



Alterations of the expression of RGS4 and RGS10 proteins in the anticonvulsant effects of low frequency stimulation on perforant path kindling in adult male rats

Simin Namvar, Javad Mirnajafi-Zadeh*, Mohammad Javan, Maryam Zeraati

Dept. Physiology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 13 May 2010

Accepted: 24 July 2010

Abstract

Introduction: Application of low-frequency stimulation (LFS) is a new method for treatment of drug resistant epileptic patients. Previous studies demonstrated that activation of receptors coupled to G_i proteins is one of the mechanisms of the anticonvulsant effect of LFS. Thus, in this study, alterations in the expression of RGS4 and RGS10 proteins, as negative regulators of G_i proteins, were investigated.

Methods: Animals were kindled by perforant path stimulation in a rapid kindling manner (12 stimulation per day, 1 ms pulse duration at 50 Hz). LFS (8 stimulation per day, 0.1 ms pulse duration at 1 Hz, 200 pulses) was applied to the perforant path 5 minute after the termination of kindling stimulations. After electrophysiological recordings for 6 days, the dentate gyrus of the animals was removed and RGS4 and RGS10 protein expression was studied by western blotting technique.

Results: Application of LFS significantly retarded kindling acquisition and increased the number of stimulations to achieve different stages of seizure. LFS also significantly reduced after discharge duration. In addition, application of LFS after kindling stimulation reduced the expression of RGS4 and RGS10 proteins.

Conclusion: Results of the present study showed that LFS has anticonvulsant effects on the perforant path kindling. Application of LFS following kindling stimulation reduced the expression of RGS4 and RGS10 proteins. Reduction of the expression of these proteins results in the longer activation of signaling pathways of G_i proteins, which may be responsible for LFS anticonvulsant effects.

Key words: Seizure, Low-frequency stimulation, RGS proteins, Dentate gyrus, Kindling

*Corresponding author e-mail: mirnajaf@modares.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

تغییر بیان پروتیین های RGS4 و RGS10 به دنبال ایجاد اثرات ضد تشنجی تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین در کیندلینگ مسیر پرفورنت در موش صحرائی نر بالغ

سیمین نامور ، سیدجواد میرنجفی زاده* ، محمد جوان ، مریم زراعتی
گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

پذیرش: ۲ مرداد ۸۹

دریافت: ۲۳ اردیبهشت ۸۹

چکیده

مقدمه: اثرات درمانی استفاده از تحریک الکتریکی با فرکانس پایین (LFS) در بیماران مبتلا به صرع مقاوم به درمان در حال مطالعه است. یکی از مکانیسم های عمل LFS فعال کردن گیرنده هایی است که به پروتیین های G_i مرتبط هستند، در این تحقیق تغییر بیان پروتیین های RGS4 و RGS10، به دنبال ایجاد اثرات ضد تشنجی LFS بررسی شد.

روش ها: حیوانات با روش کیندلینگ سریع با تحریکات الکتریکی مسیر پرفورنت کیندل شدند. LFS هر روز پس از اتمام تحریک کیندلینگ اعمال می شد. بعد از اتمام ثبت ها از ناحیه شکنج دنداندار نمونه برداری شد و با روش وسترن بلات تغییر بیان پروتیین های RGS4 و RGS10 LFS بررسی شد.

یافته ها: اعمال LFS به مسیر پرفورنت روند کیندلینگ را به طور بارزی به تاخیر انداخت و تعداد تحریکات لازم برای رسیدن به هر یک از مراحل مختلف تشنج را افزایش داد. همچنین به دنبال اعمال LFS مدت زمان امواج تخلیه های متعاقب به طور معنی داری کاهش یافت. اعمال LFS پس از تحریکات کیندلینگ بیان پروتیین های RGS4 و RGS10 را کاهش داد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد LFS اثر ضد تشنجی معنی داری بر تشنجات القا شده توسط کیندلینگ مسیر پرفورنت دارد. اعمال LFS پس از تحریکات کیندلینگ بیان RGS4 و RGS10 را کاهش داد. بنابراین، با کاهش بیان این پروتیین ها مسیرهای داخل سلولی مرتبط با G_i مدت زمان بیشتری فعال می ماند.

واژه های کلیدی: تشنج، تحریک الکتریکی با فرکانس پایین، پروتیین های RGS، شکنج دنداندار، کیندلینگ

مقدمه

که با تخلیه های ناگهانی و همزمان مجموعه ای از نوروها مشخص می گردد [۲۱، ۱۴، ۵]. صرع لوب گیجگاهی (Temporal lobe epilepsy) شایع ترین اختلال صرعی در بالغین است و یکی از نواحی رایج در ایجاد صرع لوب گیجگاهی، شکنج دنداندار می باشد [۱۱]. شکنج دنداندار (Dentate gyrus) از سه لایه تشکیل شده است. ۱) لایه

صرع مجموعه ای از اختلالات نورولوژیکی مزمن می باشد

mirnajaf@modares.ac.ir
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

که بیش از ۳۰ عضو دارند و هم در نورون و هم در گلیا بیان می شوند. پروتیین های RGS به عنوان تعدیل کننده و تنظیم کننده منفی سیگنالینگ پروتیین های G شناخته می شوند. پروتیین های RGS با تحریک فعالیت GTPase زیر واحد α پروتیین های G می توانند سیگنالینگ پروتیین های G را تحت تأثیر قرار دهند. پروتیین های RGS همچنین می توانند به عنوان آنتاگونیست افکتورها عمل کنند که این کار را از طریق رقابت با ملکول های افکتور برای اتصال به $G\alpha$ فعال انجام می دهند [۲۲]. از میان انواع مختلف پروتیین های RGS، RGS10 و RGS4 نقش مهمی در تنظیم عملکرد پروتیین های G_i در تشکیلات هیپوکمپ به عهده دارند. RGS4 که به عنوان فعال کننده فعالیت GTPase در چندین عضو زیر واحد های $G_{i\alpha}$ عمل کرده و از مهار آدنیلات سیکلاز جلوگیری می کند، به میزان زیادی در تشکیلات هیپوکمپ بیان می شود [۱۶]. RGS10 نیز به طور متراکمی در سلول های گرانولی شکنج دندان دار بیان می شود و فعالیت GTPase را در G_i/o افزایش می دهد و در نهایت میزان cAMP را بالا نگه می دارد [۶]. گزارش های ضد و نقیضی نیز در مورد تغییر بیان پروتیین های RGS10 و RGS4 به دنبال تشنج وجود دارد. با توجه به این که احتمال داده می شود به دنبال اعمال LFS میزان فعالیت پروتیین های G_i افزایش پیدا کند، و با توجه به نقش پروتیین های RGS10 و RGS4 در تنظیم عملکرد پروتیین های G_i ، در این تحقیق ما تغییر بیان این پروتیین ها را به دنبال القای تشنج و اعمال تحریکات LFS بررسی نمودیم.

مواد و روشها

در این آزمایش از موش صحرایی نژاد Wistar در محدوده وزنی ۲۶۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. هر حیوان توسط سدیم پنتوباریتال داخل صفاقی (۶۰ mg/kg) بیهوش شده و برای عمل جراحی در استریوتاکس قرار داده می شد. موقعیت مسیر پرفورنت و شکنج دندان دار نسبت به برگما تعیین گردیده و الکترود دو قطبی تحریک در مسیر پرفورنت و الکترود تک قطبی ثبات در ناحیه شکنج دندان دار قرار داده می شد. جنس الکترودها از فولاد ضد زنگ (stainless steel) بود. پس از

ملکولی که سطحی ترین لایه است و تقریباً لایه بدون سلول می باشد. (۲) لایه اصلی، لایه گرانولی است که در عمق لایه ملکولی واقع شده و به اندازه ۴ تا ۸ سلول گرانولی ضخامت دارد. (۳) لایه پلی مورفیک لایه سوم شکنج دندان دار می باشد و توسط دو لایه فوق احاطه می شود. شکنج دندان دار ورودی اصلی خود را از قشر انتورینال و از طریق مسیر پرفورنت دریافت می کند [۱]. برای مطالعه صرع لوب گیجگاهی و فهم فرایندهای دخیل در ایجاد آن، از مدل های حیوانی نظیر کیندلینگ الکتریکی استفاده می کنند [۱۱]. در کیندلینگ به دنبال تحریکات الکتریکی متوالی، با شدت پایین و زیر آستانه ای به نواحی ویژه ای از مغز قدامی، تشنج های رفتاری پیشرونده ایجاد می شود [۲، ۱۵].

امروزه علی رغم استفاده از داروهای ضد صرعی، تقریباً ۳۰٪ بیماران از صرع مقاوم به درمان رنج می برند [۲۰]. بنابراین استفاده از روش های درمانی جدید از جمله تحریک الکتریکی عمقی مغز مورد توجه محققین قرار گرفته است. امروزه سعی می کنند که در درمان صرع مقاوم به دارو، از تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین (LFS: low frequency stimulation) استفاده کنند. تحریکات با فرکانس پایین تر از ۱۰ هرتز، سبب تضعیف سیناپسی طولانی مدت (LTD) و تضعیف پس از تقویت (Depotential) می شود [۸]. علی رغم افزایش مدارک و دلائل برای اثر ضد صرعی LFS، استفاده از آن هنوز به عنوان روش درمان صرع پذیرفته نشده است. به نظر می رسد که مکانیسم ضد تشنجی LFS مشابه با مکانیسم های دخیل در LTD و یا تضعیف پس از تقویت باشد [۲۴].

مطالعات قبلی ما نشان داده اند که فعالیت گیرنده های آدنوزینی A_1 و گیرنده های گالانینی در ایجاد اثرات ضد تشنجی LFS دخیل هستند [۱۰، ۱۸]. این مواد از طریق فعال کردن گیرنده های سطح سلولی خود که با پروتیین های G_i جفت می شوند، نقش فیزیولوژیکی خود را انجام می دهد. بنابراین، عوامل موثر بر فعالیت پروتیین های G_i ممکن است در واسطه گری اثرات ضد تشنجی LFS نقش داشته باشند [۱۰، ۱۸].

پیام رسانی پروتیین های G توسط پروتیین های بنام RGS (Regulatory of G proteins signaling) تنظیم می شود

بستن پیچ‌های لنگرگاه و الکترودهای تحریک و ثبات به ترتیب در محل‌های تعیین شده با استفاده از استیمولاتور، تحریک الکتریکی با شدت ۵۰۰ میکروآمپر تا ۱ میلی آمپر از طریق الکترودهای تحریک به مسیر پرفورنت داده می‌شد. در صورت قرار داشتن الکترودها در محل مناسب از طریق الکترودهای ثبات یک پتانسیل پس سیناپسی تحریکی تجمعی (pEPSP) ثبت می‌گردید. در غیر این صورت، الکترودهای تحریک و ثبات آن قدر جا به جا می‌شد تا یک pEPSP با حداکثر دامنه بین ۳-۵ میلی ولت ثبت می‌شد. سپس با سیمان دندانپزشکی الکترودها و پیچ‌ها به مجموعه حیوان ثابت می‌شدند. برای بهبودی زخم‌ها و دست آموز شدن حیوان، ۱۰ روز به حیوان استراحت داده می‌شد. پس از ۱۰ روز حیوانات طبق پروتکل تعریف شده تحریک و به طور میانگین ۶ روز ثبت‌های الکتروفیزیولوژیک گرفته می‌شد. ۲۴ ساعت پس از آخرین تحریک، از ناحیه شکنج دنداندار نمونه برداری انجام شده و نمونه‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری می‌گردیدند.

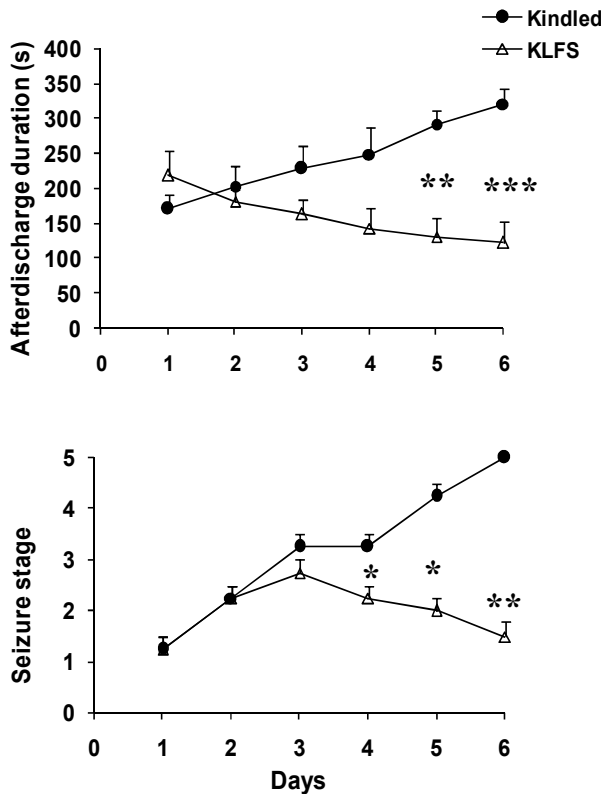
برای ایجاد تشنج در حیوانات از روش کیندلینگ سریع استفاده شد. در این روش حیوانات با موج مربعی تک فازی با مشخصات فرکانس ۵۰ هرتز، شدت آستانه تولید امواج تخلیه متعاقب، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و به مدت ۳ ثانیه تحریک شدند. این تحریکات به فاصله هر ۵ دقیقه یک بار و ۱۲ بار در روز اعمال شد و تا زمان نشان دادن مرحله ۵ تشنج تحریک‌ها اعمال می‌گردید. پس از اعمال تحریک کیندلینگ، امواج تخلیه متعاقب توسط الکترودهای ثبت و توسط برنامه کامپیوتری اندازه‌گیری می‌گردید. مراحل رفتاری تشنج بر اساس معیارهای Racine به صورت زیر تفهیم بندی می‌شوند: مرحله یک، انقباضات عضلانی صورت (Facial clonus); مرحله دوم، حرکت دادن سر به طرف بالا و پایین (Head nodding); مرحله سوم، کلونوس اندام جلویی (Forelimb clonus); مرحله چهارم، ایستادن روی هر دو پا (Rearing) توام با کلونوس اندام جلویی و مرحله پنجم، ایستادن روی هر دو پا همراه با از دست دادن تعادل و افتادن (Rearing & Falling) [۱۷].

برای اعمال LFS، هر روز پس از پایان ۱۲ تحریک کیندلینگ، LFS به صورت ۸ بسته تحریکی که هر کدام شامل ۲۰۰ پالس به شکل امواج مربعی با فرکانس ۱ هرتز، مدت پالس ۱ میلی ثانیه و با شدت آستانه ایجاد امواج تخلیه متعاقب

بود، هر ۵ دقیقه یک بار به حیوان اعمال می‌شد. هنگام نمونه‌گیری، برش‌گیری به وسیله تیغ انجام شد (زیرا بافت مغز خیلی نرم است به وسیله پانچ نمی‌توان نمونه‌گیری کرد). در نمونه‌گیری برای کار و سترن بلات باید پروتیین‌ها سالم بمانند، بنابراین در زمان طلایی ۲ دقیقه نمونه‌گیری انجام شد. بعد از برداشت بافت مغز، بلافاصله در محلول مایع مغزی-نخاعی حاوی یخ قرار می‌گرفت. سپس ناحیه شکنج دنداندار برداشته می‌شد (یعنی نمونه‌ها شامل هر سه لایه این ناحیه بود). اندازه بافت شکنج دنداندار به طور متوسط ۳ میلی متر در ۲ میلی متر بوده و وزن آن نیز ۰/۵ گرم بود. برای انجام و سترن بلات، نمونه‌ها به وسیله بافر لیز هموژن می‌شدند. سپس توسط روش برادفورد غلظت پروتیین‌ها اندازه‌گیری می‌گردید. با توجه به غلظت پروتیین، حجمی از محلول پروتیینی که در هر بار آزمایش مورد استفاده قرار می‌گرفت، به دست آورده می‌شد. سپس محلول پروتیینی مورد نظر روی ژل پلی آکریل آمید-سدیم دو دسیل سولفات در یک سیستم بافوری ناپیوسته الکتروفورز می‌شد. بعد از این مرحله، باندهای پروتیین‌های جدا شده را با استفاده از جریان الکتریسته از روی ژل به کاغذ PVDF منتقل کرده (ایمونولات) و پس از آماده شدن بلات (کاغذ) به مدت ۲ ساعت در معرض محلول بلاکینگ (milk 5% +BSA Skim) قرار داده می‌شد تا تمام منافذ کاغذ که پروتیین به آن متصل نشده، توسط آن پوشانده شود. این کار سبب می‌شود که از اتصال آنتی بادی به این منافذ جلوگیری شود. در مرحله بعد به مدت ۱۲ ساعت بلات در معرض آنتی بادی اولیه قرار داده می‌شد. در این مدت آنتی بادی به پروتیین‌های روی بلات متصل می‌گردید. سپس بلات به وسیله محلول شستشو به مدت یک ساعت شستشو داده شده و سپس به مدت یک ساعت در معرض آنتی بادی ثانویه قرار می‌گرفت. بعد از شستشوی کافی با استفاده از کیت ECL advanced و محلول ظهور و ثبوت باندهای پروتیینی روی فیلم عکاسی ظاهر می‌شد.

گروه‌های مورد آزمایش عبارت بودند از:

- ۱- گروه کنترل: در این گروه فقط جراحی انجام می‌شد و پس از دوره بهبودی، به مدت ۶ روز نگهداری می‌شدند.
- ۲- گروه کیندل: در این گروه برای تحریک حیوانات از



شکل ۱- اعمال تحریکات کیندلینگ در گروه کیندل، مدت زمان امواج تخلیه های متعاقب را به طور معنی داری افزایش می دهد. مراحل رفتاری تشنج نیز در طی روند کیندلینگ به طور معنی داری افزایش می یابد. اعمال LFS در گروه کیندل+LFS (KLFS) مدت زمان امواج تخلیه های متعاقب را کاهش می دهد و این کاهش در روزهای ۵ و ۶ نسبت به روزهای اول به طور معنی داری بیشتر است. همچنین اعمال LFS در گروه KLFS موجب می شود برای رسیدن به مراحل ۴، ۵ و ۶ تشنج تعداد تحریکات بیشتری لازم باشد. داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده اند. * نشان دهنده $P < 0.05$ ، ** نشان دهنده $P < 0.01$ و * نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کیندل است ($n = 5$).**

($P < 0.001$) افزایش و در گروه کیندل+LFS به طور معنی داری کاهش ($P < 0.001$) می یابد. همچنین مدت زمان تخلیه های متعاقب تفاوت معنی داری ($P < 0.001$) بین گروه کیندل و گروه کیندل+LFS دارد (شکل ۱). مراحل رفتاری تشنج نیز در طی روند کیندلینگ در گروه کیندل به طور معنی داری ($P < 0.001$) پیشرفت می کند. مراحل رفتاری تشنج بین گروه کیندل و کیندل+LFS در روزهای ۴، ۵ ($P < 0.05$) و ۶ ($P < 0.01$) تفاوت معنی داری دارد (شکل ۱).

آنالیز آماری نتایج حاصل از وسترن بلات نشان داد که بیان پروتیین RGS4 و RGS10 در گروه LFS نسبت به گروه کنترل تغییر معنی داری نداشت، اما در گروه کیندل+LFS نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری ($P < 0.001$) کاهش

روش کیندلینگ سریع استفاده می شد. این گروه هر روز ۱۲ تحریک با فواصل ۵ دقیقه دریافت می کردند و این تحریکات تا زمانی که مرحله ۵ تشنج را نشان دهند، ادامه می یافت.

۳- گروه کیندل+LFS: در این گروه به مدت ۶ روز (میانگین مدت زمانی که طول می کشد تا حیوانات گروه کیندل مرحله ۵ تشنج را نشان دهند) حیوانات تحریکات کیندلینگ دریافت می کردند. هر روز ۵ دقیقه پس از پایان تحریکات کیندلینگ به این گروه تحریکات LFS اعمال می شد.

۴- گروه FS: این گروه به مدت ۶ روز فقط تحریکات LFS دریافت می کردند.

در گروه های کیندل و کیندل+LFS دو کمیت تشنجی، یعنی تعداد تحریکات لازم تا رسیدن به هر یک از مراحل رفتاری تشنج و مدت زمان امواج تخلیه متعاقب، اندازه گیری شد. تغییر بیان پروتیین های RGS4 و RGS10 نیز در گروه های کنترل، کیندل، کیندل+LFS و LFS توسط تکنیک وسترن بلات اندازه گیری شد.

برای تجزیه و تحلیل داده های مربوط به مدت زمان امواج تخلیه های متعاقب از آزمون ANOVA دو طرفه و آزمون متعاقب Bonferroni استفاده شد. برای بررسی تغییر مراحل رفتاری تشنج در گروه های کیندل و کیندل+LFS از آزمون Kruskal-Wallis و آزمون متعاقب Mann-Whitney U-test استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده های مربوط به نتایج حاصل از وسترن بلات از آزمون ANOVA یک طرفه و آزمون متعاقب Tukey استفاده شد. داده ها به صورت (میانگین $\pm$ خطای معیار میانگین) ارائه شده و $P < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

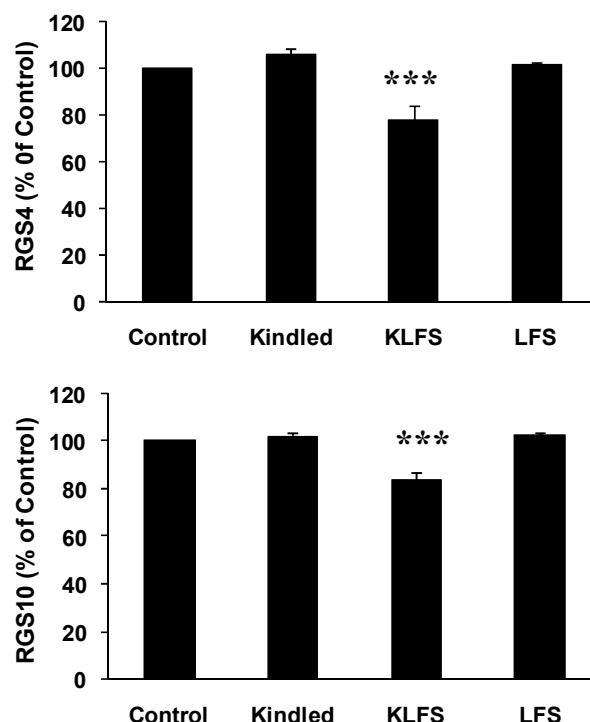
یافته ها

بررسی مراحل رفتاری تشنج نشان داد که اعمال تحریکات الکتریکی با فرکانس پایین سبب به تاخیر افتادن روند کیندلینگ می شود به گونه ای که تعداد تحریکات لازم برای رسیدن به مراحل ۴ و ۵ در گروه کیندل+LFS بیشتر از گروه کیندل می باشد. آنالیز آماری نشان داد که در طی روند کیندلینگ، مدت زمان امواج تخلیه های متعاقب در روزهای ۵ و ۶ گروه کیندل نسبت به روز اول به طور معنی داری

با فرکانس پایین به کانون های صرعی می تواند اثرات ضدصرعی داشته باشد. همچنین در موش های صحرایی کیندل شده، LFS اثر بازدارنده روی فعالیت کانون تشنجی دارد [۲۳]. اعمال LFS به کانون کیندلینگ سبب افزایش آستانه تخلیه امواج متعاقب در آمیگدال و هیپوکمپ شده و القای تشنج را به تأخیر می اندازد [۲۴]. بنابراین، یافته های ما، نتایج حاصل از آزمایش های قبلی را تأیید می کند.

اثر LFS روی فعالیت سیناپسی پایه اولین بار در مدل تقویت طولانی مدت (LTP) مورد مطالعه قرار گرفت [۳]. اعمال LFS سبب برگرداندن تقویت ایجاد شده با فرکانس بالا شد (تضعیف پس از تقویت). مدل کیندلینگ صرع لوب گیجگاهی و مدل حافظه ای LTP مکانیسم های مشابهی دارند. در هر دو مدل تسهیل سیناپسی مشاهده می شود و ملکول های سیگنالینگ یکسانی در هر دو مدل نقش های کلیدی دارند [۷]. بنابراین، مکانیسم های مشابهی ممکن است توجیه کننده اثر مهار LFS در کیندلینگ و LTP باشد. از طرف دیگر LFS سبب ایجاد LTD نیز در سیناپس ها می شود. این دو تغییر در عملکرد سیناپسی به دنبال اعمال LFS هم در داخل بدن (in vivo) و هم در خارج از بدن موجودات زنده (in vitro) مشاهده شده است. بر این اساس می توان احتمال داد که مکانیسم ضد تشنجی LFS مشابه مکانیسم های دخیل در تضعیف پس از تقویت یا LTD باشد [۲۴]. البته باید در نظر داشت که القای LTD در شرایط پایه در شکنج دنداندار در حیوانات بالغ خیلی موفقیت آمیز نبوده و احتمالاً اثر ضد تشنجی LFS در ناحیه شکنج دنداندار در طی روند کیندلینگ بیشتر از طریق تضعیف پس از تقویت صورت می گیرد [۲۴]. شاید به این علت در آزمایش ما، اعمال LFS به تنهایی تغییری در بیان پروتیین ها ایجاد نکرد.

مطالعات فارماکولوژیک نشان داده است که LFS اثرات خود را تا حدی از طریق فعال کردن گیرنده هایی که به پروتیین های G متصل هستند، مانند گیرنده های آدنوزینی A1، گیرنده های گالانینی و گیرنده های متابوتروفیکی گلوتاماتی اعمال می کند [۱۰، ۱۲، ۱۸]. این گیرنده ها از طریق فعال کردن زیر واحد آلفای پروتیین Gi عمل می کنند. به دنبال فعالیت این گیرنده ها میزان cAMP و پروتیین کیناز A داخل سلولی کاهش می یابد. پروتیین کیناز A با فعال کردن



شکل ۲- تغییر بیان پروتیین های RGS4 و RGS10 در گروه های کنترل، کیندل، کیندل+LFS و LFS بیان پروتیین RGS4 و RGS10 در گروه کیندل+LFS (KLFS) از گروه های کنترل، کیندل و LFS به طور معنی داری کمتر می باشد. داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار نشان داده شده اند. *** نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کیندل است (n=4).

یافته است. همچنین بیان این پروتیین هادر گروه کیندل+LFS از گروه کیندل و از گروه LFS به طور معنی داری کمتر می باشد (شکل ۲). ($P < 0.001$)

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که LFS اثر مهار بر روند کیندلینگ مسیر پرفورنت دارد و این اثرات تا حدی وابسته به فعالیت پروتیین های RGS4 و RGS10 به عنوان تنظیم کننده های سیگنالینگ $G_{i\alpha}$ است.

همانند تحقیقات قبلی [۱۰، ۱۸] نتایج این تحقیق نیز نشان دادند که LFS سبب به تأخیر افتادن مراحل مختلف رفتاری تشنج شده و موجب می شود که برای رسیدن به هر یک از مراحل رفتاری تشنج تعداد تحریکات بیشتری لازم باشد. همچنین به دنبال اعمال LFS تغییر قابل ملاحظه ای در طول مدت زمان تخلیه های متعاقب ایجاد می شود.

مطالعات قبلی نشان داده اند که اعمال تحریکات الکتریکی

گلوتامات و پپتیدها می شوند. به این ترتیب می توان گفت که پروتیین های RGS در تنظیم فعالیت سیستم عصبی مرکزی اهمیت ویژه ای دارند [۴]. مطالعات قبلی نشان داده است که پروتیین RGS4 سبب خاتمه مسیرهای داخل سلولی گیرنده های متابوتروپیک گلوتاماتی نوع ۱ و ۵ می شود و از این طریق تحریک پذیری نورونی را در سیستم عصبی مرکزی تحت تأثیر قرار می دهد [۲۱].

در این تحقیق بیان پروتیین های RGS4 و RGS10 به دنبال کیندلینگ تغییر معنی داری نکرد ولی به دنبال اعمال LFS پس از تحریکات کیندلینگ به طور بارزی بیان این پروتیین ها کاهش پیدا کرد. چون این پروتیین ها سبب خاتمه مسیر های سیگنالینگ داخل سلولی می شوند که توسط زیر واحد α پروتیین های Gi شروع می شود، کاهش بیان این پروتیین ها سبب می شود این مسیرهای داخل سلولی مدت زمان بیشتری فعال بمانند. این یافته ها نشان می دهد که مسیر های داخل سلولی که توسط پروتیین های Gi شروع می شوند نقش مهمی در اثرات مهار و ضد تشنجی LFS دارند. نتایج حاصل از این تحقیق در ادامه و تایید یافته های حاصل از مداخلات دارویی است. در عین حال با توجه به نقش انواع دیگر پروتیین های RGS به مطالعات بیشتری برای بررسی نقش آنها در بروز اثرات ضد تشنجی LFS نیاز است.

سپاسگزاری

منابع مالی این تحقیق از محل پروژه تحقیقاتی مصوب صندوق حمایت از پژوهشگران کشور تأمین شده است. بدین وسیله از این سازمان تشکر و قدردانی به عمل می آید.

فاکتور های نسخه برداری میزان بیان پروتیین های دخیل در کیندلینگ و تشنج را تغییر می دهد. مطالعات نشان داده است که میزان cAMP و پروتیین کیناز A در مغز بیماران تشنجی و افراد سالم متفاوت است [۲۵]. بنابراین، این احتمال مطرح می شود که ممکن است LFS با افزایش فعالیت Gi به مهار تشنج کمک می کند.

فعالیت زیر واحد α پروتیین Gi توسط تعدادی از پروتیین های تنظیم کننده سیگنالینگ پروتیین های G از جمله RGS4 و RGS10 تنظیم می شود. این پروتیین ها با افزایش فعالیت GTPase زیر واحد α پروتیین Gi سبب خاتمه سیگنالینگ آن می شود [۱۶]. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که به دنبال اعمال LFS بیان RGS4 و RGS10 کاهش می یابد که نشان دهنده نقش این پروتیین ها در اثرات ضد تشنجی LFS می باشد. برای ارزیابی تنظیم میزان بیان این پروتیین ها، اثر تشنج حاد روی مقدار بیان RGS10 در هیپوکمپ بررسی شده است. تغییر در میزان بیان RGS10 بارز بوده و تقریباً ۴۰٪ کاهش در بیان آن دیده شده است [۶]. همچنین مشاهده کردند که به دنبال کیندلینگ بیان RGS4 در هیپوکمپ افزایش می یابد [۱۳]. این نتایج نشان دهنده تنظیم دینامیک پروتیین های RGS4 و RGS10 می باشد. از طرف دیگر، مطالعات دیگری نیز نشان دهنده نقش پروتیین های RGS در تغییر فعالیت سیناپسی می باشد [۲۳]. همچنین نشان داده شده است که پروتیین های RGS از طریق تنظیم مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی گیرنده های جفت شونده با پروتیین G که به صورت پیش سیناپسی واقع شده اند در مهار پیش سیناپسی نقش اساسی دارند و از این طریق موجب مهار رهایش طیف وسیعی از نوروترانسمیترها از جمله آدنوزین، گابا،

References

- [1] Amaral D, Lavenex p, Hippocampal neuroanatomy. In: (Eds) Anderson K, Morris R, Amaral D, Billis T and Okeefe J: The hippocampus, Oxford, University Press, 2006. pp: 37-67.
- [2] Blumcke I, Beck H, Lie AA, Wiestler OD, Molecular neuropathology of human mesial temporal lobe

epilepsy. *Epilepsy Res* 36 (1999) 205-223.

- [3] Chen IY, Huang CC, Hsu SK, Time-dependent reversal of long term potentiation by low frequency stimulation at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *J Neurosci* 21 (2001) 3705-3714.
- [4] Chen H, Lambert NA, Endogenous regulators of G protein signaling proteins regulate presynaptic inhibition at rat hippocampal synapses. *PNAS* 97 (2000) 12810-

- 12815.
- [5] Gibbs JW, Sombati S, Delorenzo RJ, Coulter DA, Physiological and pharmacological alterations in postsynaptic GABA-A receptor function in a hippocampal culture model of chronic spontaneous seizures. *J Neurophysiol* 77 (1997) 2139-2152.
- [6] Gold SJ, Ni YG, Dohlmans HG, Nestler EJ, Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. *J Neurosci* 17 (1997) 8024-8037.
- [7] Heida GJ, Englot JD, Sacktor CT, Blumenfeld H, Moshe LS, Separating kindling and LTP: Lessons from studies of PKMzeta in developing and adult rats. *Neurosci Lett* 453 (2009) 229-232.
- [8] Ichikawa K, Hoshino A, Kato K, Induction of synaptic depression by high-frequency stimulation in area CA1 of the rat hippocampus. Modeling and experimental studies. *Neurocomputing* 70 (2007) 2055-2059.
- [9] Ingi T, Krumins MA, Chidiac P, Brothers MG, Chung S, Snow EB, Barnes AC, Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity. *J Neurosci* 18 (1998) 7178-7188.
- [10] Jahanshahi A, M, Mirnajafi-Zadeh J, Javan M, Mohammad-Zadeh, The antiepileptogenic effect of electrical stimulation at different low frequencies is accompanied with change in adenosine receptors gene expression in rats. *Epilepsia* 68 (2009) 93-97.
- [11] Kelly ME, Staines WA, McIntyre DC, Secondary generalization of hippocampal kindled seizures in rats: examining the role of the piriform cortex. *Brain Res* 957 (2002) 152-161.
- [12] Kulla A, Reymann KG, Manahan-Vaughan D, Time-dependent induction of depotentiation in the dentate gyrus of freely moving rats: involvement of group 2 metabotropic glutamate receptors. *Eur J Neurosci* 11 (1999) 3864-3872.
- [13] Liang D, Seefried N. T, Genes differentially expressed in the kindled mouse brain. *Mol Brain Res* 96 (2001) 94-102.
- [14] Macdonald RL, Bianchi MT, Feng H, Mutations linked to generalized epilepsy in humans reduce GABA_A receptor current. *Exp Neurol* 184 (2003) 58-67.
- [15] McIntyre DC, Poulter MO, Gilby K, Kindling: some old and some new. *Epilepsy Res* 50 (2002) 79-92.
- [16] Nomoto S, Adachi K, Yang LX, Hirata Y, Muraguchi S, Kiuchi K, Distribution of RGS4 mRNA in mouse brain shown by in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Comm* 241 (1997) 281-287.
- [17] Racine RJ, Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32 (1972) 281-294.
- [18] Sadegh M, Mirnajafi-Zadeh J, Javan M, Fathollahi Y, Mohammad-Zadeh M, et al: The role of galanin receptors in anticonvulsant effects of low frequency stimulation in perforant path-kindled rats. *Neuroscience* 150 (2007) 396-403.
- [19] Saugstad AJ, Marino JM, Folk AJ, Hepler RJ, Conn PJ, RGS4 Inhibits signaling by group I metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci* 18 (1998) 905-913.
- [20] Schiller Y, Bankirer Y, Cellular Mechanisms Underlying Antiepileptic Effects of Low-and High-Frequency Electrical Stimulation in Acute Epilepsy in Neocortical Brain Slices In Vitro. *J Neurophysiol* 97 (2007) 1887-1902.
- [21] Ure JA, Perassolo M, Update on the pathophysiology of the epilepsies. *J Neurol Sci* 177 (2000) 1-17.
- [22] Willars GB, Mammalian RGS proteins: multifunctional regulators of cellular Signaling. *Seminars Cell Develop Biol* 17 (2006) 363-376.
- [23] Yamamoto J, Ikeda A, Satow T, Takeshita K, Takayama M, Matsushashi M, Matsumoto R, Ohara S, Mikuni N, Takahashi J, Low-frequency electric cortical stimulation has an inhibitory effect on epileptic focus in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 43 (2002) 491-495.
- [24] Yang LX, Jin CL, Zhu-Ge ZB, Wang S, Wei EQ, Bruce IC, Unilateral low-frequency stimulation of central piriform cortex delays seizure development induced by amygdaloid kindling in rats. *Neuroscience* 138 (2006) 1089-96.
- [25] Yechikhov S, Morenkov E, Chulanova T, Godukhin O, Shchipakina T, Involvement of cAMP- and Ca(2+)/calmodulin-dependent neuronal protein phosphorylation in mechanisms underlying genetic predisposition to audiogenic seizures in rats. *Epilepsy Res* 46 (2001) 15-25.