صرعی ناشی از الکتروشوک، تشنج خودبه‌خودی و اسید کاینیک می‌باشند و مهار گیرنده‌های اندوکابینوئیدی ۱ به عنوان تسهیل‌کننده تشنج در این مدل‌ها نشان داده شده است [۱۶،۱۵]. حذف گیرنده‌های اندوکابینوئیدی ۱ و یا به کار بردن آنتاگونیست گیرنده‌های اندوکابینوئیدی ۱، شدت تشنج القا شده توسط پیلوکارپین و درصد حیوانات دچار تشنج نسبت به تیپ وحشی را افزایش می‌دهد [۱۷]. اخیراً کابینوئیدها به عنوان ترکیبات درمانی در نظر گرفته می‌شوند. تمرکز بر روی گیرنده‌های کابینوئیدی و ترکیبات مرتبط با آن‌ها و آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های آن‌ها به عنوان یک روش منحصر به فرد برای کنترل بیماری صرع بدون مقاومت دارویی می‌باشد [۱۸]. در این راستا، زمان بندی و میزان تغییرات این گیرنده‌ها به دنبال تشنج‌ها دارای اهمیت است، زیرا بر میزان اثربخشی کابینوئیدها اثرگذار خواهد بود. مطالعات دیگر نشان داده است که مهار گیرنده‌های اورکسین در هیپوکامپ، رفتار تشنجی را سرکوب کرده و نسبت گلوتامات به گابا را کاهش می‌دهد [۱۹]. میزان بیان اورکسین نیز در اثر تشنج ناشی از پنتیلن تترازول (PTZ) در هیپوتاموس جانبی افزایش را نشان داد [۲۰]، در حالی که متعاقب تشنج و نیز در صرع و تشنج تونیک-کلونیک مکرر، مقدار اورکسین مایع مغزی نخاعی کاهش می‌یابد [۲۱]. البته، میزان بیان گیرنده اورکسین ۱ (OXIR) بعد از تشنج ناشی از اسید کاینیک در

جهت کاهش اثرات محیطی پیلوکارپین و سپس جهت القای تشنج، ماده تشنج‌زای پیلوکارپین با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به روش داخل صفاقی به حیوان [۲۴] تزریق شده و آزمون ارزیابی فعالیت تشنجی به مدت ۱-۲ ساعت تا پایان تشنج گرفته شد.

جهت جلوگیری از تلف شدن حیوانات، دیازپام به روش داخل صفاقی (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) ۲ ساعت پس از تشنج تزریق شد و سپس مغز حیوانات در زمان‌های بلافاصله (پس از پایان تشنج‌های رفتاری)، ۴ ساعت، ۵ روز و ۲۸ روز بعد از پایان تشنج خارج شده و بیان گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکانابینوئیدی ۱ هیپوکامپی اندازه‌گیری شد.

به موازات تزریق PTZ، اسید کاینیک و پیلوکارپین، به حیوانات گروه کنترل، سالین ۰/۹ درصد (حلال داروها) تزریق گردید. فاصله زمانی یکسان بین تزریقات و تعداد دفعات تزریق برای گروه کنترل هر یک از سه مدل رعایت گردید.

سنجش بیان ژن

استخراج RNA: در این مرحله هیپوکامپ استخراج شده از مغز موش‌ها ابتدا با PNX-Plus هموزن شده و سپس با کلروفرم مخلوط و سانتریفیوژ گردید، که در نتیجه سه فاز تشکیل شد. فاز آبی با ایزوپروپانول مخلوط شده و سانتریفیوژ گردید و رسوب سفید رنگ RNA مشاهده شد. پس از استخراج RNA از بافت، میزان RNA با روش سنجش دانسیته نوری (OD) و میزان جذب در طول موج تعیین شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد. محلول نهایی تخلیص شده باید دارای OD ۱/۷ تا ۱/۹ باشد.

سنتز cDNA: سنتز cDNA مطابق پروتکل انجام گرفت در این پروتکل به مقدار یک میلی‌لیتر از هر یک از ترکیبات (۴۰ μgr/μl) Randon Hexamer، (۱۰ Mm) dNTP، (۱۰۰ μg/μl) Oligo dT و (۱۰ μl) Template RNA در داخل میکروتیوب ریخته شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و ۰/۵ μL آنزیم ترانسکریپتاز معکوس X ۱۰، ۰/۵ μL بافر آنزیم، ۲ μL inhibitor RNAe۲ درون میکروتیوب اضافه گردید تا به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر برسد.

ساخت پرایمر و PCR: پرایمرهای اختصاصی توسط برنامه ساخت Primer Express طراحی گردید و سپس اختصاصی بودن پرایمر با دقت مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تکثیر ژن، مقدار ۲/۵ میکرولیتر (۲ μL) PCR Buffer 10X، ۱/۲۵ میکرولیتر (۱۰ μM) Primer Forward، ۱/۲۵ میکرولیتر (۱۰ μM) Primer Reverse، ۰/۷۵ میکرولیتر MgCL2، ۰/۵ میکرولیتر (۱۰ mm) dNTP Mix، ۰/۱۲۵ میکرولیتر Taq

گردید. کاهش زمان نهفته و افزایش مدت تشنج به عنوان افزایش شدت تشنج در نظر گرفته شد.

ایجاد تشنج در مدل پنتیلن ترازول. جهت القاء مدل تشنج PTZ در حیوانات، ماده تشنج‌زای PTZ با دوز ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش داخل ورید دمی حیوان [۱۹] تزریق شده و آزمون ارزیابی فعالیت تشنجی به مدت ۲۰ دقیقه و در صورت عدم خاتمه، تا پایان تشنج گرفته شد. پاسخ‌های تشنجی بر اساس الگوی Racine و به شکل زیر طبقه‌بندی شده‌اند:

صفر = بدون پاسخ

۱ = انقباض عضلات صورت و گوش‌ها

۲ = انتشار موج انقباضی به سرتاسر بدن

۳ = پرش‌های میوکولونیک و ایستادن روی دو پا

۴ = افتادن به پهلو

۵ = افتادن به پشت و حملات عمومی، تونیک و کلونیک

در پایان هیپوکامپ مغز حیوانات در زمان‌های بلافاصله (پس از پایان تشنج‌های رفتاری) و ۴ ساعت بعد خارج شده، بیان گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکانابینوئیدی ۱ اندازه‌گیری گردید.

ایجاد تشنج در مدل اسید کاینیک. جهت القاء مدل تشنج اسید کاینیک در حیوانات، موش‌ها را جراحی نموده و پس از طی دوره استراحت ۷ روزه و بهبودی، به حیوانات ماده تشنج‌زای اسیدکاینیک با دوز ۰/۸ میکروگرم بر میکرولیتر در کانول هیپوکامپ تزریق گردید [۲۳]. پس از آن آزمون ارزیابی فعالیت تشنجی به مدت یک ساعت گرفته شد.

رفتار تشنجی به صورت زیر و از صفر تا ۵ رتبه‌بندی شد:

۰ = عدم پاسخ

۱ = چشمک زدن و یا کلونوس صورت در حد خفیف

۲ = تکان دادن سر و یا کلونوس‌های متعدد در ناحیه سر

۳ = پرش‌های میوکولونیک در اندام‌های حرکتی جلو

۴ = تشنجات کلونیک در اندام حرکتی جلویی و بلند شدن

بر روی دو پا

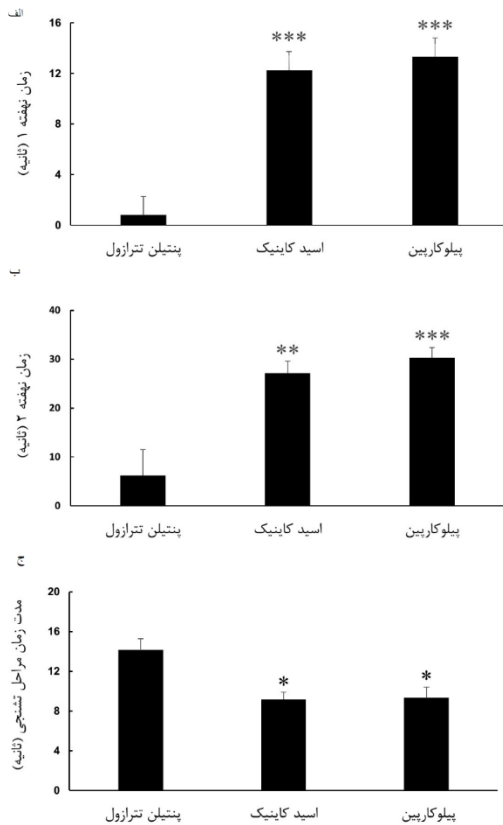
۵ = تشنجات کلونیک و سراسری در بدن و از دست رفتن

تعادل

هیپوکامپ حیوانات در زمان‌های ۴ ساعت و یک هفته بعد از پایان تشنج خارج شده و بیان گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکانابینوئیدی ۱ هیپوکامپی اندازه‌گیری شد.

ایجاد تشنج در مدل پیلوکارپین. جهت القاء مدل تشنج پیلوکارپین در حیوانات این گروه، ابتدا و ۲۰ ساعت قبل از تزریق پیلوکارپین، ۳۰ میلی‌اکسی والان/کیلوگرم لیتیم کلراید به صورت داخل صفاقی تزریق گردید و ۳۰ دقیقه قبل از القای تشنج، هیوسین (یک میلی‌گرم/کیلوگرم) به صورت زیر جلدی

گیرنده اورکسینی ۱ هیپوکامپ موش‌ها ۴ ساعت بعد از تشنج القا شده توسط PTZ، در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$)، اما در زمان "بلافاصله" تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۲). مطالعات PCR نشان داد که میزان بیان ژن گیرنده اندوکائینوئیدی ۱ هیپوکامپ موش‌ها بعد از تشنج القا شده توسط PTZ در زمان "بلافاصله" و همچنین ۴ ساعت بعد از تشنج، در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($P < 0.01$). (شکل ۲)



شکل ۱. مقایسه شدت تشنج (زمان تاخیر اول و دوم و مدت زمان مراحل تشنج) در بین گروه‌ها را نشان می‌دهد. مدت زمان تاخیر اول (الف) و دوم (ب) در دو گروه اسیدکائینیک و پیلوکاربین در مقایسه با گروه پنتیلین-تترازول بطور معنی‌داری افزایش یافتند ($P < 0.01$). مدت زمان تشنجی (ج) در این دو گروه در مقایسه با گروه پنتیلین-تترازول کاهش نشان داد ($P < 0.05$).

DNA Polymerase (5 U/μl)، ۲ میکرولیتر cDNA Template و مابقی آب تزریقی به داخل میکروتیوب ریخته می‌شد تا به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برسد. واکنش به منظور دناتوراسیون رشته‌های DNA در دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، سپس به منظور اتصال پرایمر به رشته‌ها در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت به منظور طویل شدن رشته‌ها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و با تکرار ۴۰ چرخه، در دستگاه PCR انجام گرفت. قرار گرفتن بر روی باند: محصولات RCR در ژل آگارز حاوی TBE 5X الکتروفوروز گردید و به صورت شدت باند ژن هدف به ژن کنترل GAPDH گزارش گردید.

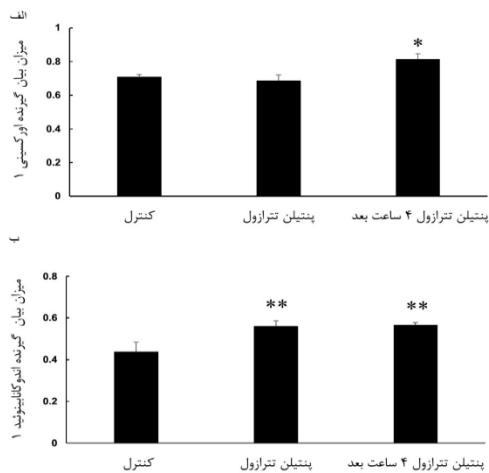
تحلیل آماری. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ صورت گرفت. برای مقایسه چند گروه با یک متغیر از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن جهت مقایسه میانگین گروه‌ها، از آزمون توکی استفاده شد. در همه محاسبات آماری، $P < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

شدت تشنج (زمان نهفته ۱ و ۲ و مدت زمان مراحل تشنجی) در مدل‌های تشنجی PTZ، اسید کائینیک و پیلوکاربین در شکل ۱ با هم مقایسه شده‌اند. آنالیز آماری به روش واریانس یک طرفه نشان داد که مدت زمان نهفته ۱ در گروه‌های اسید کائینیک و پیلوکاربین در مقایسه با گروه PTZ به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P < 0.01$). مدت زمان نهفته ۲ نیز در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان داد، به طوری که در گروه تشنجی اسید کائینیک در مقایسه با PTZ به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.01$). همچنین زمان نهفته ۲ در گروه تشنجی پیلوکاربین در مقایسه با PTZ نیز به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P < 0.01$). از طرفی، آنالیز آماری به روش واریانس یک طرفه با استفاده از آزمون توکی نشان داد که مدت زمان مراحل تشنجی در دو گروه اسید کائینیک و پیلوکاربین در مقایسه با گروه PTZ به طور معنی‌دار کاهش داشته است ($P < 0.05$).

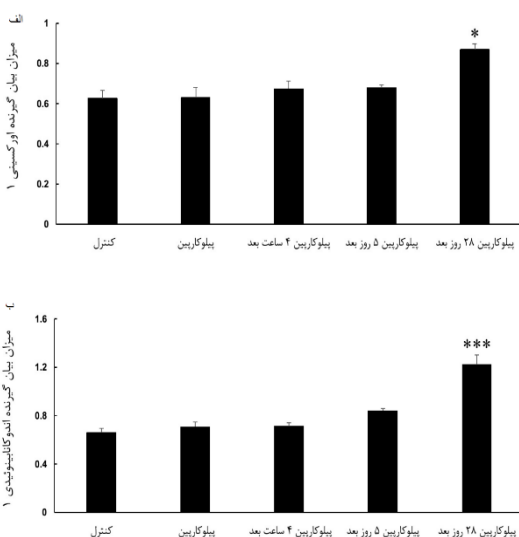
میزان بیان گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکائینوئیدی ۱ در هیپوکامپ موش‌های مدل تشنجی PTZ. میزان بیان ژن گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکائینوئیدی ۱ هیپوکامپ موش‌ها در مدل تشنجی PTZ در زمان‌های "بلافاصله" و ۴ ساعت بعد از تشنج مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه نتایج PCR با استفاده از آزمون توکی نشان داد که میزان بیان ژن

تشنج القا شده توسط پیلوکارپین در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($P < 0.001$) در میزان بیان این دو گیرنده در هیپوکامپ، در زمان‌های "بلافاصله"، ۴ ساعت و ۵ روز بعد از القای تشنج تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$) (شکل ۴).

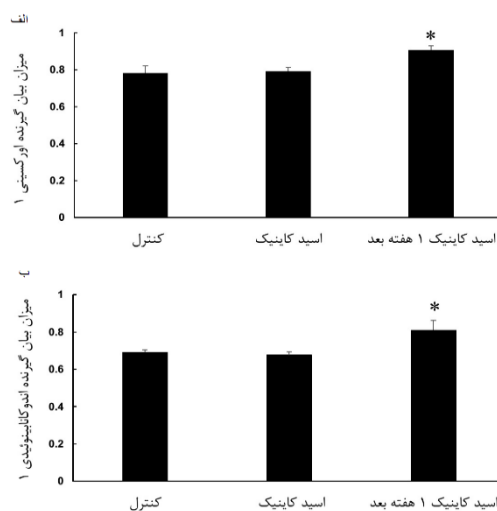


شکل ۳. میزان بیان گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکانابینوئیدی ۱ در هیپوکامپ موش‌ها در مدل تشنجی اسید کاینیک در دو زمان بلافاصله پس از تشنج و یک هفته بعد را نشان می‌دهد. میزان بیان گیرنده اورکسینی ۱ در هیپوکامپ موش‌ها یک هفته بعد از تشنجی شدن به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$ ، الف). میزان بیان گیرنده اندوکانابینوئیدی ۱ در هیپوکامپ موش‌ها در یک هفته بعد از تشنجی شدن بطور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$ ، ب).

شکل ۴. میزان بیان گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکانابینوئیدی ۱ در هیپوکامپ موش‌ها در مدل تشنجی پیلوکارپین در زمان‌های بلافاصله، ۴



ساعت بعد، ۵ و ۲۸ روز بعد را نشان می‌دهد. میزان بیان گیرنده اورکسینی ۱ در هیپوکامپ موش‌ها ۲۸ روز بعد از تشنجی شدن به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$ ، الف). میزان بیان گیرنده اندوکانابینوئیدی ۱ در هیپوکامپ موش‌ها، ۲۸ روز بعد از تشنجی شدن بطور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.001$ ، ب).



شکل ۲. میزان بیان گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکانابینوئیدی ۱ در هیپوکامپ موش‌ها در مدل تشنجی پنتیلین تترازول در زمان‌های بلافاصله و ۴ ساعت بعد را نشان می‌دهد. میزان بیان گیرنده اورکسینی ۱ در هیپوکامپ موش‌ها ۴ ساعت بعد از تشنجی شدن به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$ ، الف). میزان بیان گیرنده اندوکانابینوئیدی ۱ در هیپوکامپ موش‌ها در زمان‌های بلافاصله و ۴ ساعت بعد از تشنجی شدن بطور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.01$ ، ب).

تغییر بیان گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکانابینوئیدی ۱ در هیپوکامپ موش‌های مدل تشنجی اسید کاینیک. میزان بیان ژن گیرنده‌ی اورکسینی ۱ و اندوکانابینوئیدی ۱ هیپوکامپ موش‌ها در مدل تشنجی اسید کاینیک در زمان‌های "بلافاصله" و یک هفته بعد از تشنج مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز آماری به روش واریانس یک‌طرفه با استفاده از آزمون توکی نشان داد که میزان بیان ژن گیرنده اورکسینی ۱ و گیرنده اندوکانابینوئیدی ۱ هیپوکامپ موش‌ها یک هفته بعد از تشنج القا شده توسط اسید کاینیک در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($P < 0.05$ ، در حالی که در زمان "بلافاصله" تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۳).

تغییر بیان گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکانابینوئیدی ۱ در هیپوکامپ موش‌های مدل تشنجی پیلوکارپین. میزان بیان ژن گیرنده‌ی اورکسینی ۱ و اندوکانابینوئیدی ۱ هیپوکامپ موش‌ها در مدل تشنجی پیلوکارپین در زمان‌های "بلافاصله"، ۴ ساعت بعد، ۵ روز و ۲۸ روز بعد از تشنج مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز آماری به روش واریانس یک‌طرفه با استفاده از آزمون توکی نشان داد که میزان بیان ژن گیرنده اورکسینی ۱ هیپوکامپ، ۲۸ روز بعد از تشنج القا شده توسط پیلوکارپین در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$) (شکل ۴). مقایسه نتایج PCR نشان داد که میزان بیان ژن گیرنده اندوکانابینوئیدی ۱ هیپوکامپ، ۲۸ روز بعد از

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، زمان شروع و میزان بیان گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکائینوئیدی ۱ در سه مدل پنتیلین تترازول، پیلوکارپین و اسید کاینیک بر اساس شدت تشنج‌ها (زمان نهفته ۱ و ۲ تشنج و مدت تشنج) مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این مطالعه نشان داد که شدت تشنج‌های مشاهده شده در مدل اسیدکاینیک و مدل پیلوکارپین کم‌تر از مدل پنتیلین تترازول است. به همین ترتیب تغییر بیان گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکائینوئیدی ۱ در هیپوکمپ، در دو مدل اسیدکاینیک و پیلوکارپین دیرتر از مدل پنتیلین تترازول اتفاق افتاد.

مدل‌های مختلف تشنج و سرعت از طریق مکانیسم‌های متفاوتی باعث ایجاد مدل می‌شوند. هر مدل نیز به نوبه خود بروز رفتاری خاصی داشته و عملاً نوع مشخصی از تشنج یا سرعت را مدل می‌کند. مدل پیلوکارپین و اسیدکاینیک در این مطالعه شدت تشنج (تاخیر زمانی بیش‌تر و مدت زمان تشنج کم‌تر) کم‌تری به نسبت مدل PTZ نشان دادند. بر اساس این که در مدل سرعت ناشی از پیلوکارپین، تشنج‌های خودبه‌خودی به وجود می‌آید، این مدل به عنوان مدل بهتری برای سرعت انسانی در نظر گرفته می‌شود. این مطالعه نیز تاییدی بر این مطلب از این منظر است که شدت تشنج کم‌تر می‌تواند باعث تغییرات پلاستیکی در طول زمان گردد و یک یا چند کانون تشنجی به وجود بیاورد. اما تشنج شدید ناشی از PTZ باعث احتمالاً تغییرات زیاد از جمله مرگ نورونی شده و عملکرد ناحیه را دست‌خوش تغییر نماید.

میزان بیان اورکسین در اثر تشنج ناشی از PTZ در هیپوتاموس جانبی افزایش می‌یابد [۲۰]، در حالی که پس از تشنج و نیز در سرعت و تشنج تونیک-کلونیک مکرر، مقدار اورکسین مایع مغزی نخاعی کاهش می‌یابد [۲۱]. مطالعه ما نشان داد که بیان گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکائینوئیدی ۱ در هیپوکمپ موش‌های تشنجی مدل پیلوکارپین و مدل اسیدکاینیک در فاصله زمانی بیش‌تری نسبت به مدل PTZ افزایش پیدا می‌کند.

مطالعات قبلی در این آزمایشگاه نشان داد که میزان بیان گیرنده‌های اورکسینی هیپوکامپ تحت تاثیر استرس تغییر می‌کند. استرس حاد میزان گیرنده اورکسینی ۱ را کاهش و استرس مزمن این گیرنده را در هیپوکامپ افزایش می‌دهد [۲۲]. البته این تفاوت در بیان، بین استرس حاد و مزمن در این مطالعه، در حالت تشنج و سرعت ناشی از پیلوکارپین در این مطالعه وجود نداشته و در هر دو مورد افزایش بیان مشاهده شده است. افزایش بیان ناشی از تشنج در گیرنده‌های اورکسینی می‌تواند

به مکانیسم‌های متفاوت تشنج و استرس مربوط باشد، هر چند تحقیقات تکمیلی در این خصوص لازم است.

میزان بیان گیرنده اندوکائینوئیدی ۱ در مدل‌های تشنج و سرعت ناشی از پیلوکارپین و تب در هیپوکامپ افزایش نشان داده است [۹]. این افزایش در زمان یک ماه پس از تزریق پیلوکارپین نیز مشاهده شده است که با بروز تشنجات خودبه‌خودی هم‌زمانی داشته است [۱۰]. در واقع، میزان بیان گیرنده اندوکائینوئیدی ۱ بعد از تشنجی شدن توسط پیلوکارپین به مرور و تا یک هفته کاهش یافته است که نشانگر پاسخ همئوستاتیک مغز می‌باشد، در حالی که بعد سرعتی شدن توسط پیلوکارپین افزایش را نشان داده است [۲۶، ۲۵، ۱۲، ۱۰]. مطالعه ما نیز افزایش میزان بیان گیرنده اندوکائینوئیدی ۱ را در دو مدل پیلوکارپین و اسیدکاینیک نشان داد و این افزایش در مورد اسیدکاینیک در یک هفته بعد تشنج اولیه بوده است. این در تضاد با مطالعه فوق است که یک هفته پس از تزریق اولیه پیلوکارپین، کاهش بیان مشاهده شده است. شاید دلیل این افزایش در این مطالعه مربوط به نوع مدل باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که تاخیر زمانی کم‌تر و مدت تشنج بیش‌تر (شدت تشنج بالاتر) در مدل‌های تشنجی ناشی از اسیدکاینیک و پیلوکارپین منجر به بیان سریع‌تر ژن گیرنده‌های اورکسینی ۱ و اندوکائینوئیدی ۱ در هیپوکامپ می‌شود. افزایش بیان گیرنده‌های اورکسینی ۱ منجر به افزایش و اندوکائینوئیدی ۱ منجر به کنترل تشنج است یا تشدید آن، بستگی به محل تغییر جمعیت گیرنده‌ها بر روی نورون و نوع نورون دارد که بایستی در تحقیقات آینده مورد بررسی قرار گیرد. اگر چه صرف تغییر بیان گیرنده‌های دخیل در کنترل تشنج می‌تواند به معنای شروع فرایندهای همئوستاتیک مغز باشد که به صورت هم‌راستایی در جهت افزایش برای هر دو گیرنده دیده می‌شود و احتمالاً نشانگر تعادل فرایندهای همئوستاتیک مغز حتی در شرایط القای تشنج می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکتری است که با حمایت مالی دانشگاه دامغان انجام شده است.

منابع

- [1] Ropper AH, Adams R, Victor M, Samuels MA. Adams and Victor's principles of neurology. McGraw Hill Medical 2005.
- [2] Merritt HH. A textbook of neurology. Acad Med 1959; 34: 621.
- [3] Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U. Encyclopedia of neuroscience. 2009. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-29678-2>

- anticonvulsant effects. *Eur J Pharmacol* 2001; 428: 51-57. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01243-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01243-2)
- [16] Marsicano G, Goodenough Sh, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 2003; 302: 84-88. <https://doi.org/10.1126/science.1088208> PMID:14526074
- [17] Kow RL, Jiang K, Naydenov AV, Le JH, Stella N, Nathanson NM. Modulation of pilocarpine-induced seizures by cannabinoid receptor 1. *PLoS One* 2014; 9: e95922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095922> PMID:24752144 PMCID:PMC3994118
- [18] Zhu F, Wang XQ, Chen YN, Yang N, Lang SY, Zuo PP, et al. Changes and overlapping distribution in the expression of CB1/OX1-GPCRs in rat hippocampus by kainic acid-induced status epilepticus. *Brain Res* 2015; 1597: 14-27. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.002> PMID:25446454
- [19] Goudarzi E, Elahdadi Salmani M, Lashkarbolouki T, Goudarzi I. Hippocampal orexin receptors inactivation reduces PTZ induced seizures of male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2015; 130: 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.01.006> PMID:25600753
- [20] Mokhtarpour M, Elahdadi Salmani M, Lashkarbolouki T, Abrari K, Goudarzi I. Lateral hypothalamus orexinergic system modulates the stress effect on pentylenetetrazol induced seizures through corticotropin releasing hormone receptor type 1. *Neuropharmacology* 2016; 110: 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.005> PMID:27395784
- [21] Rejdak K, Papuč E, Grieb P, Stelmasiak Z. Decreased cerebrospinal fluid hypocretin-1 (orexin A) in patients after repetitive generalized tonic-clonic seizures. *Epilepsia* 2009; 50: 1641-1644. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01990.x> PMID:19175390
- [22] Bahramzadeh S. Evaluating the role of hippocampal orexin receptors on social learning and memory impairment following stress in male rats, in *Animal biology*. Damghan Univ 2019; 177. (Persian).
- [23] Dariani S, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Thymoquinone attenuates astrogliosis, neurodegeneration, mossy fiber sprouting, and oxidative stress in a model of temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci* 2013; 51: 679-686. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0043-3> PMID:23794216
- [24] Sarfi M, Elahdadi Salmani M, Goudarzi I, Lashkar Boluki T, Abrari K. Evaluating the role of astrocytes on β -estradiol effect on seizures of Pilocarpine epileptic model. *Eur J Pharmacol* 2017; 797: 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.01.005> PMID:28088383
- [25] Falenski K, Blair RE, Sim-Selley LJ, Martin BR, DeLorenzo RJ. Status epilepticus causes a long-lasting redistribution of hippocampal cannabinoid type 1 receptor expression and function in the rat pilocarpine model of acquired epilepsy. *Neuroscience* 2007; 146: 1232-1244. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.065> PMID:17433556 PMCID:PMC2617754
- [26] Karlócai MR, Tóth K, Watanabe M, Ledent C, Juhász G, Freund TF, Maglóczy Z. Redistribution of CB1 cannabinoid receptors in the acute and chronic phases of pilocarpine-induced epilepsy. *PLoS One* 2011; 6: e27196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027196> PMID:22076136 PMCID:PMC3208595
- [4] Wallace MJ, Blair RE, Falenski KW, Martin BR, DeLorenzo RJ. The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307: 129-137. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.051920> PMID:12954810
- [5] Ben-Ari Y, Crepel V, Represa A. Seizures beget seizures in temporal lobe epilepsies: the boomerang effects of newly formed aberrant kainatergic synapses. *Epilepsy Curr* 2008; 8: 68-72. <https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2008.00241.x> PMID:18488058 PMCID:PMC2384153
- [6] Choi HS, Lee CH. Time-course changes of hippocampal expression in the mouse hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *J Vet Sci* 2016; 17: 137-144. <https://doi.org/10.4142/jvs.2016.17.2.137> PMID:26435544 PMCID:PMC4921661
- [7] Smirnova EY, Amakhin DV, Malkin SL, Chizhov AV, Zaitsev AV. Acute changes in electrophysiological properties of cortical regular-spiking cells following seizures in a rat lithium-pilocarpine model. *Neuroscience* 2018; 379: 202-215. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.03.020> PMID:29580962
- [8] Bojnik E, Turunç E, Armağan G, Kanit L, Benyhe S, Yalçın A, Borsodi A. Changes in the cannabinoid (CB1) receptor expression level and G-protein activation in kainic acid induced seizures. *Epilepsy Res* 2012; 99: 64-68. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.10.020> PMID:22079489
- [9] Soltesz I, Alger BE, Kano M, Lee SH, Lovinger DM, Ohno-Shosaku T, Watanabe M. Weeding out bad waves: towards selective cannabinoid circuit control in epilepsy. *Nat Rev Neurosci* 2015; 16: 264-277. <https://doi.org/10.1038/nrn3937> <https://doi.org/10.1038/nrn3974> PMID:25891509
- [10] Falenski KW, Carter DS, Harrison AJ, Martin BR, Blair RE, DeLorenzo RJ. Temporal characterization of changes in hippocampal cannabinoid CB1 receptor expression following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res* 2009; 1262: 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.01.036> PMID:19368833 PMCID:PMC2841984
- [11] Bhaskaran MD, Smith BN. Cannabinoid-mediated inhibition of recurrent excitatory circuitry in the dentate gyrus in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *PLoS One* 2010; 5: e10683. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010683> PMID:20498848 PMCID:PMC2871782
- [12] Ludányi A, Eross L, Czirájk S, Vajda J, Halász P, Watanabe M, et al. Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. *J Neurosci* 2008; 28: 2976-2990. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4465-07.2008> PMID:18354002 PMCID:PMC6670708
- [13] Maglóczy Z, Tóth K, Karlócai R, Nagy S, Eross L, Czirájk S, et al. Dynamic changes of CB1-receptor expression in hippocampi of epileptic mice and humans. *Epilepsia* 2010; 51: 115-120. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02624.x> PMID:20618415 PMCID:PMC2909018
- [14] Wilson RI, Nicoll RA. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 2001; 410: 588-592. <https://doi.org/10.1038/35069076> PMID:11279497
- [15] Wallace MJ, Wiley JL, Martin BR, DeLorenzo RJ. Assessment of the role of CB1 receptors in cannabinoid

Altered expression of orexin 1 and endocannabinoid 1 receptors of the hippocampus in three pentylenetetrazol, pilocarpine and kainate seizure models

Giti Nasudi (M.Sc)¹, Mahmoud Elahdadi Salmani (Ph.D)^{*1}, Narges Hosseinmardi (Ph.D)², Taghi Lashkarbolouki (Ph.D)¹, Iran Goudarzi (Ph.D)¹, Farshad Moradpour (Ph.D)³

¹ – Dept. of animal biology, School of biology, Damghan University, Damghan, Iran

² – Dept. of physiology, Faculty of medical sciences, Shahid Beheshti University of medical sciences, Tehran, Iran

³ – Dept. of physiology, Faculty of medical sciences, Kermanshah University of medical sciences, Kermanshah, Iran

* Corresponding author. +98 23 35220223 elahdadi@du.ac.ir

Received: 19 Mar 2020; Accepted: 6 Oct 2020

Introduction: Seizure is synchronous and abnormal brain neuronal activity that leads to activation of different receptors capable of enhancing or suppressing seizure activity such as orexin receptor 1 (OXR1) and/or endocannabinoid receptor 1 (CBR1). The time of activation for the receptors may influence seizure control. Therefore, this study aimed to investigate the latency for and the change of the expression of OXR1 or CBR1 following seizures in three pentylenetetrazol (PTZ), kainic acid (KA), and Pilocarpine seizure models.

Materials and Methods: Fifty-six male Wistar rats were allocated in the three PTZ, KA, and Pilocarpine groups. Seizure intensity was calculated upon latencies to seizures (from injection to seizure; latency 1 and from seizure to tonic-clonic; latency 2) and seizure duration. OXR1 and CBR1 gene expressions were evaluated using RT-PCR and the results were compared with the control group (without seizure induction).

Results: Our study showed that latency 1 and 2 significantly increased in the KA and Pilocarpine models compared with PTZ, while the seizure duration reduced. Relatively, the expression of OXR1, four hours, and CBR1, instantly and four hours following the PTZ application was augmented. The expression of OXR1 and CBR1, one week following KA perfusion was enhanced, while the increase in the receptor expressions was demonstrated 28 days after Pilocarpine injection.

Conclusion: Results of the study demonstrated that the shorter the latency of seizures in a model and longer the seizure durations, the increase in the OXR1 and CBR1 may be hastened.

Keywords: Seizure, Orexin Receptor, Endocannabinoid, Hippocampus.