مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
سال :۱۴۰۱ - شماره : ۱
مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
Medical Genetic Research
www.mgr.ir

بررسی تأثیر داروی ضد صرع فنیتوئین بر روی تمایز تخمدان در جنین موش و بیان برخی از ژن‌های مرتبط

رامین شکری‌پور[۱*]، علی محمد احدی[۲]، زهرا زمان‌زاده[۱]، رامش رنجبر[۳]

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۳- گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

*پست الکترونیک مسئول مکاتبات: Shokripour.ramin@gmail.com

چکیده

بیماری صرع یک اختلال سیستم عصبی مرکزی (اختلال نورولوژیکی) است که در آن فعالیت سلول‌های عصبی در مغز مختل شده و منجر به تشنج می‌گردد که طی آن رفتار، علائم و احساسات غیرطبیعی از جمله از دست رفتن هوشیاری رخ می‌دهد. طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی بیش از ۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان مبتلا به صرع هستند. داروهای زیادی هستند که در درمان این بیماری مؤثرند، فنیتوئین یکی از رایج‌ترین این داروها است. مصرف داروی فنیتوئین و داروهای مشابه که برای درمان صرع مورد استفاده قرار می‌گیرد می‌توانند اثرات چشمگیری در روند تمایز تخمدان و مشکلات بعدی به وجود آورند.

در این مطالعه برای اولین بار پیشنهاد می‌کنیم که مصرف فنیتوئین با توجه به بیان ژن‌های مهم در تکوین تخمدان و باروری جنس ماده مد نظر قرار گیرد و در روند درمان داروهای جایگزین که اثرات جانبی کمتری رو تمایز جنسی یا جنسیت جنین مادرانی که مبتلا به صرع بوده و از این نوع داروها استفاده می‌کنند در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: صرع، فنیتوئین، *RSPO1*، *SF*، *LIF*

مجله تحقیقات
ژنتیک پزشکی
سال : ۱۴۰۱ - شماره : ۱

مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
Medical Genetic Research

www.mgr.ir

Investigating the effect of antiepileptic epilepsy on ovarian distinction in mouse fetus and expressing some relevant genes

Ramin Shukripour [1*], Ali Mohammad Ahadi [2], Zahra Zamanzadeh [1], Ramsh Ranjbar [3]

1- Department of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Shahid Ashrafi University of Isfahan, Isfahan, Iran.
1- Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
3- Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.
* E -mail in charge of correspondence: shokripour.ramin@gmail.com

Abstract

Epilepsy is a central nervous system disorder (neurological disorder) in which the activity of nerve cells in the brain disrupts and leads to seizures in which abnormal symptoms, symptoms, and emotions, including loss of consciousness, occur. According to the World Health Organization, more than 50 million people worldwide have epilepsy. There are many drugs that are effective in the treatment of this disease, phenytoin is one of the most common drugs. The use of phenytuine and similar drugs used to treat epilepsy can have significant effects on the process of ovarian distinction and subsequent problems.

In this study, for the first time, we suggest that the use of phenytoids should be considered in the form of ovarian and fertility of the material due to the expression of important genes, and in the process of the treatment of alternative drugs that have less side effects on sexual distinction or sexuality of mothers with epilepsy. And they use these medications to consider.

Keywords: Epilepsy, Fanitoid, RSPO1, SF, LIF

مقدمه

بیماری صرع یک اختلال سیستم عصبی مرکزی (اختلال نورولوژیکی) است که در آن فعالیت سلول‌های عصبی در مغز مختل شده و منجر به تشنج می‌گردد که طی آن رفتار، علائم و احساسات غیرطبیعی از جمله از دست رفتن هوشیاری رخ می‌دهد. طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی بیش از ۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان مبتلا به صرع هستند. داروهای زیادی هستند که در درمان این بیماری مؤثرند. در حال حاضر، بیش از ۲۵ دارو مجاز به عنوان نسل اول، دوم یا سوم جهت کنترل این بیماری وجود دارد که فنیتوئین یکی از رایج‌ترین این داروها است. این دارو با هدف اصلاح واکنش‌های تحریکی و یا مهاری از طریق کانال سدیم وارد سلول می‌شود و در سطوح مختلف سیناپس عمل می‌کنند[۳-۱]. داروهای ضدصرع کمی هستند که ایمن بودن مصرف آن‌ها در طول دوران بارداری و شیردهی به اثبات رسیده که یکی از این داروها فنیتوئین است. مطالعات تجربی بر روی این دارو نادر است و ممکن است موجب اختلالات جنسی و ناباروری در جنین و نوزادان و همچنین خود فرد شود

در حالی که علامت مهم صرع تشنج است، اما داشتن تشنج همیشه به معنای ابتلا به صرع نیست. علائمی مانند سردرگمی، لرزهای عضلانی، طلسم خیره کننده، از دست دادن آگاهی و اختلال در خلقی و عملکردهای ذهنی می‌تواند در هنگام تشنج رخ دهد [۴]. برای درمان می‌توان از داروی فنیتوئین استفاده نمود، داروی فنیتوئین در غلظت‌های درمانی، کانال‌های سدیم را مسدود می‌کند، بعد از آن پتانسیل عمل ایجاد شده را مهار می‌کند و در نتیجه انتشار تشنـج را کاهش می‌دهد.

امروزه داروهای زیادی جهت درمان صرع در دسترس هستند، اما در کنار درمان از وجود عوارض آن نمی‌توان غافل شد. با توجه به اینکه امروزه ناباروری بسیار شایع شده است، یکی از دلایل آن مصرف بعضی داروهاست، بنابراین هدف ما در این مطالعه بررسی اثر فنیتوئین بر ناباروری می‌باشد.

ناباروری در اثر عوامل مختلفی از جمله نارسایی تخمدان، آسیب لوله‌های فالوپ و ... ایجاد می‌شود. مهم‌ترین اندام مؤثر در ناباروری زنان تخمدان می‌باشد.

انواع صرع

پزشکان به طورکلی تشنج‌ها را با توجه به نحوه‌ی شروع فعالیت غیرطبیعی مغز به تشنج کانونی و تشنج منتشر تقسیم‌بندی می‌کنند که در جدول ۱ آورده شده است [۳-۱ و ۵].

انواع صرع	علائم
کانونی	اگر تشنج‌ها ناشی از فعالیت غیرطبیعی تنها در یک ناحیه‌ی مغز باشد، تشنج کانونی (جزئی) نامیده می‌شوند
تشنج منتشر	تشنج‌هایی که تمام نقاط مغز را درگیر می‌کنند تشنج‌های منتشر هستند
تشنج‌های تونیک	باعث سفت شدن ماهیچه‌ها می‌شوند. این تشنج‌ها معمولا ماهیچه‌های پشت، بازوها و پاها را درگیر می‌کنند و ممکن است باعث زمین خوردن فرد شوند.
تشنج‌های آتونیک	باعث از دست رفتن کنترل ماهیچه‌ها می‌شوند که ممکن است باعث افتادن ناگهانی فرد شوند.
تشنج‌های کلونیک	با حرکات ناگهانی ماهیچه‌ای تکراری یا ریتمیک مرتبط هستند. این تشنج‌ها معمولا گردن، صورت و بازوها را درگیر می‌کنند.
تشنج‌های میوکلونیک	معمولا به شکل حرکت ناگهانی کوتاه یا پیچیدن بازوها و پاها دیده می‌شوند.
تشنج‌های تونیک-کلونیک	پرالتهاب‌ترین تشنج‌های صرعی هستند و می‌توانند باعث از دست دادن ناگهانی هوشیاری، سفت شدن بدن و لرزیدن، و گاهی از دست دادن کنترل ادرار یا گاز گرفتن زبان شوند

جدول ۱. انواع دسته بندی تشنج بر اساس علائم بالینی.

داروها و روش‌های درمان بیماری صرع:

یکی از راه‌های درمانی این بیماری جراحی است، به این صورت که بخشی از مغز که درگیر بیماری است را خارج می‌کنند، این در صورتی اتفاق می‌افتد که جراحی کردن آن قسمت آسیبی به تکلم، حرکت و ... وارد نکند.

استفاده از داروهای ضد صرع که این دارو ها مولکول‌هایی هستند که با هدف اصلاح واکنش‌های تحریکی یا مهاری از طریق مکانیسم‌های مختلف در سطوح مختلف سیناپس عمل می‌کنند. مکانیسم‌های عملکرد آنها متنوع است، همانطور که شکل نشان می‌دهد، هرکدام از داروها در محل سیناپس از کانال‌هایی متعددی وارد سلول می‌شوند، برای مثال: داروهای فنیتوئین[1]، لاموتریجین[2]، لاکسامید[3] و ...

1 phenytoin
2 Lamotrigine
3 Lacosamide

از طریق کانال سدیم وارد سلول می‌شوند، داروی پرامپانل از طریق نورون پس سیناپسی عمل می‌کند [۶و۷].

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۲ گروه ۷ تایی موش نژاد balb/c ۲ ماهه تهیه شد، (از پژوهشکده رویان اصفهان) تحت عنوان گروه کنترل و گروه تیمار مورد آزمایش قرار گرفت. تمام این موش‌ها در شرایط استاندارد و یکسان طبق پروتکل هلسینکی نگهداری و تغذیه شدند.

تعیین دوز دارو

داروی فنیتوئین برای یک انسان بالغ با متوسط وزن ۶۰ کیلوگرم به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم مناسب است. موش‌های مورد مطالعه تقریبا ۲۵ گرم هستند، با برقراری تناسبات ریاضی و مطالعات صورت گرفته دوزهای این دارو در نتیجه با برقرار کردن تناسب و طبق مطالعات انجام شده دوزهایی از این دارو که سقط و مرگ و میر در موش‌ها اتفاق نمی‌افتد تعیین گردید. تعیین دوز دارو به این صورت بود که یه عدد کپسول فنیتوئین ۱۰۰mg/kg را در ۱ سی سی آب مقطر حل کردیم، سپس ۱۰۰ میکرولیتر آن را با آب مقطری که ۲۰۰ گرم غذای موش پودر شده را خمیری کرده، مخلوط کردیم. در ابتدا برای یک موش سوری، نصف دوز تعیین شده (۵۰ میکرولیتر) از دارو برای آداپته شدن موش تعیین شد.

میزان غذای مصرفی یک موش در یک روز تقریبا ۱۰ گرم است. طبق این موضوع ۱۸۰-۲۰۰ گرم غذای موش‌همراه با ۱۰۰ میکرولیتر از داروی فنیتوئین و آب مقطر مخلوط شد تا زمانی که به صورت خمیر شکل‌پذیر شد و پس از آن به صورت استوانه‌ای شکل داده شد و پس از یک روز به خمیر فرصت داده شد خشک شود. در گروه تیمار، موش‌های مادر توسط داروی فنیتوئین حل شده در آب مقطر بصورت مخلوط با غذای روزانه به صورت خوراکی تغذیه شدند.گروه کنترل با غذای استاندارد موش فاقد هر گونه دارویی تغذیه شدند.

سرانجام پس از گذشت سه روز از آداپته شدن موش‌ها با داروی فنیتوئین، ۲ موش ماده و ۱ موش نر در هر یک از قفس‌ها قرار گرفتند تا جفتگیری انجام شود. دوره بارداری این نژاد موش ۲۱ روزه است. حضور اسپرم در اسمیرهای واژن روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. سرانجام پس از زایمان موش‌های ماده جدایی از موش‌های نر نگهداری شدند.

نمونه‌گیری

پس از متولد شدن جنین‌ها، در ۲۰ روزگی جنین‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند و در ابتدا در یک بشر حاوی پنبه آغشته به کلروفرم قرار داده شده و موش‌ها را داخل بشر قرار دادیم تا از هوش رفتند. سپس بر روی موش‌ها عملیات تشریح صورت گرفت. برای حفظ نمونه RNA نمونه‌ها بر روی یخ قرار داده شدند و تا هنگام استخراج RNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

استخراج RNA

به منظور انجام Real Time-PCR تهیه نمونه RNA با کیفیت بالا ضروری است. در این آزمایش جهت استخراج RNA از کیت RNX-Plus شرکت سیناکلون و

طبق پروتکل استفاده شد.

بررسی کیفیت RNA استخراج شده بر روی ژل توسط الکتروفورز

جهت بررسی RNA استخراج شده از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. الکتروفورز روی ژل آگارز از متداول‌ترین و سریع‌ترین روش‌های بررسی محصولات PCR است.

سنتز cDNA

سنتز cDNA از mRNA تام با استفاده از کیت شرکت VIVANTIS و بر اساس پروتکل شرکت انجام شد.

مطالعات بیوانفورماتیک و طراحی پرایمر

به طور کلی پرایمرها برای آغاز فرآیند PCR و به منظور تکثیر ناحیه خاصی از ژنوم طراحی شده و به کار می‌روند. طراحی پرایمر مناسب امری مهم در اختصاصیت و بهینگی فرآیند PCR است.

جهت طراحی پرایمرهای اختصاصی برای انجام RT-PCR توالی ژن‌های *RSPO1, SOX9, LIF* از بانک اطلاعاتی ژنومی NCBI با شماره دست‌یابی NM_138683.2, برای *RSPO1*، NM_008501.2 برای *LIF* و NM_011448.4 برای *SOX9* به دست آمد و سپس به کمک نرم افزار GENERUNNER پرایمرهای مورد نظر طراحی شدند. در تمام موارد یکی از پرایمرها از مرز بین دو اگزون طراحی شد تا آلودگی احتمالی DNA روی واکنش ما تأثیر نداشته باشد. همچنین از ژن *ActinB* به عنوان ژن کنترل داخلی پرایمر (با شماره دستیابی NM_007393.5) طراحی شد.

واکنش Real Time RT- PCR

سطوح بیان این ژن‌ها با روش Real Time RT-PCR اندازه‌گیری شد. واکنش‌ها برای سه ژن *RSPO1, LIF, SOX9* با استفاده از کیت Biofact و مطابق پروتکل انجام شد.

تحلیل آماری

آنالیز آماری نتایج Real Time RT-PCR توسط نرم افزار REST 2009 انجام شد. CT، سیکلی از واکنش تعریف شده که سیگنال فلورسانس از Threshold عبور می‌کند و تفاوت CT بین ژن مورد نظر و ژن رفرنس به عنوان ΔCT تعریف شده.

ΔΔCT تفاوت ΔCT بین نمونه‌های تیمار و کنترل است. Folding change از رابطه ۲ به توان ΔΔct- از طریق نرم افزار rest به دست آمد.

فرمول‌های مورد استفاده جهت مقایسه افزایش بیان ژن‌های هدف نسبت به ژن مرجع به شرح زیر است:

فرمول۱:

ΔCT=ژن مرجعmCT-ژن هدف mCT

فرمول۲:

ΔΔCT =ژن کنترلΔ CT-ژن تیمارΔ CT

فرمول۳:

$$\text{Fold change}=2^{-\Delta\Delta Ct}$$

ترسیم شبکه ژنی توسط نرم افزار Cytoscape

Cytoscape یک نرم افزار برای تجسم شبکه‌های ملکولی و ژنی و مسیرهای بیولوژیک است که در این تحقیق جهت ترسیم و آنالیز شبکه ژنی ژن‌های مؤثر در تکوین تخمدان از این نرم افزار استفاده شده است.

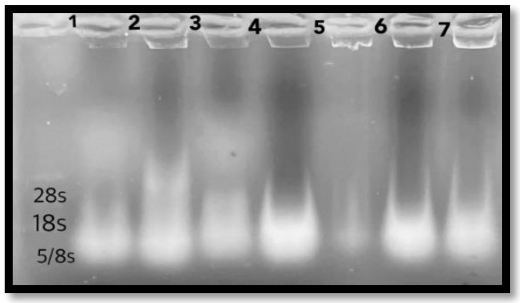
نتایج

جوامع آماری

جامعه آماری این آزمایش شامل ۲ گروه ۷ تایی موش نژاد balb/c ۲ ماهه بود که طبق پروتکل هلسینگی نگهداری شدند. گروه تیمار تحت درمان با داروی فنیتوئین ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم قرار گرفتند و پس از بارداری جنین موش‌ها در ۲۰ روزگی تشریح شده و تخمدان جنین‌ها خارج شد. در طی این مطالعه هیچ موش بارداری فوت نکرد اما وضعیت سلامت عمومی آن‌ها تایید نشد چرا که بارداری آن‌ها به نسبت گروه تیمار دیرتر صورت گرفت، تعداد موش‌های باردار کمتر از گروه تیمار بود که این علت می‌تواند کاهش میل جنسی آن‌ها را تایید کند، همچنین تعداد نوزادان متولد شده از هر مادر نسبت به گروه کنترل کمتر بود.

نتایج استخراج RNA از بافت تخمدان و ارزیابی آن

به کمک کیت استخراج RNA از شرکت سیناکلون طبق پروتکل مربوطه، استخراج RNA از نمونه‌های کنترل و تیمار انجام شد. کیفیت RNA استخراج شده به کمک الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی شد. نتیجه الکتروفورز چند نمونه در شکل ۱ ارائه شده است. غلظت نمونه‌های به دست آمده همگی در حد مطلوب بود و سه باند 28s, 18s ,5/8s به صورت تک باند مشاهده شد.



شکل ۱: RNA استخراج شده از نمونه‌ها را روی ژل برده و سه باند مشاهده شد. M مارکر انداز DNA. ۱ تا ۷ نمونه‌های RNA استخراج شده که ۳ میکرولیتر آن در ژل بررسی شد. ژل آگارز ۱٪. B. بلانک.

ترسیم شبکه ژنی

شبکه‌ی ژنی ژن‌های *RSPO1, SOX9, LIF* با استفاده از نرم افزار سایتواسکیپ (sytoscape) رسم شده است (شکل ۲).

شبکه‌ی ژنی رسم شده نشان می‌دهد که ارتباط این سه ژن از طریق مهار یا تحریک ژن‌های بسیاری صورت می‌گیرد.

ژن *SOX9* با اثر بر سه ژن *LEF1* و *LRP6* و *AMH* آن‌ها را فعال می‌کند. *AMH* خود با *EGFR* و *EGFR* نیز با ژن *LIF* در ارتباط هستند. *EGFR* به طور مستقیم *SOX9* را مهار می‌کند. ارتباط دو ژن *SOX9* و *LIF* از طریق *EGFR* و *AMH* می‌باشد.

ژن *FOXL2* مستقیما باعث مهار *SOX9* می‌شود. مهار شدن یا نشدن این ژن در جنسیت جنین تأثیر گذار

است، اگر مهار شود امکان ماده شدن قطعا بیشتر خواهد شد. همچنین *FOXL2* با ژن *RSPO1* ارتباط برقرار می‌کند و پل ارتباطی *RSPO1* و *SOX9* ژن *FOXL2* می‌باشد. *FOXL2, AMH* به طور متقابل یکدیگر را فعال می‌کنند. ژن *FOXL2* با ژن *LEF1* که توسط *SOX9* فعال شده بود نیز در ارتباط است. *WNT4* هم ارتباط نزدیکی با *FOXL2* دارد. ارتباط *SOX9* و *RSPO1* فقط به *FOXL2* خلاصه نمی‌شود. این دو ژن با ارتباط با ژن‌های *LRP6* و *WNT1* می‌توانند باهم مرتبط شوند.

RSPO1 با ژن‌های *LGR6, WNT4, WNT1, LGR4, APC, AXIN1* به طور مستقیم اینترکشن برقرار می‌کند. همچنین می‌تواند دو ژن *DKK1, LRP6* را بدون واسطه مهار کند.*RSPO1* از طریق ژن‌های *FOXL2, WNT1, LRP6, WNT4* بصورت غیر مستقیم با ژن *LIF* در ارتباط است[۱۶-۱۴]:

RSPO1 از طریق LRP6 به ژن *IGFBP4* مرتبط می‌شود. *IGFBP4* با ژن‌های *IGFBP3, IGFBP5* ارتباط دارند. *IGFBP5* خود توسط ژن *IGF1* فعال می‌شود. ژن *IGF1* مستقیما با *LIF* در ارتباط می‌باشد. ژن *IGFBP3* نیز از طریق *EGFR* با *LIF* در ارتباط است.

RSPO1 با *WNT4* در ارتباط است. *WNT4* با *FOXL2* ارتباط دارد. *FOXL2* نیز با ژن‌های *SOX9*، *EGFR*، *AMH* به ژن *LIF* مرتبط می‌شود.

RSPO1 در ارتباط نزدیکی با *WNT1* می‌باشد. *WNT1* با ژن *SOX9* ارتباط دارد. نتیجه‌ی این ارتباط همانطور که گفته شد، به *LIF* ختم خواهد شد.*WNT1* توسط سه ژن *WNT4, LRP6, DKK1* در این شبکه مهار می‌شود. همچنین *FZD1* توسط سه ژن *LRP5, DKK1, WNT4* مهار می‌شود. *APC* نیز توسط سه ژن *WNT1, LRP6, AXIN1* دخیل در این شبکه فعال می‌شود *AXIN1* توسط سه ژن *LRP6, WNT1, WNT4* فعال می‌شود[۱۴-۱۲] (شکل ۲).

نتایج بررسی منحنی ذوب، منحنی تکثیر و محصولات PCR هر ژن در ژل الکتروفورز

محصولات PCR هر ژن در ژل الکتروفورز بارگذاری شد و تصویر ژل الکتروفورز، باندهای مربوط به تکثیر اختصاصی قطعات مورد نظر را تأیید نمود.

Ladder با اندازه مناسب به عنوان شاخص اندازه ملکولی، به میزان مناسب در این آزمایش 100bp در یک چاهک قرار داده شده است که برای ژن *LIF* 125bp، ژن *RSPO1* 134bp، ژن *SOX9* 140bp و ژن *B-actin* 119bp مشاهده شده است. (شکل۳-۱ تا ۳-۴ شکل ج).

منحنی ذوب سه ژن که بر اساس دما و مشتق سیگنال فلورسنت دستگاه Real-Time PCR ترسیم می‌شود در شکل ۳-۲ تا ۳-۴ شکل ب نمایش داده شده است.

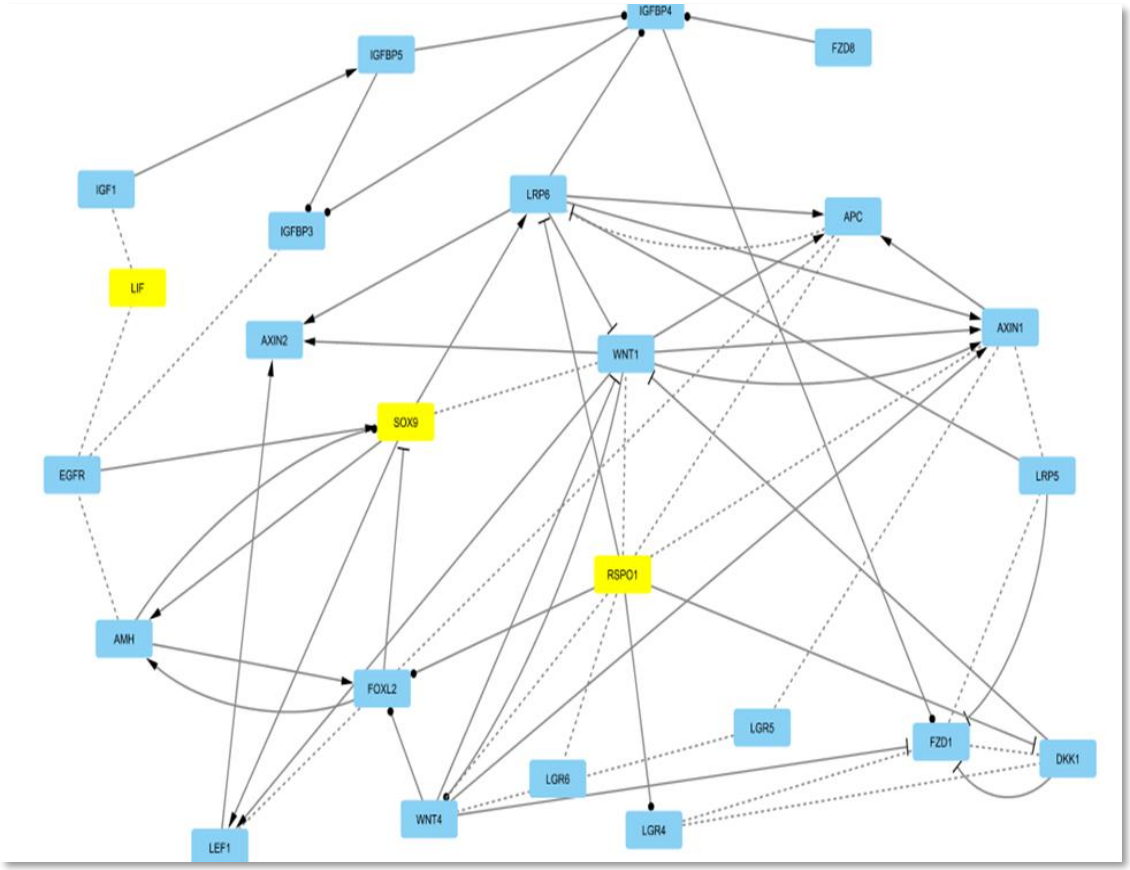
تحلیل آماری و آنالیز داده‌ها:

آنالیز آماری بیان ژن‌ها توسط نرم افزار REST 2009 انجام شد و مقایسه میان بیان ژن‌های *SOX9, RSPO1,*

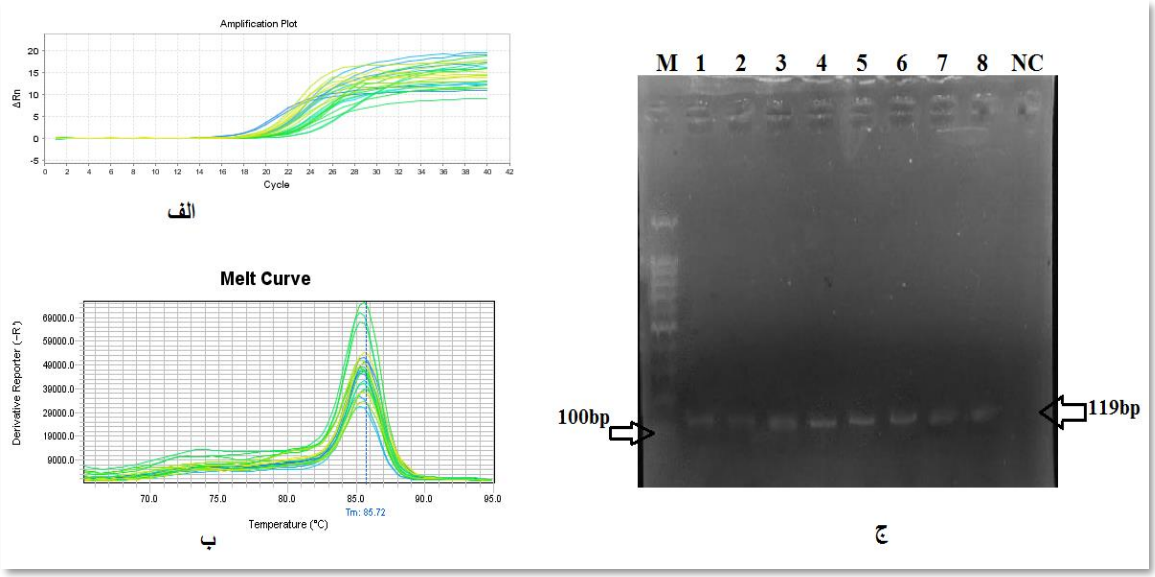
LIF در موش‌های تیمار نسبت به کنترل به صورت نمودار نمایش داده شده است (شکل ۳-۵، الف).

در بررسی ارتباط ژن *SOX9* با چگونگی پاسخ به دارو P- value=۰/۱۷۴ است که کوچکتر از ۰/۰۵ نبوده و این به این معنا است که از نظر آماری ارتباط معناداری بین این ژن و چگونگی پاسخ به دارو وجود ندارد (شکل ۳-۵، ج).

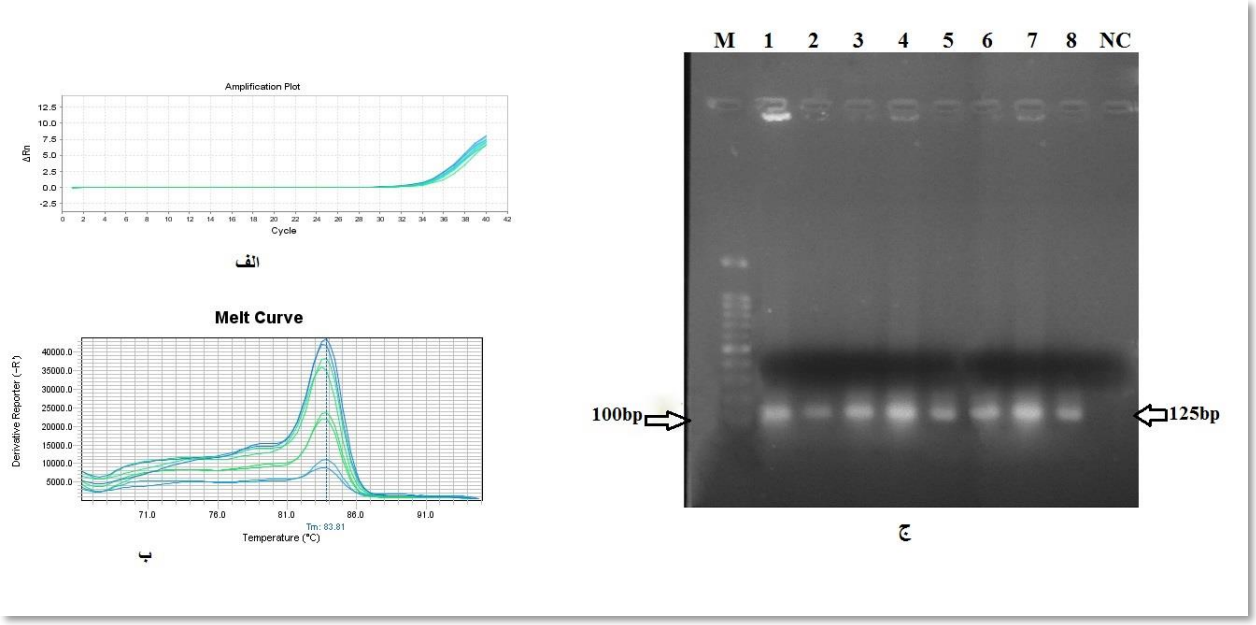
در بررسی ارتباط ژن *RSPO1* با چگونگی پاسخ به دارو P- value=۰/۲۸۲ است که بزرگتر از ۰/۰۵ بوده یعنی از نظر آماری ارتباط معناداری بین این ژن و چگونگی پاسخ به دارو وجود ندارد (شکل ۳-۵، ب).



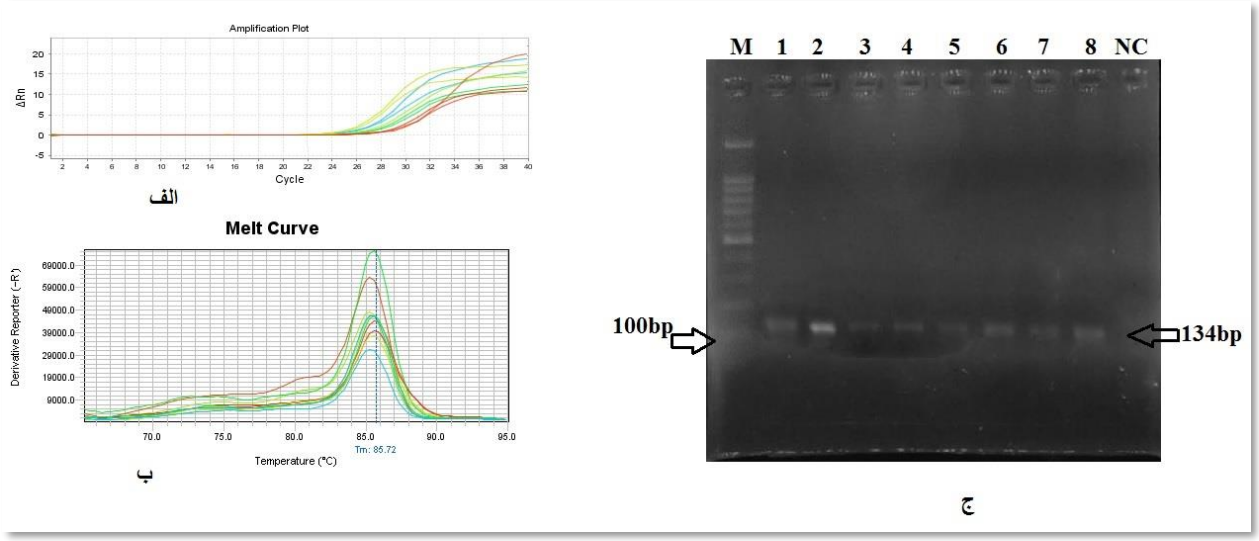
شکل ۲. شبکه‌ی ژنی و ارتباط سه ژن SOX9، RSPO1, LIF, SOX9



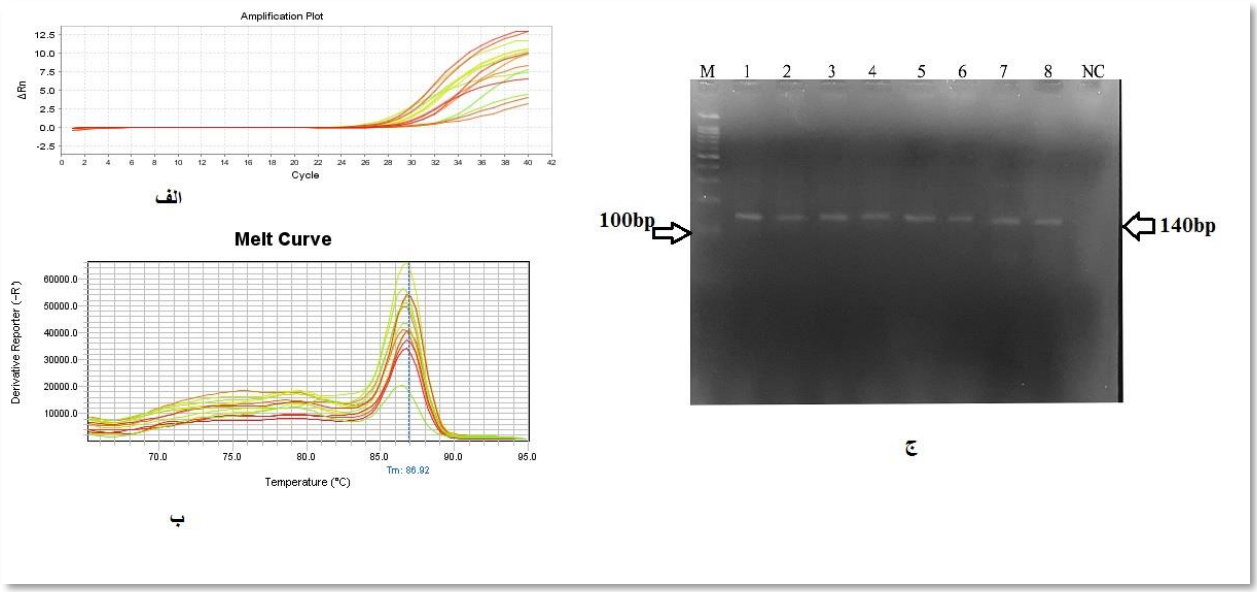
شکل ۳-۱. منحنی تکثیر(الف)، منحنی ذوب(ب) و بررسی الکتروفورزی محصول Realtime-RT-PCR ژن B-ACTIN (NC:کنترل منفی).



شکل۳-۲. منحنی تکثیر(الف)، منحنی ذوب(ب) و بررسی الکتروفورزی محصول Realtime-RT-PCR ژن LIF



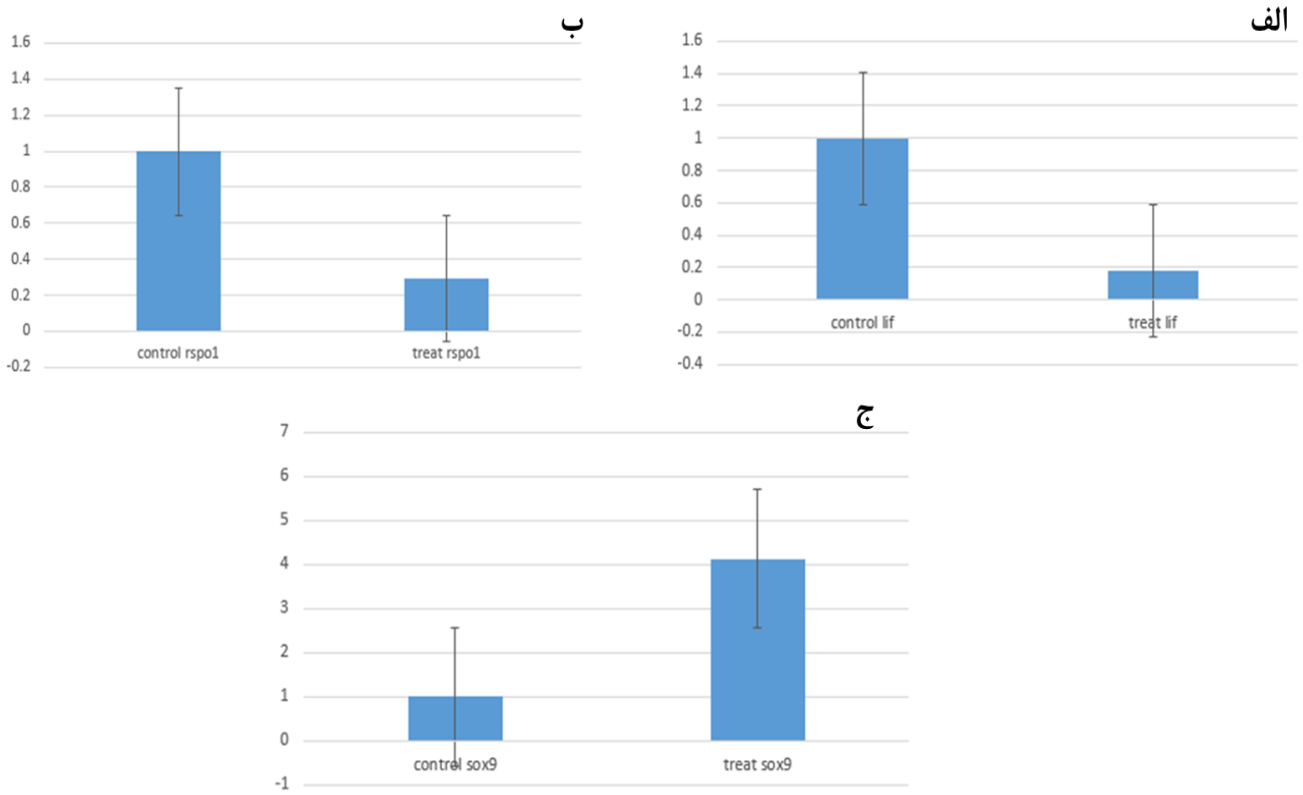
شکل ۳-۳. منحنی تکثیر(الف)، منحنی ذوب(ب) و بررسی الکتروفورزی محصول Realtime-RT-PCR ژن RSPO1



۳-۴. منحنی تکثیر(الف)، منحنی ذوب(ب) و بررسی الکتروفورزی محصول Realtime-RT-PCR ژن SOX9

در بررسی ارتباط ژن *LIF* با چگونگی پاسخ به دارو P- value=۰/۱۲۶ بوده که بزرگتر از ۰/۰۵ است و این یعنی از نظر آماری ارتباط معناداری بین این ژن و چگونگی پاسخ به دارو وجود ندارد.

همچنین نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های Real Time RT-PCR نشان داده است که در جنین‌های موش‌های تیمار نسبت به موش‌های کنترل ژن *RSPO1* به میزان ۰/۲۹۳ کاهش بیان داشته که معنادار نبوده است و ژن *LIF* به میزان ۰/۱۸۲کاهش بیان داشته که معنادار نبوده است و ژن *SOX9* به میزان ۴ برابر افزایش بیان داشته اما به دلیل اینکه اختلاف واریانس با نمونه های کنترل کمتر از ۰/۵ نبوده، در نهایت این را میتوان گفت که این ژن به میزان ۰/۱۷۴ دچار کاهش بیان شده است. نمودارهای رسم شده توسط اکسل که نشان دهنده‌ی افزایش یا کاهش بیان این ژن‌ها می‌باشد، بیان ژن SOX9 افزایش ۴ برابری داشته است اما به علت اینکه P value آن کمتر از ۰/۰۵ نشد، بیان آن معنایی ندارد، و ژن‌های rspo1 و lif کاهش بیان ناچیزی داشته‌اند که بیان آن‌ها نیز معنی‌دار نیست



شکل ۳-۵. الف: مقایسه Fold Change ژن *LIF* در موش‌های تیمار نسبت به کنترل. کاهش بیان ناچیزی داشته که معنادار نیست. ب: مقایسه Fold Change ژن *RSPO1* در موش‌های تیمار نسبت به کنترل. کاهش بیان این ژن رانشان می‌دهد که معنادار نیست. ج: مقایسه Fold Change ژن *SOX9* در موش‌های تیمار نسبت به کنترل. کاهش بیان ژن SOX9 که معنادار نیست.

بحث

در این مطالعه داروی ضد صرع فنیتوئین انتخاب شده است. دلیل انتخاب شدن این دارو به این خاطر است که این دارو یکی از داروهای انتخابی در درمان بیماری صرع در بسیاری از بیماران به ویژه زنان می‌باشد. هدف از این مطالعه این بود که ببینیم این دارو می‌تواند در اثر مصرف توسط مادر در نوزادی که در رحم مادر وجود دارد ایجاد ناباروری یا مشکلات تخمدانی کند یا خیر.

در این آزمایش به بررسی تأثیر داروی فنیتوئین بر تمایز تخمدان جنین موش و سنجش بیان ۳ ژن کلیدی اثرگذار در تکوین تخمدان پرداخته شده است.۳ ژن مورد مطالعه‌ی ما شامل: *RSPO1, LIF, SOX9* می‌باشد که نقش هرکدام در تکوین تخمدان به این صورت است که، ژن *RSPO1* در رشد تخمدان نقش دارد، ژن *SOX9* عامل اصلی در تعیین جنسیت در جنس نر می‌باشد و ژن *LIF* که در بهبود لانه‌گزینی در افراد نابارور موثر است.

در این پژوهش ۲ گروه ۷ تایی موش نژاد balb/c مورد آزمایش قرار گرفتند. گروه تیمار ۴-۳ روز قبل از بارداری تا تولد نوزادان تحت تیمار با داروی فنی توئین قرار گرفتند و نمونه‌گیری از بافت تخمدان انجام شد. در نهایت از بافت‌های مورد نظر RNA استخراج شد سپس cDNA آن‌ها ساخته شد و با استفاده از تکنیک Real Time-

RT PCR بیان ژن‌های *SOX9, RSPO1, LIF* اندازه‌گیری شد. برای تحلیل میزان بیان ژن‌ها از نرم افزار rest 2009 استفاده گردید و با استفاده از نرم افزار cytoscape شبکه ژنی این سه ژن رسم شد. در این مطالعه تغییرات بیان با توجه به آنالیز آماری در دو ژن *RSPO1, LIF* در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نمی‌باشد همچنین ژن *SOX9* هم که دارای افزایش بیان ۴ برابری شده است، این افزایش بیان معنی‌دار نیست. از اثرات جانبی این دارو می‌توان گفت که فنیتوئین باعث کاهش میل جنسی و کاهش کیفیت باروری در موش‌های مادر تحت تیمار شد به این صورت که، حتی طول دوره بارداری این موش‌ها افزایش پیدا کرد، یا اینکه موش‌های گروه تیمار ممکن است به علت کم شدن میل جنسی در آنها دیرتر از موش‌های گروه کنترل لقاح انجام داده باشند (موش‌های تیمار حدود ۵ الی ۷ روز بعد از موش‌های گروه کنترل، زایمان کردند). پس از زایمان تعداد جنین‌های متولد شده کمتر از گروه کنترل بود و خوردن نوزادان موش در گروه تیمار بسیار زیاد بود (به طوری که برای تشریح فقط ۴ موش نوزاد باقی مانده بود). با توجه به این عوارض توصیه می‌شود مصرف فنیتوئین به ویژه در زنان باردار قطع و دارویی ایمن-تر جایگزین آن گردد.

در این مطالعه بیان ژن SOX9 که جز ژن‌های کلیدی و مهم در تعیین جنسیت می‌باشد تحت تأثیر فنیتوئین بررسی شد. همچنین بیان ژن LIF که جز ژن‌هایی است که تأثیر آن در تکوین تخمدان جنس ماده به اثبات رسیده و ژن RSPO1 نیز که در شکل‌گیری و رشد تخمدان نقش مهمی را ایفا می‌کند، مورد بررسی قرار گرفت و نتایج ما نشان داد که بیان ژن SOX9 که افزایش ۴ برابری داشت اما به علت اینکه P value آن کمتر از ۰/۰۵ نشد، معنادار نیست، و دو ژن LIF و RSPO1 دارای کاهش بیان ناچیزی شده‌اند که که آن‌ها نیز معنا دار نیست.

یک مطالعه بر روی داروی فنیتوئین انجام شد که اثر ایمنی فنیتوئین مورد ارزیابی قرار گرفت که هدف آن ، بررسی ایمنی فنیتوئین از نظر عوارض جانبی قلبی عروقی بوده است. در گزارش‌های موردی، میزان سریع تزریق (کمتر از ۵۰ میلی گرم در دقیقه) فنیتوئین را به عنوان علت اصلی افزایش مرگ و میر در نظر داشتند. در مقابل، هیچگونه عوارض جانبی جدی قلبی عروقی منجر به مرگ در کارآزمایی‌های بالینی قابل توجیه نبود. نتیجه‌ی این بررسی این بود که، میزان تزریق بیشتر از ۵۰ میلی گرم برای بیماران خطرناک گزارش شده است. برای بیماران مسن و بیماران مبتلا به همبستگی قلبی عروقی، که ضربان قلب آنها کندتر خواهد بود، این میزان باید کمتر باشد [۱۸].

مطالعه‌ی دیگری برروی این دارو که انجام شده بود این بود که از داروی فنیتوئین برای درمان بیماری‌هایی به غیر از صرع نیز استفاده شده است. یکی از آنها به صورت بوده است: بررسی تأثیر تزریق فنیتوئین بر روند بهبود زخم در موش‌های دارای آسیب طناب صوتی به روش‌های هیستوپاتولوژیک بوده ونتایجی که به دست آمد به این صورت بود که تزریق فنیتوئین در موش‌های صحرایی پس از آسیب طناب صوتی باعث افزایش معنی‌دار ضخامت لایه پروپریا و تراکم فیبروبلاست و کلاژن منظم و بالغ در لایه

پروپریا شد [۱۹].

بخش مهم و اصلی که ارگان اصلی در بیماری ناباروری است، تخمدان می‌باشد، که اگر مورد اسیب واقع شود، اعمال خود را در قبال آزاد سازی به موقع تخمک و ترشح به موقع هورمون زنانه انجام نخواهد داد. شروع شکل‌گیری تخمدان در روز ۱۲/۵ بارداری می‌باشد که این سلول‌ها به صورت کیست به هم پیوسته ایجاد می‌شوند و ارتباط آنها از طریق پل‌های سیتوپلاسمی است. فاکتور هایی که در به وجود آمدن تخمدان نقش دارند gata4 و gata6 هستند که در فرایند میوز۲ که بعد از تولد تکمیل می‌شود، این دو فاکتور حضور دارند [۲۰].

ژن‌هایی بسیاری در شکل‌گیری و تکوین تخمدان در حیوانات و به ویژه انسان نقش دارند. از جمله‌ی این ژن‌ها *RSPO1*، *LIF* و *SOX9* می‌باشند.

یکی از ژن‌هایی که مورد بررسی قرار گرفت ژن *RSPO1* می‌باشد. در مطالعه‌ی ما این ژن کاهش بیان ناچیزی را نشان داد که معنی‌دار نبود. این نتایج به نظر می‌رسد که تا حدودی قابل انتظار بوده است و ما انتظار کاهش بیان معنا دار را داشتیم. این ژن در رشد تخمدان موثر است، همچنین بیان ژن *RSPO1* در تخمدان در چندین گونه مهره دار ثبت شده است و این نشان می‌دهد که نقش تعیین کننده تخمدان در آن بسیار محفوظ است (توسیان، ۲۰۱۳). در مطالعه‌ای که طی ۶تا ۹ هفته به طول انجامید و در آن غدد جنین انسان مورد مطالعه قرار گرفت. بیان سه ژن *CTNNB1* ، *WNT4* ، *RSPO1* در بیضه و تخمدان مورد ارزیابی قرار گرفتند،که نتیجه‌ی آن به این صورت گزارش شد:

بیان *RSPO1* در مراحل اصلی رشد اولیه تخمدان انسان افزایش یافت. تجزیه و تحلیل *CTNNB1*، *WNT4* و *RSPO1* در غدد جنین انسان بین ۶-۹ هفته پس از برداشت افزایش بیان معنی‌داری در ژن *RSPO1* در تخمدان در حال توسعه در مقایسه با بیضه را نشان داد، در حالی که تفاوت معنی‌داری در بیان دو ژن *CTNNB1* و *WNT4* دیده نشد. *RSPO1* در بیضه در حال توسعه دارای بیان کمتری بود و در تمام این مراحل رشد اساسی بیضه تغییر نکرد [۱۷].

با توجه به این اطلاعات به نظر می‌رسد که تغییر در بیان ژن RSPO1 می‌تواند اثرات بسیار عمیقی در تکوین تخمدان ایجاد کند تا حدی که تغییر جنسیت را در جنین شاهد باشیم. تغییر در بیان این ژن کاهش داشت اما معنا دار نبود و به نظر می‌رسد که این ژن از نظر تنظیمی در مقابل تغییراتی که از طریق محیط وارد می‌شود مقاومت بالایی دارد که این ویژگی از ویژگی ژن‌های مهم به ویزه ژن‌های فاکتورهای نسخه‌برداری می‌باشد.

ژن *LIF*:پروتئین *LIF* ممکن است به بهبود میزان لانه گزینی در زنان مبتلا به ناباروری کمک کند. در یک مطالعه‌ای که انجام شده است، در آن ناباروری و بیان ژن *LIF* مورد بررسی قرار گرفته است، مطالعه‌ی انجام شده از نوع مشاهده‌ای آینده‌نگر از مارس ۲۰۱۳ تا فوریه‌ی ۲۰۱۶ انجام شد. زنان نابارور از گروه بیمار و زنان بارور از گروه کنترل بودند. بیان ژن *LIF* در بیماران مبتلا به ناباروری تفاوت معناداری با گروه کنترل داشتند، نتیجه‌ی آن کاهش

بیان ژن *LIF* در همه‌ی زیرگروه‌های ناباروری بود[۲۱- ۲۲].

در این مطالعه بیان ژن *LIF* کاهش داشت اما معنادار نبود. کاهش بیان این ژن ناشی از مصرف این دارو در دوزهای بالا می‌تواند در واقع آگاهی دهنده‌ی یک خطر بزرگ در رابطه با مصرف این دارو در زنان باردار و حتی زنان غیر باردار باشد، به این دلیل که این دارو با کاهش بیان *LIF* می‌تواند حتی منجربه سقط جنین یا عدم لانه گزینی موفق شود.

مطاله‌ی حاضر با توجه به تعداد نمونه و سطح آزمایشات شاید نتواند قوانین کلی در رابطه با تأثیر داروی فنیتوئین در بیان ژن‌ها را ارائه کند اما به عنوان یک آزمایش مقدماتی تایید کرد که مصرف داروی فنیتوئین و داروهای مشابه که برای درمان صرع مورد استفاده قرار می‌گیرد می‌توانند اثرات چشمگیری در روند تمایز تخمدان و مشکلات بعدی به وجود آورند. نتایج ما که در شبکه‌ی ژنی که طراحی کردیم نیز به راحتی قابل تفسیر و پیگیری است نشان می‌دهد که تأثیر داروی فنیتوئین حتی در حد بسیار کم و در شرایطی که حتی معنادار نیست اما تغییر وجود دارد ممکن است بتواند با مکانیسم‌های تصاعدی یا آبشاری باعث افزایش یا کاهش بیان ژن‌های پایین دست و اثرات متقابل بین مولکول‌های درگیر در روند تکوین تخمدان شود. لذا در این مطالعه برای اولین بار پیشنهاد می‌کنیم مصرف فنیتوئین با توجه به بیان ژن‌های مهم در تکوین تخمدان و باروری جنس ماده مورد مد نظر قرار گیرد و در روند درمان داروهای جایگزین که اثرات جانبی کمتری رو تمایز جنسی یا جنسیت جنین مادرانی که مبتلا به صرع بوده و از این نوع داروها استفاده می‌کنند در نظر گرفته شود.

منابع

1- Scharfman H. E. (2007). The neurobiology of epilepsy. Current neurology and neuroscience reports, 7(4), 348–354. https://doi.org/10.1007/s11910-007 0053-z.
2- Stafstrom, C. E., & Carmant, L. (2015). Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 5(6), a022426. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022426
3- Shneker, B. F., & Fountain, N. B. (2003). Epilepsy. Disease-a-month: DM, 49(7), 426–478. https://doi.org/10.1016/s0011-5029(03)00065-8
4- Inaji, M., & Maehara, T. (2014). Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine, 72(5), 827–833.
5- Kulju, T., Haapasalo, J., Verner, R., Dibué-Adjei, M., Lehtimäki, K., Rainesalo, S., & Peltola, J. (2020). Frequency of Automatic Stimulations in Responsive Vagal Nerve Stimulation in Patients With Refractory Epilepsy.

6- Neuromodulation: journal of the International Neuromodulation Society, 23(6), 852–858. https://doi.org/10.1111/ner.13238
7- R. Moavero, L. Rosa Pisani, F. Pisani, P. Curatolo. (2018). Safety and tolerability profile of new antiepileptic drug treatment in children with epilepsy.Expert Opin Drug Saf, 17, pp. 1015-1028. http://dx.doi.org/10.1080/14740338.2018.151842
8- X. Liu, P.R. Carney, R. Bussing, R. Segal, L.B. Cottler, A.G. Winterstein. (2017).
9- Martínez-Juárez, A., López-Luna, M. A., Porras-Gómez, T. J., & Moreno-Mendoza, N. (2018). Expression of the SOX9, Foxl2, Vasa, and TRPV4 genes in the ovaries and testes of the Morelet's crocodile, Crocodylus moreletii. Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution, 330(3), 148–164. https://doi.org/10.1002/jez.b.22799
10- Nicol, B., & Yao, H. H. (2015). Gonadal Identity in the Absence of Pro-Testis Factor SOX9 and Pro-Ovary Factor Beta-Catenin in Mice. Biology of reproduction, 93(2), 35. https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131276
11- Rahmoun, M., Lavery, R., Laurent-Chaballier, S., Bellora, N., Philip, G. K., Rossitto, M., Symon, A., Pailhoux, E., Cammas, F., Chung, J., Bagheri-Fam, S., Murphy, M., Bardwell, V., Zarkower, D., Boizet-Bonhoure, B., Clair, P., Harley, V. R., & Poulat, F. (2017). In mammalian foetal testes, SOX9 regulates expression of its target genes by binding to genomic regions with conserved signatures. Nucleic acids research, 45(12), 7191–7211. https://doi.org/10.1093/nar/gkx328
12- Tan, Z., Niu, B., Tsang, K. Y., Melhado, I. G., Ohba, S., He, X., Huang, Y., Wang, C., McMahon, A. P., Jauch, R., Chan, D., Zhang, M. Q., & Cheah, K. (2018). Synergistic co-regulation and competition by a SOX9-GLI-FOXA phasic transcriptional network coordinate chondrocyte differentiation transitions. PLoS genetics, 14(4), e1007346. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007346
13- Pellegrino, M., Maiorino, R., & Schonauer, S. (2010). WNT4 signaling in female gonadal development. Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets, 10(2), 168–174. https://doi.org/10.2174/187153010791213074
14- Arend, R. C., Londoño-Joshi, A. I., Straughn, J. M., Jr, & Buchsbaum, D. J. (2013). The Wnt/β-catenin pathway in ovarian cancer: a review. Gynecologic oncology, 131(3), 772–779. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.09.034
15- Chassot, A. A., Bradford, S. T., Auguste, A., Gregoire, E. P., Pailhoux, E., de Rooij, D. G., Schedl, A., & Chaboissier, M. C. (2012). WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. Development (Cambridge, England), 139(23), 4461–4472. https://doi.org/10.1242/dev.078972
16- Pannetier, M., Chassot, A.-A., Chaboissier, M.-C., & Pailhoux, E. (2016). Involvement of FOXL2 and RSPO1 in Ovarian Determination, Development, and Maintenance in Mammals. Sexual Development : Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation, 10(4), 167–184. https://doi.org/10.1159/000448667
17- Tomaselli, S., Megiorni, F., Lin, L., Mazzilli, M. C., Gerrelli, D., Majore, S., Grammatico, P., & Achermann, J. C. (2011). Human RSPO1/R-spondin1 is expressed during early ovary development and augments β-catenin signaling. PloS one, 6(1), e16366. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016366
18- Guldiken, B., Remi, J., & Noachtar, S. (2016). Cardiovascular adverse effects of phenytoin. Journal of Neurology, 263(5), 861–870. https://doi.org/10.1007/s00415-015-7967-1
19- Alicura Tokgoz, S., Saka, C., Akin, I., Koybasioglu, F., Kilicaslan, S., Caliskan, M., … Cadalli Tatar, E. (2019). Effects of phenytoin injection on vocal cord healing after mechanical trauma: An experimental study. Turkish Journal of Medical Sciences, 49(5), 1577–1581. https://doi.org/10.3906/sag-1903-63
20- Tevosian S. G. (2013). Genetic control of ovarian development. Sexual development: genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation, 7(1-3), 33–45. https://doi.org/10.1159/000339511
21- Taniguchi, T., Miyagawa, T., Tamaki, Z., Nakamura, K., Yamashita, T., Saigusa, R., … Asano, Y. (2017). A possible implication of reduced levels of LIF, LIFR, and gp130 in vasculopathy related to systemic sclerosis. Archives of Dermatological Research, 309(10), 833–842. https://doi.org/10.1007/s00403-017-1786-4
22- Margioula-Siarkou, C., Prapas, Y., Petousis, S., Milias, S., Ravanos, K., Dagklis, T., … Rousso, D. (2017). LIF endometrial expression is

impaired in women with unexplained infertility while LIF-R expression in all infertility sub-groups. Cytokine, 96, 166–172. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.04.009