پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال شانزدهم، شماره ۳، پی در پی ۸۱، صفحات ۱۲۵ تا ۱۲۹
مرداد و شهریور ۱۳۹۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۳/۲۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۵/۱۱

مقایسه تنظیم بیان پروتئین آکواپورین-۱ طی تکوین مغز در رت‌های نژاد ویستار و H-Tx

دکتر محمد نبیونی[۱]، جواد رسولی[۲]، آذر شیخ‌الاسلامی[۳]*

۱. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم، تهران
۲. کارشناسی ارشد تکوین جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم، تهران
۳. دانشجوی دکتری رشته تکوین جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم، تهران

چکیده

سابقه و هدف: در هیدروسفالی مادرزادی تجمع بیش از حد مایع مغزی نخاعی در مغز باعث تغییر منفی درهومئوستاز آب می‌گردد. Aquaporin (AQP) خانواده‌ای از پروتئین‌های کانالی آبی عرض غشایی می‌باشند که نقش مهمی را در تکوین مغز ایفا می‌کنند و احتمالاً در ایجاد هیدروسفالی مادرزادی نیز نقش دارند.

مواد و روشها: در این مطالعه میزان بیان پروتئین AQP-1 در رت نژاد Hydrocephalus Texas (H-Tx) توسط روشهای ایمونوهیستوشیمی، وسترن بلات و الایزا بررسی گردید. هیدروسفالی در این حیوانات در نتیجه انسداد قنات مغزی در روز ۱۸ جنینی رخ می‌دهد که این شرایط در هفته‌های ۵-۴ کشنده است. میزان بیان پروتئین AQP-1 در رت‌های H-Tx غیرمبتلا و مبتلا و رت‌های کنترل Wistar در روزهای جنینی ۱۷ و ۱۹ و همچنین در سنین بعد از تولد P3 و P10 ارزیابی گردید.

یافته‌ها: سطح بیان AQP-1 در رت‌های H-Tx مادرزادی و مبتلا در مقایسه با رت‌های کنترل Wistar کاهش یافت. این کاهش در E17 یعنی یک روز قبل از انسداد Aqueduct در این حیوان مدل رخ داد که در رت‌های تازه متولد شده این کاهش بیان بیشتر در نمونه‌های P10 مشاهده گردید. این مطلب پیشنهاد می‌کند که شکل‌گیری این بیماری می‌تواند پدیده‌ای با اثرطولانی باشد.

نتیجه‌گیری: AQP-1 نقش مهمی را درتولید CSF طی مراحل اولیه دوره حاملگی در هیدروسفالی مادرزادی ایفا می‌کند. براساس شواهد مولکولی طی مراحل رشد و نمو در این حیوانات مدل، نقص در تنظیم بیان پروتئین AQP-1 می‌تواند در ایجاد این بیماری نقش داشته باشد. مکانیسم عمل مستقیم پروتئین AQP-1 در مسیر جریان CSF و یا اثر غیر مستقیم آن بر تکوین مغز هنوز شناخته شده نیست و نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد.

واژگان کلیدی: Aquaporin-1، هیدروسفالی مادرزادی، رت H-Tx، مایع مغزی نخاعی (CSF)

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Nabiuni M, Rasouli J, Sheikholeslami A. Comparative study of aquaporin-1 protein expression in developing brain of Wistar and H-Tx rats. Pejouhandeh 2011;16(3):125-9.

مقدمه

هیدروسفالی بیماری است که در نتیجه عدم توازن میان ترشح و بازجذب مایع مغزی نخاعی ایجاد می‌گردد. این بیماری علائم کلینیکی متعددی را نشان می‌دهد که یک ویژگی متداول آن افزایش فشار داخل جمجمه‌ای می‌باشد که اگر درمان نگردد به اختلالات مغزی و ادراکی و نهایتاً مرگ منجر می‌گردد. هیدروسفالی می‌تواند در هر سنی رخ دهد، که در اغلب موارد در کودکی قابل درمان می‌باشد (۱).

پروتئین‌های AQP کانال‌های آب در غشای سلول می‌باشند که موجب افزایش نفوذپذیری به آب در سلول‌های ترشحی و جذب کننده می‌گردند (۲). اعضای خانواده AQP یک مجموعه متشکل از چهار زیرواحد یکسان می‌باشند که ۶۰-۲۵٪ توالی پروتئینی آنها همسان می‌باشد. هر زیرواحد آن از ۶ قطعه عرض غشایی با یک موتیف حفظ شده Asp-Pro-Val (NPA) که منفذ عبور آب را ایجاد می‌کنند تشکیل شده است (۳).

* **نویسنده مسؤول مکاتبات:** دکتر محمد نبیونی؛ تهران، خیابان مفتح، پلاک ۴۹، دانشگاه تربیت معلم، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی؛ **پست الکترونیک:** nabiuni@tmu.ac.ir

AQP-1, 4, 9 در سیستم عصبی مرکزی یافت می‌شوند و در تنظیم هومئوستاز آب مغز نقش اصلی را ایفا می‌نمایند. AQP-1 یک پروتئین کانالی ۲۸ kDa با نفوذپذیری دو طرفه به آب می‌باشد، که این پروتئین در ترشح و جذب احتمالی مایع مغزی نخاعی نقش دارد (۴).

AQP-1 به مقدار زیادی در غشای راسی سلولی شبکه کوروید و به مقدار کمتر در سلول‌های اپاندیمی و هیپوکامپی بیان می‌گردد، که در ترشح مایع مغزی نخاعی از اپیتلیوم شبکه کوروید دخالت می‌کند. اخیراً نشان داده شده است که آنها در اندوتلیوم ریزمویرگهای مغز رت نیز وجود دارند (۵). مکانیسم‌های سیگنال دهی درگیر در تنظیم بیان AQP-1 پیچیده می‌باشند و اطلاعات ما از آن بسیار ناچیز است. از دست رفتن این تنظیمات می‌تواند به اختلالات نورولوژیک متعددی منجر گردد، که از آن جمله می‌توان به ادم مغزی، هیپرتانسیون درون جمجمه‌ای، سکته و هیدروسفالی اشاره نمود (۶).

رت H-Tx (نژاد تگزاس) حیوان مدل هیدروسفالی مادرزادی می‌باشد که ابتدا از یک کلونی رت آلبینو حاصل شده است. این جهش خود به خودی در این حیوانات مدل از راه جفت‌گیری برادری خواهری شکل می‌گیرد و در ۵۳-۲۳٪ زاده‌ها رخ می‌دهد. انسداد قنات مغزی (Cerebral Aqueduct) در روز ۱۸ جنینی رخ می‌دهد و باعث بزرگ شدگی بطنی می‌گردد که بطور فنوتیپی با برجستگی گنبدی شکل در ناحیه پشتی جمجمه قابل مشاهده می‌باشد (۷). مغز این حیوانات در مقایسه با رت‌های Wistar دارای مقادیر اضافی از تجمع آب می‌باشد (۸).

در این تحقیق مدل H-Tx به دلیل وقوع طبیعی هیدروسفالی و همچنین شباهت زیاد آن به نوع هیدروسفالی مادرزادی انسانی به عنوان مدل مورد مطالعه انتخاب و مورد بررسی و آزمایش قرار گرفت.

مواد و روشها

رت‌های نژاد ویستار تهیه شده از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تربیت معلم، و رت‌های نژاد H-Tx اهدایی دکتر جلیل احمد مایان از دانشگاه منچستر، با شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، و تغذیه و آب کافی نگهداری و پرورش داده شدند. به تولدهای رت اجازه داده شد که حداقل تا ۲۱ روز از مادر تغذیه نمایند تا اینکه به سن مورد نظر برای انجام آزمایش برسند. سه گروه شامل گروه کنترل از رت‌های نژاد ویستار، گروه آزمون از رت‌های H-Tx شامل نمونه‌های نرمال (که به عنوان نمونه‌های گروه کنترل در نظر گرفته می‌شوند) و نمونه‌های H-Tx هیدروسفال (HC) برای آزمایشات درنظر گرفته شدند. موشهای حامله و توله‌ها از هر دو گروه به روش استنشاق گاز CO_2 کشته و مغزها بطور کامل جداسازی شدند.

نمونه مغزهای کامل در پارافرمالدهید ۴٪ در PBS (Phosphate Buffer Saline) با pH: ۷/۳ فیکس شدند. پس از ۱۲-۴ ساعت فیکس شدن، نمونه‌ها با PBS شستشو داده شدند و پیش از غوطه‌ور شدن در ترکیب Sakura OCT (Finetek Inc. Torrance, USA)، به مدت ۲۴-۱۲ ساعت در محلول سوکروز ۲۰٪ قرار داده شدند و در ایزوپنتان خنک شده با یخ خشک منجمد شدند. برشهای ۱۰ میکرومتری Coronal (از میان بطنهای جانبی) توسط میکروتوم کرایوستات تهیه گردید و به منظور رنگ‌آمیزی و بررسی بر روی لام قرار گرفتند. نمونه‌ها در معرض آنتی‌بادی اولیه مونوکلونال (anti-AQP-1 موش؛ ۱:۵۰۰) انکوبه شدند. (Serotec Ltd, Oxford, UK) پس از شستشو، نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در معرض آنتی‌بادی ثانویه بیوتینه شده horse anti-rabbit anti-mouse قرار گرفتند (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) پروتئین AQP-1 توسط اویدین- بیوتین- پروکسیدازی دی آمینوبنزیدین رنگ آمیزی (Vector Elite ABC kits Burlingame, USA) گردید. بررسیهای ایمونوهیستوشیمی در هر سه نمونه جانوری انجام شد.

نمونه مغزهای کامل پس از جداسازی از رت‌های HC، Wistar و H-Tx توسط Homogenizer (BioSpec, USA) در بافر لیزکننده Brij 150 (شامل: 1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5M EDTA, 5M NaCl, 10% Brij 96, 10% NP 40) حل گردید. محلول یک دست شده در ۱۴۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ گردید. محتوای پروتئین کل توسط روش سنجش پروتئین برادفورد محاسبه گردید.

۲۰ µg از محتوای پروتئین کل توسط ژل SDS-10% PAGE در ولتاژ ۱۰۰ V به مدت یک ساعت جداسازی گردید (Bio-Rad, Hercules, CA). پس از الکتروفورز، ژل به غشا نیتروسلولزی در ولتاژ ۳۰ V و دمای ۴ °C انتقال داده شد. پس از انتقال، شستشوی غشای نیتروسلولزی دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه توسط آب مقطر صورت گرفت. غشا بر طبق روش western breeze chemiluminescent immunodetection به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق بلوکه گردید، سپس شستشو در دو نوبت ۱۰ دقیقه‌ای انجام شد.

عمل بلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال علیه پروتئین AQP-1 (۱:۲۰۰۰) انجام گرفت. در مرحله بعد ۴ بار شستشو انجام گرفت و آنتی بادی ثانویه anti mouse IgG اتصال یافته با اویدین- در سیستم آنزیمی آلکالاین فسفاتاز اضافه گردید. بیان AQP-1 توسط ECL enhanced chemiluminescence شناسایی گردید. بعد از شناسایی، غشا به مدت ۳۰ دقیقه توسط Tris–HCl 1M، SDS 10% و بتامرکاپتواتانول شستشو گردید. غشا برای یک ساعت درمعرض anti-β–actin (Sigma-Aldrich, 0.5 µg/ml) بعنوان کنترل قرار داده شد. در نهایت، نمونه‌ها اسکن شده، در فرمت JPEG عکسبرداری صورت گرفت.

محتوای کل پروتئین جدا شده از مغز کامل رت‌ها (روزهای جنینی ۱۷ و ۱۹ و همچنین در روزهای ۳ و ۱۰ بعد از تولد) به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ °C و به مدت یک ساعت در دمای محیط در پلیت‌های ۹۶ تایی (Costar, Corning Inc, NY, USA) انکوبه گردید. پروتئین با غلظت ۲۵-۲۰۰ µg/µl به بافر چسباننده (کربنات سدیم، بی‌کربنات سدیم و سدیم آزاید در pH ۹/۶) اضافه شد. پروتئین استاندارد AQP-1 (با غلظتهای ۵۰-۲۰۰ ng در هر چاهک) به پلیت‌ها اضافه و طی شب در دمای ۴ °C انکوبه گردید (هر غلظت سه بار اندازه‌گیری گردید). شستشوی پلیت‌ها توسط آب مقطر و TPBS انجام گرفت (سه مرتبه) و بلوکه شدن توسط BSA ۳٪ در TPBS طی طول شب در دمای ۴ °C انجام شد. شستشوی پلیت‌ها در سه نوبت صورت گرفت. سپس با پروکسیداز اتصال یافته با anti-mouse IgG (به عنوان آنتی‌بادی ثانویه) انکوبه گردید. پس از آخرین دوره شستشو، اضافه کردن ABC به مدت ۳۰ دقیقه و پس ازآن سوبسترای پروکسیداز (TMB kit from Vector Laboratories) صورت گرفت. درنهایت، واکنش رنگ‌زا در طول موجهای ۶۳۰ و ۴۰۵ nm توسط دستگاه پلیت ریدر statfax 2100 بررسی گردید.

یافته‌ها طی سه بار تکرار در هر نمونه به دست آمد و بصورت میانگین همراه انحراف معیار نشان داده شد. معنی‌داری اختلافها با استفاده از آزمون تی مستقل و با در نظر گرفتن $P < ۰/۰۵$ بعنوان سطح معنی‌داری اعلام گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه، بیان پروتئین AQP-1 مغز در رت‌های Wistar، H-Tx غیر مبتلا (نرمال) و HC (مبتلا به هیدروسفالی) در سنین مختلف اندازه‌گیری شد. تغییرات مغزی جنینهای رت (E17 و E19) و همچنین تولد رت‌های بعد از تولد (P3 و P10) ازطریق تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمی، وسترن بلاتینگ و الایزا مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج این مطالعه بشدت کاهش بیان AQP-1 را در جنینهای رت و توله‌ها در بعد از تولد نشان می‌دهد (رت‌های مبتلا و غیر مبتلا با رت‌های کنترل Wistar مقایسه گردید). این یافته‌ها در رت‌های هیدروسفال P10 بارزتر می‌باشد. این امر بیانگر این مطلب است که پدیده غیر طبیعی بودن بیان پروتئین AQP-1 در این حیوانات با افزایش سن در دوره جنینی و بعد از تولد با گذر زمان ادامه می‌یابد.

رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال علیه AQP-1 نشان داد که اتصال آنتی‌بادی به AQP-1 در شبکه کوروییید جنینهای رت Wistar (روزهای ۱۷ و ۱۹) بیشتر از نمونه‌های H-Tx صورت گرفت (شکل ۱). این تفاوت میان گروههای حیوانی هنگامی اهمیت می‌یابد که رت‌های تازه متولد شده HC و Wistar در روزهای P3 و P10 مقایسه گردند. جالب اینکه، رت‌های هیدروسفال بعد از تولد رنگ‌آمیزی آنتی‌بادی کمتری را نسبت به H-Txهای هم نژاد نشان دادند (شکل ۲).

ایمونوبلات پروتئین کل (تام) مغز کامل از جنینهای رت Wistar، H-Tx و HC، به روشنی کاهش بیان AQP-1 را در رت‌های H-Tx وHC در تمام سنین در مقایسه با کنترلهای Wistar نشان داد (شکل ۳). بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که در این مدل حیوانی کاهش بیان AQP-1 زودتر از انسداد Aqueduct (در روز ۱۸ جنینی) رخ می‌دهد.

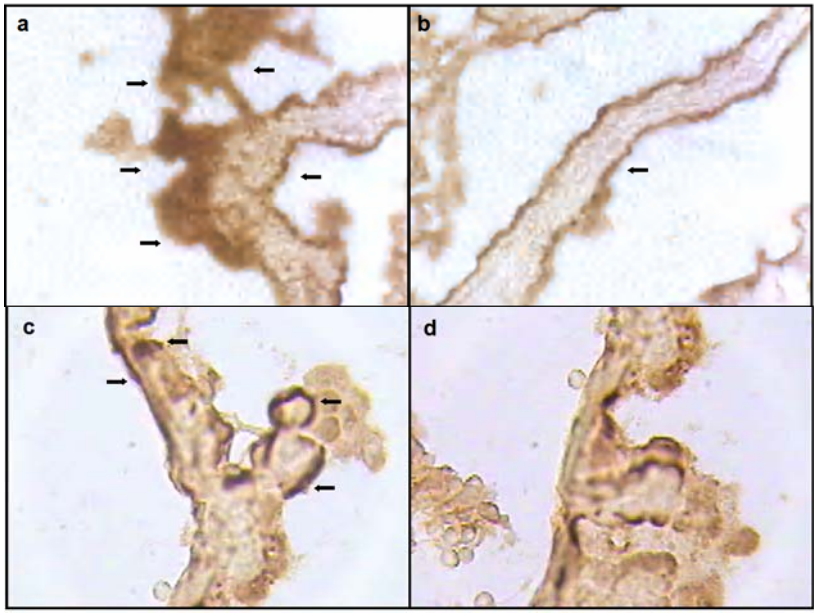
این کاهش بیان AQP-1 در هر دو مرحله جنینی و پس از تولد در رت‌های HC و H-Tx در مقایسه با کنترلهای Wistar با تکنیک الایزا نیز نشان داده شد (جدول ۱ و ۲). در این مورد نیز کاهش بیان AQP-1 در مراحل رشد و نموی بعدی پررنگتر دیده می‌شود (شکل ۴).

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار میزان جذب AQP-1 بدست آمده به روش الایزا در نمونه‌های Wistar و H-Tx در روزهای ۱۷ و ۱۹ جنینی (E17, E19)

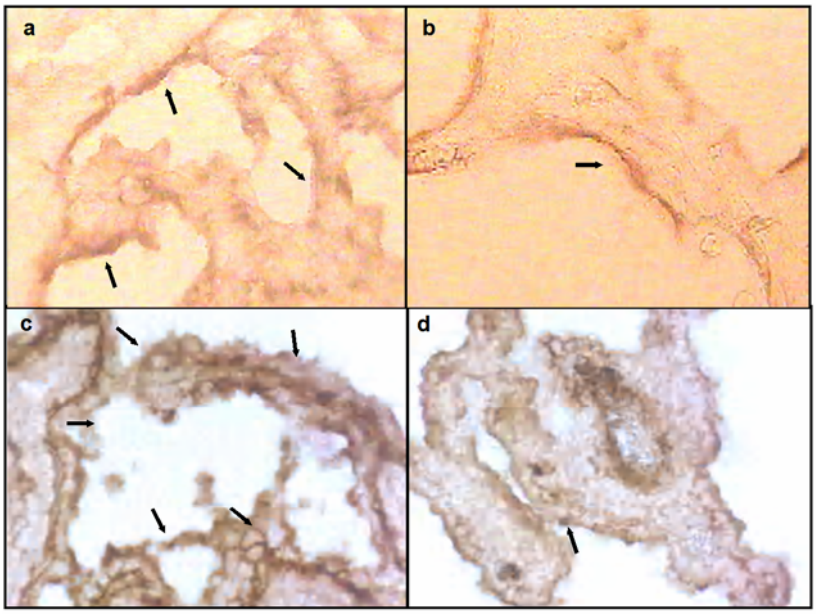
OD630nm/age	E17		E19	
	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین
Wistar	۰/۱۷۳۷۰۸	۱/۳۴۰۳۳۳	۰/۳۵۲۴۲۹	۱/۳۹۵۳۳۳
H-Tx	۰/۰۱۹۳۴۸	۱/۰۶۵۳۳۳	۰/۲۱۸۶۸۷	۱/۳۲

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار میزان جذب AQP-1 بدست آمده به روش الایزا در نمونه‌های Wistar، H-Tx و HC در روزهای ۳ و ۱۰ پس از تولد (P3, P10)

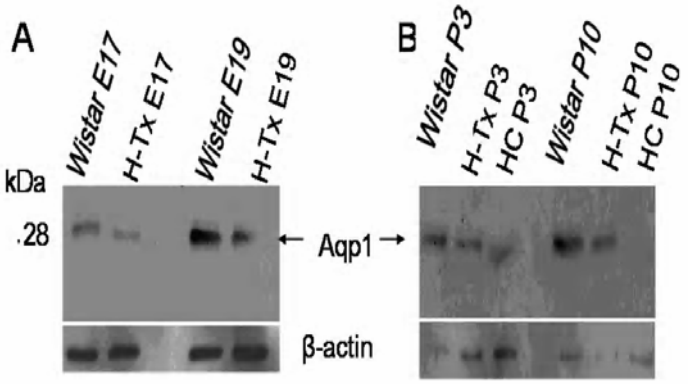
OD630nm/age	P10		P3	
	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین
Wistar	۰/۱۱۴۰۲۳	۱/۶۹۵۳۳۳	۰/۰۹۵۲۴۷	۱/۵۹۳
H-Tx	۰/۰۸۸۰۵۹	۱/۰۱۷۶۶۷	۰/۱۹۸۵۶۱	۱/۲۴۱۳۳۳
HC	۰/۰۳۴۸۴۷	۱/۰۲۱۳۳۳	۰/۲۲۶۱۹۲	۱/۲۲۳



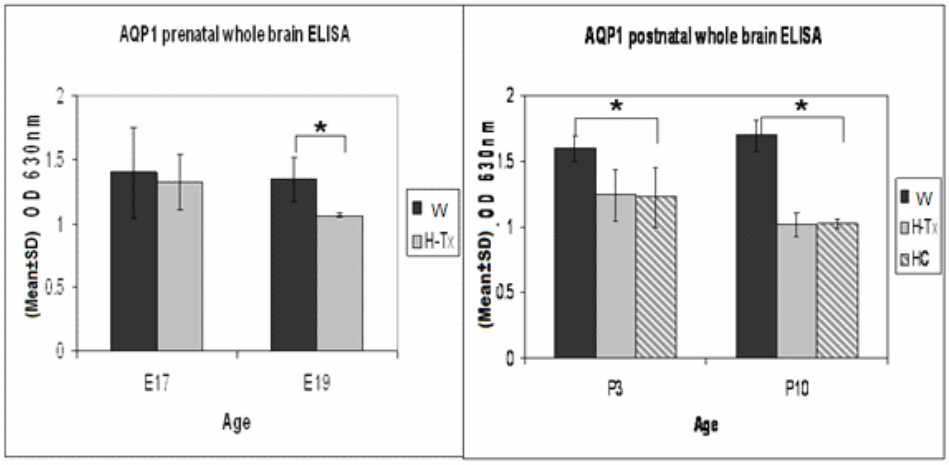
شکل ۱- رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بافت شبکه کروئید با آنتی‌بادی anti-AQP1: (a) رت کنترل Wistar در E17، (b) H-Tx در E17، (c) Wistar در E19 و (d) H-Tx در E19 . پروتئین AQP-1 در نمونه‌های Wistar (a,c) در مقایسه با نمونه‌های H-Tx (b,d) بسیار بیشتر بیان شده است. پیکانها مناطقی را نشان می‌دهند که نسبت به AQP-1 مثبت‌ترند. غلظت آنتی‌بادی اولیه مورد استفاده ۱:۵۰۰ می‌باشد. بزرگنمایی تصاویر: ۴۰۰×



شکل ۲- رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بافت شبکه کروئید با آنتی‌بادی علیه AQP-1 در: (a) رت Wistar در P3، (b) رت HC در P3، (c) رت Wistar در P10، (d) رت HC در P10. تراکم بیشتری در نمونه‌های Wistar (a,c) در مقایسه با HC (b,d) دیده می‌شود، که بیانگر کاهش معنی‌داری در میزان بیان AQP-1 در حیوانات تأثیر گرفته پس از تولد می‌باشد. پیکانها مناطقی از لایه کروئیدی را نشان می‌دهند که نسبت به AQP-1 مثبت‌ترند. غلظت آنتی‌بادی اولیه مورد استفاده ۱:۵۰۰ و ثانویه ۱:۲۰۰ است. بزرگنمایی تصاویر: ۴۰۰×



شکل ۳- بیان پروتئین AQP-1 در مغز کامل H-Tx مادرزادی و HC القا شده در سنین پیش و پس از تولد کاهش می‌یابد. (A) ایمونوبلاتینگ نشان می‌دهد که H-Tx در E17 و E19 کاهش بیان پروتئین AQP-1 را در مقایسه با رت‌های کنترل Wistar دارد. (B) AQP-1 در رت‌های H-Tx و HC در روزهای P3 و P10 پس از تولد در مقایسه با رت‌های کنترل Wistar کمتر بیان می‌شود. این کاهش بیان به نظر می‌رسد در رت HC روز P10 آشکارتر است. در تصویر A و B، ۲۰ میکروگرم از کل پروتئین مغز کامل محلول از طریق SDS-PAGE جداسازی شده، بر روی غشای نیتروسلولزی منتقل، و با anti-AQP1 IgG شناسایی شد. لکه‌ها پاکسازی شد و آنتی‌بادی β-actin به عنوان کنترل بررسی شد.



شکل ۴- مقایسه قطعات پروتئینی مغز کامل پیش و پس از تولد بررسی شده با ELISA نشان می‌دهد که بیان AQP-1 در نمونه‌های Tx-H و HC در روز P10 کاهش داشته است. این میزان بیان در رت HC روز P10 در مقایسه با رت‌های کنترل (W) Wistar آشکارتر است. بررسیهای آماری در گروههای مختلفی انجام شد: بین رت Wistar روز E19 و Tx-H روز E19 (نمودار چپ)؛ بین رت Wistar روز P3 و رت HC روز P3، و رت Wistar روز P10 و رت HC روز P10 (نمودار راست). علامت ستاره $P < ۰/۰۵$ را نشان می‌دهد.

بحث

هیدروسفالی بیماری مادام‌العمر می باشد که تا به امروز، مسیرهای درمانی در بهبود قطعی آن ناتوان مانده‌اند. این بیماری توسط عمل جراحی و قرار دادن شانت Silastic به منظور منحرف کردن مسیر مایع مغزی نخاعی تا حدودی درمان می‌گردد، اما تشخیص به موقع و انجام جراحی در میزان موفقیت درمان بسیار مهم می‌باشد (۹). این تحقیق برای اولین بار، ارتباط میان AQP-1 و هیدروسفالی مادرزادی در مغز در حال تکوین رت‌های مدل H-Tx را در دوره جنینی نشان می‌دهد.

آکواپورین‌ها پروتئین‌های کانال آبی انتخابی هستند که نقش مرکزی در هومئوستاز آب بدن انسان بازی می‌کنند و شبکه کورویید بعنوان ساختار اصلی تولید مایع مغزی نخاعی در نظر گرفته می‌شود. بیان انتخابی AQP1 بر سطح شبکه کورویید نرمال انسان، نقش تولید مایع مغزی نخاعی توسط این ساختار پیچیده را توضیح می‌دهد (۱۰). مورفولوژی شبکه کورویید و موقعیت آن در میان بطنهای مغزی نشان می‌دهد که این ساختار مکان اصلی تولید مایع مغزی نخاعی است. کاهش در نفوذپذیری اسمزی که به دنبال نقص در بیان AQP1 ایجاد می‌شود نشان می‌دهد که AQP1 مسیر اصلی برای انتقال اسمزی آب در شبکه کورویید می‌باشد، و در موشهای با نقص آکواپورین (AQP1-null)، با مسیرهای انتقال آب دیگری جبران نمی‌شود (۱۱).

RNA AQP-1 در روز ۱۲ جنینی در رت بیان می‌گردد. افزایش سطوح پروتئین AQP-1 از روز ۱۴ جنینی مشاهده می‌گردد که در مراحل پس از تولد (در غشای قاعده‌ای جانبی سلول‌های شبکه کوروید) به تدریج افزایش می‌یابد (۱۲). طی این مطالعه مشاهده می‌شود که بیان AQP-1 در پیش از تولد نیز رخ می‌دهد.

شبکه کوروید که جایگاه اولیه بیان AQP-1 می‌باشد در ترشح و بازجذب احتمالی مایع مغزی نخاعی نقش دارد. سطوح بیان AQP-1 در تومورهای شبکه کوروید کاهش می‌یابد (۱۳). جالب توجه اینکه پاپیلومای شبکه کوروید الگوهای ناهمگونی از بیان AQP-1 را نشان می‌دهند در حالیکه این امر در کارسینومای بدخیم شبکه کوروید مشاهده نمی‌گردد. با توجه به اینکه اکثر این بیماران علائم هیدروسفالی را نیز نشان می‌دهند، الگوی بیان AQP-1 را با این موضوع مرتبط می‌دانند. هرگونه آسیب به هومئوستاز مایع مغزی نخاعی می‌تواند به تغییرات بیان پروتئین AQP-1 در هیدروسفالی و پاپیلومای شبکه کوروید منجر گردد (۱۴).

مدل هیدروسفالی مادرزادی که در این مطالعه استفاده شده است آشکار می‌سازد که بیان کانالهای AQP-1 در مراحل بسیار ابتدایی رشد ونمو کاهش می‌یابد. ممکن است در این حالت کاهش بازجذب مایع مغزی نخاعی از طریق شبکه کوروید صورت گیرد. این مکانیسم بازجذب موجب ورود مایع مغزی نخاعی به سیستم گردش خون می‌گردد که فقدان این الگوی بازجذب در برخی گونه‌ها عامل ایجاد کننده هیدروسفالی است (۱۵). نتایج حاصل از مطالعه ما کاهش وابسته به سن بیان AQP-1 را در P3 تا P10 و همچنین بازجذب مایع مغزی نخاعی در شبکه کوروید را پیشنهاد می‌نماید. ما در این مطالعه، جنینهای پیش از تولد (E17 و E19) و رت‌های پس از تولد (P3 و P10) را به دلیل مشابهت دوره‌های حاملگی و رشد و نموی با انسان انتخاب نمودیم.

نتایج حاصل از ایمونوهیستوشیمی، میزان بالای اتصال آنتی‌بادی علیه AQP-1 را در شبکه کوروید رت‌های کنترل Wistar در مقایسه با حیوانات H-Tx مبتلا نشان می‌دهد. بررسیهای وسترن بلاتینگ و الایزا نتایج حاصل از ایمونوهیستوشیمی را تأیید نمود. نتایج بدست آمده از وسترن بلات نشان داد که بیان پروتئین AQP-1 در برشهای مغز کامل رت‌های H-Tx و HC، بویژه در نمونه‌های HC P10 به طور آشکاری کاهش یافت. این کاهش بیان پروتئین AQP-1 نشان می‌دهد که بیماری هیدروسفالی در حال پیشرفت می‌باشد.

آنچه بایستی مورد توجه قرار گیرد این است که تشخیص بیماری هیدروسفالی در انسان در مراحل جنینی و حتی مراحل اولیه پس از تولد کار آسانی نیست؛ اما در مدل حیوانی مورد مطالعه، علائمی نظیر سر گنبدی شکل، فنوتیپ تغییریافته جمجمه، بزرگتر بودن سر در دوره جنینی و حتی در مراحل اولیه پس از تولد دلایلی مبنی بر بیماری هیدروسفالی در حیوان می‌باشد. آنچنانکه Paul و همکاران با مطالعه رت‌های H-Tx پس از تولد نشان دادند که مدل هیدروسفالی در فنوتیپ ظاهری حیوان نیز قابل تشخیص است (۱۶). درحالیکه هدف در مطالعه حاضر، تشخیص هیدروسفالی در دوران جنینی بود و بنابراین می‌بایست مارکرهایی ارزیابی می‌شدند تا بتوان از روی تغییرات آنها هیدروسفالی مادرزادی را تشخیص داد.

در حقیقت Paul و همکاران نشان دادند که میزان بیان AQP-1 پس از تولد در رت‌های هیدروسفال متغیر است و با گذشت زمان به حالت طبیعی نزدیک می‌شود (بررسی روزهای ۵، ۱۰ و ۲۶ بعد از تولد). در حالیکه در مطالعه حاضر بررسی داده‌های بدست آمده از میزان بیان AQP-1 در روزهای ۱۷ و ۱۹ جنینی، نشان می‌دهند که در رت‌های کنترل ویستار، در مقایسه با نمونه‌های هیدروسفالی و غیر مبتلای هم‌نژاد آنها، AQP-1 پیش از تولد نیز به میزان بیشتری بیان می‌شود.

این مطالعه تغییرات بیان پروتئین AQP-1 را طی بیماری هیدروسفالی در این مدل حیوانی تصدیق می‌نماید. هومئوستاز مایع مغزی نخاعی به این کانالهای آب وابسته می‌باشد و فرض ما بر این اساس استوار است که کاهش بیان AQP-1 در این حالت نقش اساسی را ایفا می‌نماید. با توجه به اینکه کاهش بیان پروتئین AQP-1 در روز ۱۷ جنینی (E17) تشخیص داده شد (قبل از اینکه مجرای Aqueduct مسدود گردد و قبل از اینکه هیدروسفالی در این مدل حیوانی ایجاد شود) یک فرآیند ژنتیکی را می‌توان برای این شرایط پیشنهاد نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان می‌دهند که هنوز مکانیسم‌های رشد و نموی ناشناخته‌ای در این حیوانات مبتلا به هیدروسفالی وجود دارد که در آینده بایستی مشخص گردند. در این زمینه می‌بایستی مطالعات بیشتری در سطوح ژنی و رونویسی ژنی صورت گیرد تا این مکانیسم‌ها در سطوح بعد از رونویسی و بعد از ترجمه آشکار گردند. به علاوه این مطالعات این اجازه را به ما می‌دهند که درک بهتری از هومئوستاز CSF در مغز داشته باشیم. داده‌هایی که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت توانست ارتباط منطقی را بین کانالهای آبی AQP-1 و هیدروسفالی مادرزادی در

رت مـدل H-Tx ایجـاد نمایـد. افـزایش بیـان پـروتئین AQP-1 می‌تواند در حالت کنترل یا نبود هیدروسفالی مشاهده گردد.

تشکر و قدردانی

با توجه به انجام این تحقیق در آزمایشگاه تحقیقـاتی سـلولی تکوینی و مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانـشگاه تربیت معلم، بدینوسیله از مدیریت محترم گروه زیست شناسی و دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم قدردانی نموده و از دکتر جلیل احمـد مایـان اسـتاد دانـشگاه منچـستر کـه در تـأمین نمونه‌هـای رت نـژاد H-Tx مـا را یـاری نمودنـد سپاسـگزاری می‌نماییم.

REFERENCES

1. Philippon J. ["Normal pressure" hydrocephalus]. Psychol Neuropsychiatr Vieil 2005;3(1):53-61. (Full text in French)
2. Gunnarson E, Zelenina M., Aperia A. Regulation of brain aquaporins. Neuroscience 2004;129(4):947-55.
3. Verkman AS. Physiological importance of aquaporin water channels. Ann Med 2002;34(3):192-200.
4. Verkman AS. Physiological importance of aquaporins: lessons from knockout mice. Curr Opin Nephrol Hypertens 2000;9(5):517-22.
5. Dolman D, Drndarski S, Abbott NJ, Rattray M. Induction of aquaporin 1 but not aquaporin 4 messenger RNA in rat primary brain microvessel endothelial cells in culture. J Neurochem 2005;93(4):825-33.
6. Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain. Nat Rev Neurosci 2003;4(12):991-1001.
7. Kohn DF, Chinookoswong N, Chou S.M. A new model of congenital hydrocephalus in the rat. Acta Neuropathol 1981;54(3):211-8.
8. Cai X, McGraw G, Pattisapu JV, von Kalm L, Willingham S, Socci D, et al. Hydrocephalus in the H-Tx rat: a monogenic disease. Exp Neurol 2000;163(1):131-5.
9. Patwardhan RV, Nanda A. Implanted ventricular shunts in the United States: the billion-dollar-a-year cost of hydrocephalus treatment. Neurosurgery 2005;56(1):139-44.
10. Longatti PL, Basaldella L, Orvieto E, Fiorindi A, Carteri A. Choroid plexus and aquaporin-1: a novel explanation of cerebrospinal fluid production. Pediatr Neurosurg 2004;40(6):277-83.
11. Oshio K, Watanabe H, Song Y, Verkman AS, Manley GT. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. Faseb J 2005;19(1):76-8.
12. Johansson PA, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Mollgard K, Potter A, et al. Aquaporin-1 in the choroid plexuses of developing mammalian brain. Cell Tissue Res 2005;322(3):353-64.
13. Longatti P, Basaldella L, Orvieto E, Dei Tos A, Martinuzzi A. Aquaporin(s) Expression in Choroid Plexus Tumours. Pediatr Neurosurg 2006;42(4):228-33.
14. Badaut J, Brunet JF, Grollimund L, Hamou MF, Magistretti PJ, Villemure JG, et al. Aquaporin 1 and aquaporin 4 expression in human brain after subarachnoid hemorrhage and in peritumoral tissue. Acta Neurochir Suppl 2003; 86: 495-8.
15. Maurizi CP. The circulation and function of cerebrospinal fluid. Med Hypotheses 1984;15(2):155-62.
16. Paul L, Madan M, Rammling M, Chigurupati S, Chan SL, Pattisapu JV. Expression of Aquaporin 1 and 4 in a Congenital Hydrocephalus Rat Model. Neurosurgery 2011;68(2):462-73.